

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA CONTROLAR MICROORGANISMOS NO DESEABLES EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 62/133,701, presentada el 16 de marzo de 2015, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente y en su totalidad al presente documento por referencia.

CAMPO TÉCNICO

[0002] En términos generales, la presente invención está relacionada con el control microbiano en los procesos de fermentación. En particular, la presente invención está relacionada con un método para reducir o controlar la concentración de microorganismos indeseables mediante la inhibición de su crecimiento.

ANTECEDENTES

[0003] En la última década, el uso de etanol como combustible para transporte ha aumentado significativamente. La producción de etanol en Estados Unidos aumentó de aproximadamente 6,400 millones de litros en el año 2000 a más de 37,000 millones de litros en el año 2009. El número de plantas de etanol aumentó de 54 en el año 2000 a 170 en el año 2009. Aumentos similares en la producción y construcción de plantas han ocurrido en América Latina y Europa. En el año 2007, el Congreso de Estados Unidos promulgó la Ley de Independencia y Seguridad Energética (H.R. 6), que establece el estándar de combustible renovable en 136,000 millones de litros de etanol para el año 2022. Para cumplir esta meta, la industria del etanol deberá seguir creciendo.

[0004] Actualmente, tanto el etanol industrial (por ejemplo, el combustible) como el etanol para bebidas se producen en gran escala a partir de materias primas agrícolas mediante procesos de fermentación en los que el azúcar se convierte en etanol y dióxido de carbono por levadura de inoculantes. Muchas materias primas pueden ser usadas para proporcionar el azúcar para la fermentación, incluyendo, potencialmente, cualquier almidón o material celulósico, lo que incluye a casi todas las plantas, ya que cualquier almidón o celulosa puede ser un precursor del azúcar. Algunas de las materias primas comunes particularmente aptas para la producción de etanol combustible incluyen maíz, milo, sorgo, caña de azúcar, remolacha de azúcar y melaza.

[0005] Las materias primas utilizadas para la producción de etanol son productos naturales. Por consiguiente, es probable que se presente una gran variedad de microorganismos tales como bacterias, hongos y levadura de forma natural en las materias primas. Las condiciones del proceso de fermentación comercial no son completamente estériles; por consiguiente, estos “microorganismos contaminantes” estarán presentes en el proceso. En la producción de etanol comercial, los microorganismos de mayor preocupación son las bacterias productoras de ácido láctico y las bacterias productoras de ácido acético. Dichas bacterias entran en el proceso desde varias fuentes, incluyendo las materias primas, los equipos, el agua del proceso, el aire, y la levadura de inoculantes, entre otras. Las concentraciones de dichas bacterias pueden aumentar en el entorno del proceso, ya sea mediante la introducción de materiales entrantes (materias primas, agua, aire, levadura) o pueden proliferar naturalmente como resultado de condiciones favorables para el crecimiento bacteriano. El ambiente óptimo para la producción de levadura también es muy propicio para el crecimiento de estas de estas bacterias. Los ácidos orgánicos producidos por las bacterias inhiben el crecimiento de las levaduras y reducen así la tasa de producción de etanol. Las bacterias también pueden consumir azúcares y otros nutrientes destinados al uso por parte de la levadura para producir los productos deseados, haciendo que todo el proceso sea menos económico.

[0006] Hay una mayor necesidad de tratamientos antibacterianos, no solo por el crecimiento en el volumen de producción de etanol, sino también por la expansión en tamaño de las instalaciones de producción de etanol. Mientras que una planta que producía de 150 a 200 millones de litros al año (MMly) se consideraba una fábrica grande hace apenas unos años, hoy en día las instalaciones de 380 MMly (o más) son el estándar de la industria actual. En los procesos por lotes alimentados, el volumen de los lotes de fermentación individuales ha aumentado considerablemente. Para ajustarse a esta mayor capacidad, la velocidad de flujo de la materia prima (comúnmente conocida como “mash”, una vez que se ha preparado para entrar a la fermentación) que entra al sistema de fermentación ha aumentado de aproximadamente 2000-3000 litros por minuto a 4500-6000 litros por minuto en las mayores instalaciones de producción de etanol.

[0007] Varios procesos de fermentación usan antibióticos, como por ejemplo minocin, como composiciones antibacterianas. Se ha desfavorecido este uso debido

a la sospecha de desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos y la acumulación de residuos de antibióticos en los subproductos de la fermentación. Las bacterias resistentes a los antibióticos son una gran preocupación para la salud humana.

[0008] Adicionalmente, los subproductos de la producción de etanol incluyen sólidos recolectados después de la destilación del producto de etanol. Dichos sólidos incluyen granos de destilería secos con solubles (DDGS) y granos de destilería húmedos con solubles (DWGS), ambos de los cuales se venden posteriormente como productos de alimentación animal. Por consiguiente, los residuos de antibióticos pueden estar presentes en estos productos de alimentación animal y, por consiguiente, muchos países están considerando medidas normativas que podrían limitar o eliminar el uso de antibióticos para la producción de etanol.

[0009] Otros procesos de fermentación han usado métodos no antibióticos para controlar el crecimiento de las bacterias. Por ejemplo, el dióxido estabilizado de cloro (SCD) se ha utilizado para prevenir la contaminación bacteriana en la producción de etanol. El SCD se agrega antes de la aparición significativa de crecimiento bacteriano en la producción de etanol, como una medida preventiva, más que correctiva. Por consiguiente, se evita sustancialmente el crecimiento de las bacterias contaminantes antes y durante la fermentación de azúcar a alcohol, creando condiciones que aumentan el crecimiento de la levadura de inoculantes y permiten que la levadura de inoculantes produzca etanol sin inhibición por los ácidos orgánicos producidos por las bacterias.

[0010] También se ha utilizado peróxido de hidrógeno de urea (UHP) para prevenir el crecimiento bacteriano en los procesos de fermentación. El UHP solo se encuentra disponible en el mercado en cantidades limitadas, pues este aducto tiene problemas de producción y de almacenamiento. El UHP se agrega al proceso antes de introducir la levadura, eliminando así una población considerable de contaminantes bacterianos, y permitiendo que la levadura de inoculantes convierta las materias primas de fermentación en etanol sin ninguna traba. El UHP solo se puede utilizar antes de introducir la levadura de inoculantes, ya que la levadura puede metabolizar y, de esta manera, neutralizar el UHP, volviéndolo inactivo contra las bacterias. El UHP tampoco es estable en las condiciones de almacenamiento que comúnmente se encuentran en la industria del etanol.

[0011] Aunque se conocen algunos métodos, todavía se necesitan métodos mejores para tratar los microorganismos contaminantes en la industria de la fermentación, tanto para las materias primas que contienen carbohidratos como para los procesos de fermentación. Un método mejorado debe preferiblemente ser libre de antibióticos y no resultar en residuos que acumulan subproductos de fermentación o que den lugar a bacterias resistentes a los antibióticos. El método debe ser eficaz en las condiciones encontradas en la industria de fermentación.

[0012] Por consiguiente, subsiste la necesidad de encontrar nuevos métodos para controlar la concentración de microorganismos indeseables en los procesos de fermentación.

RESUMEN

[0013] En una realización de la presente invención se proporciona un método para controlar la contaminación microbiana mediante la inhibición del crecimiento de las bacterias en una solución acuosa de fermentación usada en un proceso de fermentación de azúcar. El método comprende los siguientes pasos: (a) introducir una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos en la solución acuosa de fermentación; (b) introducir un ácido en la solución acuosa de fermentación en una cantidad suficiente para proporcionar un valor de pH en un intervalo de aproximadamente 4,5 o menos; y (c) mezclar la solución acuosa de fermentación con levadura, en donde la combinación de la composición de tensioactivos y el pH proporcionan efectos antibacterianos. La composición de tensioactivos y/o el ácido se pueden añadir al azúcar fermentable o al agua del proceso antes de introducir cualquiera de los dos al recipiente de fermentación. Alternativamente, la composición de tensioactivos, el ácido y/o la levadura se pueden agregar directamente al recipiente de fermentación. La composición de tensioactivos se puede formular con nutrientes, minerales y otros ingredientes, tales como ácidos, que podrían ser beneficiosos para el funcionamiento general de un proceso de fermentación. Por consiguiente, en otra realización, la composición de tensioactivos y los componentes ácidos pueden combinarse para formar una composición única, que luego puede combinarse con el azúcar fermentable o agua del proceso, o añadirse directamente al recipiente de fermentación.

[0014] De acuerdo con otra realización de la presente invención, una solución acuosa de fermentación que comprende agua, azúcar, levadura, ácido, y una

composición antibacteriana que comprende una composición de tensioactivos, en donde la composición de tensioactivos está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo en la solución acuosa de fermentación igual a aproximadamente 5 ppm o más; y donde la solución acuosa de fermentación tiene un valor de pH en un rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1,0.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0015] De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se ha descubierto que los niveles de bacterias indeseables en un proceso de fermentación de azúcar se pueden mejorar al agregar una composición de tensioactivos a una solución acuosa de fermentación a un pH igual a aproximadamente 4,5 o menos. Ejemplos de bacterias indeseables que pueden interferir en la fermentación de azúcares incluyen bacterias Gram (+) y Gram (-), tales como *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, y *Clostridium spp.* La combinación de la composición de tensioactivos y la solución acuosa de fermentación ácida son eficaces para controlar los niveles de uno o más de las bacterias indeseables y/o los subproductos bacterianos, mientras que las levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que convierten el azúcar en etanol siguen siendo adecuadamente viables. Sin atarse a una teoría en particular, la composición de tensioactivos tiene un efecto antibacteriano en un pH ácido al aumentar la permeabilidad de la pared celular bacteriana, llevando a una reducción del pH intracelular, cambiando así el equilibrio electrolítico y matando a las bacterias. La pared celular de la levadura, que incluye quitina, es diferente a la de las bacterias y no se ve afectada por la composición de tensioactivos cuando se utiliza como se describe aquí.

[0016] El tensioactivo puede ser de un solo tipo, pero también puede ser una combinación de dos o más tensioactivos. Es común caracterizar a los tensioactivos por un valor de equilibrio hidrófilo-lipófilo, también conocido como valor de HLB. Los tensioactivos con un HLB bajo son más lipofílicos y por consiguiente tienden a hacer una emulsión de agua en aceite, mientras que aquellos con un HLB alto son más hidrófilos y tienden a hacer una emulsión de aceite en agua. Cuando se usan combinaciones de tensioactivos, el promedio ponderado de los componentes individuales del surfactante se utiliza para calcular el HLB de la combinación. Un

ejemplo de intervalo de valores de HLB para agentes tensioactivos individuales o una combinación de tensioactivos es de aproximadamente 6 a aproximadamente 50.

[0017] En una realización, la composición de tensioactivos incluye un tensioactivo aniónico, un tensioactivo catiónico, un tensioactivo anfótero, un tensioactivo no iónico, o combinaciones de los mismos. En otra realización, la composición de tensioactivos incluye un tensioactivo aniónico, un tensioactivo no iónico, o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de tensioactivos útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, alcoholes etoxilados, carbohidratos etoxilados, aceites vegetales etoxilados, polietilenglicoles (PEG), polipropilenglicoles (PPG), monoésteres y diésteres de PEG y PPG, sulfatos de alquilo (lineales o ramificados), aminas etoxiladas, ácidos grasos, ácidos grasos etoxilados, amidas grasas, dietanolamidas grasas, saponinas, tensioactivos a base de azúcar y similares.

[0018] Entre los ejemplos de tensioactivos específicos y fuentes comerciales, se encuentran alcohol oleílico 10 EO (Ethox Chemical), polisorbato 20 (Tween 20 - Uniqema), alcohol estearílico 20 EO (Ethox Chemical), aceite de ricino 80 EO (Ethox Chemical), aceite de ricino 30 EO (Ethox Chemical), polietilenglicol (PEG) 400 Dioleato (Ethox Chemical), amina de sebo 5 EO (Akzo Nobel), Burco TME-S (Burlington Chemical), dietanolamida de coco (Ethox Chemical), Ethfac 161 (Ethox Chemical), cocoamina 2 EO (Akzo Nobel), cocoamina 5 EO (Akzo Nobel), Dowanol DB (Dow Chemical), Demulse DLN 532 CE (Deforest Enterprises), Tween 80 (Uniqema), Demulse DLN 622 EG (Deforest Enterprises), Span 20 (Uniqema), Diácido 1550 (Westvaco), alcohol decílico 4 EO (Ethox Chemical), éster metílico de dipropilenglicol (Dow Chemical), alquilsulfatos lineales o ramificados, tales como Lauril Sulfato de Sodio SLS, dodecil sulfato de sodio SDS, o xilenosulfonato sódico SXS (Dow Chemical), y Tergitol NP6 (Dow Chemical).

[0019] De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, la composición de tensioactivos puede incluir, además, otros ingredientes adicionales, tales como tensioactivos aniónicos estables básicos o ácidos, secuestradores, constructores, tampones, conservantes, sales, sulfatos, ácidos grasos, alcoholes no sulfonados, materiales antiaglutinantes tales como dióxido de silicio y/o portadores de fluidos.

[0020] Tensoactivos adicionales: Opcionalmente, se pueden usar tensioactivos aniónicos estables básicos o ácidos, según lo permitido por el Código de Regulaciones Federales de Estados Unidos (CFR), Título 21, Sección 173.315. En el CFR se describen ésteres de fosfato de etileno y/o aductos de óxido de etileno/propileno de alcoholes alifáticos, dioctil sulfosuccinato, o 2-etilhexil sulfato, usualmente, pero estos materiales sufren de falta de estabilidad, ya sea en condiciones ácidas o básicas.

[0021] Secuestrador/constructor: un ácido policarboxílico orgánico, o una sal del mismo, como por ejemplo ácido cítrico, pueden ser usados como un secuestrador/constructor en una formulación ácida, o se puede usar un citrato de sodio y/o potasio en una formulación básica. El ácido cítrico, el citrato de sodio, y el citrato de potasio son artículos estándar encontrados en el mercado. También se pueden usar otros ácidos poli carboxílicos orgánicos, especialmente aquellos de tipo GRAS, tales como el ácido tartárico, málico, etc. Al formular las formulaciones básicas de la presente invención, se prefiere utilizar sal de potasio, en vez de sal de sodio, para proporcionar facilidad de formulación. También se pueden usar fosfatos complejos, aunque generalmente se evitan por consideraciones reglamentarias.

[0022] Tampón: se pueden usar tampones ácidos o básicos toxicológicamente aceptables en las presentes composiciones para mantener el pH del producto en el intervalo de ácido o base. Para mayor facilidad durante la formulación, se prefiere que dichos tampones ácidos y básicos estén en su forma de sal de potasio. El ácido cítrico es un tampón de pH ácido preferido, y en los sistemas de pH básico, el citrato de potasio es un dispersante preferido. El carbonato de potasio es un tampón de pH básico conveniente y preferido. El bicarbonato de sodio es un material altamente deseable para añadir a las composiciones de esta invención como parte del sistema de amortiguación, puesto que se encuentra fácilmente disponible como bicarbonato de sodio para las comidas y por lo tanto es relativamente barato, a la vez que proporciona una pureza altamente deseable a la composición. Las composiciones tensioactivas formuladas con una mezcla de cationes potasio y sodio en proporciones molares de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, preferiblemente de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 8:1, más preferiblemente de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 5:1 de potasio a sodio, por ejemplo, según proporcionado por las mezclas de hidróxido de potasio (hidrato) y bicarbonato de sodio, tienen propiedades reológicas deseables.

[0023] La capacidad de comportamiento pseudoplástico de las composiciones de tensioactivos que contienen mezclas de cationes de sodio y potasio puede ser importante para promover una dispensación fácil, especialmente cuando las composiciones se formulan como líquidos.

[0024] pH: El pH de las composiciones tensioactivas no está particularmente limitado excepto con respecto al mantenimiento de la estabilidad química y física de la composición de tensioactivos como tal. Sin embargo, generalmente se prefieren valores de pH no superiores a aproximadamente 12 o valores de pH no inferiores a aproximadamente 1,0.

[0025] Conservante: La estrategia de formulación de las presentes composiciones a un pH alto o bajo se basa en la tendencia reducida de crecimiento biológico de los contaminantes, tales como bacterias, hongos o moho, ya sea a un pH elevado (>9) o a un pH bajo (<5). Con un pH neutro, se requiere una mayor dependencia de los conservantes para asegurar la falta de crecimiento biológico a través de la contaminación en la fabricación o en el uso. Las composiciones de tensioactivos ácidos de la presente invención pueden contener una cantidad mínima, usualmente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,2% en peso, de un conservante toxicológicamente aceptable con el fin de evitar el crecimiento de hongos, bacterias o similares en el producto almacenado. Los conservantes de alimentos estándar, tales como sorbato de potasio/ácido sórbico y/o benzoato de sodio/ácido benzoico, o mezclas de los mismos, también son adecuados para tales propósitos. Por ejemplo, se puede usar desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,2% de ácido benzoico o de sus sales de sodio o potasio. Por lo general, las composiciones de pH básico de la presente invención no requieren un conservante, aunque se puede agregar uno si así se desea.

[0026] Portador de fluidos: De acuerdo con una realización, la composición de tensioactivos puede formularse como una formulación líquida. En formulaciones líquidas, una proporción significativa (por ejemplo de aproximadamente 50% a aproximadamente 98%, en peso) de la composición puede comprender agua como vehículo solubilizante para los ingredientes. También se pueden usar combinaciones de agua y etanol. Adicionalmente se pueden usar otros disolventes compatibles, solubles en agua, de bajo peso molecular, siempre y cuando los disolventes no afecten perjudicialmente al proceso de fermentación.

[0027] Con respecto a las materias primas de fermentación con azúcar que constituyen la solución acuosa de fermentación, se pueden usar muchas materias primas diferentes para proporcionar el azúcar para fermentar, incluyendo potencialmente cualquier almidón o material celulósico. Algunas de las materias primas comunes particularmente aptas para la producción de etanol combustible incluyen maíz, milo, sorgo, caña de azúcar, remolacha de azúcar y melaza. Algunas de las materias primas comunes para soluciones de etanol potable incluyen, pero no se limitan a frutas tales como bayas, uvas, peras, melocotones o manzanas; maíz, granos; papas; agave; o similares. En una realización, las materias primas de fermentación con azúcar se derivan de la caña de azúcar. En otra realización, las materias primas de fermentación con azúcar se derivan del maíz. En otra realización más, la materia prima de fermentación que contiene azúcar se deriva de fruta, maíz, granos, papas, agave o combinaciones de los mismos.

[0028] En una realización del método de la invención, se introduce la combinación de tensioactivos en la solución de fermentación acuosa en un proceso de fermentación para la producción de etanol. Para mayor conveniencia, se puede añadir la composición de tensioactivos como un líquido, con adición por lotes, por semi lotes o adición continua. Por consiguiente, se puede combinar una formulación sólida o en polvo con un medio dispersante líquido adecuado, como por ejemplo agua, antes de combinarla con la solución acuosa de fermentación.

[0029] De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la fermentación del azúcar se lleva a cabo como una fermentación acuosa ácida del azúcar. En una realización, la fermentación acuosa ácida del azúcar se lleva a cabo con el pH de la solución acuosa de fermentación en un valor de aproximadamente 4,5 o menos. Por ejemplo, el pH de la solución acuosa de fermentación puede ser de aproximadamente 4,0 o menos, o de aproximadamente 3,5 o menos, o de aproximadamente 3,0 o menos, de aproximadamente 2,5 o menos, o desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,5 o desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,5, o desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,5. Por consiguiente, en realizaciones en las que la composición de tensioactivos no contiene una cantidad suficiente de ácido para proporcionar el pH deseado para la solución acuosa de fermentación, se puede agregar un ácido en una cantidad suficiente para lograr el valor de pH deseado. Los ácidos no limitantes adecuados para la acidificación de la solución acuosa de fermentación incluyen ácido sulfúrico,

sulfato de hidrógeno, ácido levulínico, ácido caprílico, ácido caproico, ácido cítrico, eugenol, ácido adípico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido succínico, ácido málico y ácido sórbico, ácido acético, y combinaciones de los mismos. En una realización, el ácido incluye ácido sulfúrico. En otra realización, el ácido incluye ácido cítrico.

[0030] En una realización, se añade la combinación de la composición de tensioactivos y el ácido a la solución acuosa de fermentación antes de la inoculación con la levadura. También se puede añadir la combinación de la composición de tensioactivos y el ácido al medio de fermentación durante el primer tercio del ciclo de fermentación. Como se usa aquí, el término "primer tercio del ciclo de fermentación" se refiere al primer 1/3 del tiempo total de fermentación. En otra realización, la combinación de la composición de tensioactivos y el ácido se añade al medio de fermentación durante el segundo tercio del ciclo de fermentación, o la combinación de la composición de tensioactivos y el ácido se añade al medio de fermentación durante el tercio final del ciclo de fermentación. Como se usa aquí, el término "segundo tercio del ciclo de fermentación" se refiere al 1/3 de la mitad del tiempo total de fermentación, y el término "tercio final del ciclo de fermentación" se refiere al último 1/3 del tiempo total de fermentación. En algunas realizaciones, la combinación de la composición de tensioactivos y el ácido se pueden añadir al medio de fermentación en dos o más incrementos durante el ciclo de fermentación. La duración del ciclo de fermentación puede variar dependiendo de múltiples factores, tales como el equipo de fermentación, la cepa de levadura, la temperatura, la concentración de azúcar, la concentración de etanol, etc. En una realización no limitante, el ciclo de fermentación es de 12 horas en un recipiente de fermentación de 600,000 litros a 1,000,000 a una temperatura de 32 °C – 36 °C a una concentración inicial de levadura de aproximadamente 10% del volumen final del tanque de fermentación, y el mosto compuesto por agua y azúcares fermentables tales como los azúcares en jugo de caña de azúcar y/o melaza.

[0031] La contaminación bacteriana parece reducir la productividad del proceso de fermentación del azúcar, al reducir el crecimiento de la levadura, la viabilidad y la capacidad de fermentación. De esta manera, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la composición de tensioactivos está presente en la solución acuosa de fermentación, con un valor de pH en el rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1,0, en una cantidad eficaz para disminuir el recuento de

bacterias y/o la producción de uno o más productos de bacterias de referencia. Las bacterias productoras de ácido láctico (LAB) son muy abundantes en el proceso del bioetanol posiblemente debido a su tolerancia al etanol, el pH bajo y las altas temperaturas. Los ácidos lácticos y acéticos producidos por las LAB pueden interferir en el metabolismo de la levadura, lo que es perjudicial para el proceso de fermentación del azúcar. Por ejemplo, el ácido láctico es conocido por afectar de manera prejudicial la conversión de la levadura de azúcar en etanol.

[0032] Por consiguiente, en un aspecto, las realizaciones de la presente invención pueden reducir el conteo de bacterias a lo largo de un ciclo de fermentación de doce (12) horas por un factor de 10 o más, comparado con un único ciclo de fermentación de doce (12) horas de la solución acuosa de fermentación a un pH igual a aproximadamente 2 (acidificado con ácido sulfúrico) y libre de la composición de tensioactivos. De acuerdo con otro aspecto, la formación del ácido láctico se puede reducir en un 50% o más, con respecto a un único ciclo de fermentación de doce (12) horas de la solución acuosa de fermentación a un pH igual a aproximadamente 2 (acidificado con ácido sulfúrico) y desprovisto de la composición de tensioactivos.

[0033] Como se señaló anteriormente, la composición de tensioactivos puede ser una formulación sólida o líquida que tiene una pluralidad de componentes. Por consiguiente, el contenido de tensioactivo(s) de la composición de tensioactivos puede variar dependiendo de la formulación específica. Sin embargo, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se añade la composición de tensioactivos a la solución acuosa de fermentación en una cantidad para proporcionar una concentración tensioactiva efectiva, combinada con el pH de aproximadamente 4,5 o menos, para proporcionar efectos antibacteriales. En una realización, la composición de tensioactivos añadida a la solución acuosa de fermentación en una cantidad para proporcionar una concentración tensioactiva igual a aproximadamente 5 ppm o más, en peso. En otra realización, se añade la composición de tensioactivos a la solución acuosa de fermentación en una cantidad para proporcionar una concentración tensioactiva igual a aproximadamente 10 ppm o más, en peso. Por ejemplo, la concentración tensioactiva puede ser de aproximadamente 20 ppm o más, de aproximadamente 30 ppm o más, de aproximadamente 40 ppm o más, de aproximadamente 50 ppm o más, de aproximadamente 75 ppm o más, de aproximadamente 100 ppm, de

aproximadamente 150 ppm, de aproximadamente 200 ppm, de aproximadamente 250 ppm, de aproximadamente 300 ppm, de aproximadamente 350 ppm, de aproximadamente 400 ppm, de aproximadamente 450 ppm, o de aproximadamente 500 ppm o más. En otro ejemplo más, se puede añadir la composición de tensioactivos a la solución acuosa de fermentación en una cantidad para proporcionar una concentración tensioactiva igual a de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 500 ppm en peso, o de aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 350 ppm en peso, o de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 150 ppm en peso.

[0034] El término “cantidad efectiva” y “cantidad antibacterialmente efectiva” con respecto a la composición de tensioactivos, incluye una cantidad capaz de realizar la función o que tiene la propiedad o resultado deseado. Una cantidad efectiva o una cantidad antibacterialmente efectiva sería, por ejemplo, una cantidad que dé como resultado una disminución significativa en la concentración de bacterias en comparación con donde no se emplea ninguna composición de tensioactivos. Una cantidad eficaz o una cantidad antibacterialmente efectiva también será relativamente no tóxica para la levadura, pero proporcionará beneficios antibacterianos. Una realización de una cantidad efectiva o una cantidad antibacterialmente efectiva es una cantidad suficiente para suprimir la contaminación bacteriana al mismo tiempo que se mantiene un nivel aceptable de viabilidad de la levadura, tal como una viabilidad de la levadura de al menos el 50 %. En una realización, una cantidad efectiva o una cantidad antibacterialmente efectiva proporciona una concentración de un tensioactivo o tensioactivos (“tensioactivo”) de la composición de tensioactivos en la solución acuosa de fermentación igual a aproximadamente 5 ppm o más. Por consiguiente, una cantidad efectiva de la composición de tensioactivos a un valor de pH específico en el rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1,0 puede ser determinada por una persona normalmente versada en la materia mediante experimentación de rutina.

[0035] En otra realización, la composición de tensioactivos está presente en una cantidad efectiva en la solución de fermentación ácida que tiene un valor de pH en un rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1,0 para proporcionar efectos antibacterianos, en donde la solución acuosa de fermentación ácida está sustancialmente libre de cualquier agente antibiótico añadido, cualquier compuesto

de guanidina añadido, y/o cualquier oxidante añadido seleccionado entre dióxido de cloro, dióxido de cloro estabilizado o compuestos de peróxido. En otra realización, la solución acuosa de fermentación ácida está sustancialmente libre de cualquier compuesto de terpeno o terpenoide.

[0036] También se contemplan las siguientes realizaciones:

[0037] 1. Un método para controlar la contaminación bacteriana mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en una solución acuosa de fermentación usada en un proceso de fermentación de azúcares, método que comprende los pasos de:

(a) introducir una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos en la solución acuosa de fermentación;

(b) introducir un ácido en la solución acuosa de fermentación en una cantidad suficiente para proporcionar un valor de pH en un intervalo de aproximadamente 4,5 o menos; y

(c) mezclar la solución acuosa de fermentación con levadura, en donde la combinación de la composición de tensioactivos y el pH proporcionan efectos antibacterianos.

[0038] 2. El método de la cláusula 1, en donde dichas etapas se llevan a cabo secuencialmente.

[0039] 3. El método de la cláusula 1 o 2, en donde el ácido es seleccionado del grupo que consiste en ácido sulfúrico, sulfato de hidrógeno, ácido levulínico, ácido caprílico, ácido caproico, ácido cítrico, ácido adípico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido succínico, ácido málico, ácido sórbico, ácido acético, y combinaciones de los mismos.

[0040] 4. El método de una de las cláusulas 1 a 3, en donde el valor de pH está en el rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1,0.

[0041] 5. El método de una de las cláusulas 1 a 4, en donde el valor de pH está en el rango de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 1,0.

[0042] 6. El método de una de las cláusulas 1 a 5, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 5 ppm o más.

[0043] 7. El método de una de las cláusulas 1 a 6, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 25 ppm o más.

[0044] 8. El método de una de las cláusulas 1 a 7, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 50 ppm o más.

[0045] 9. El método de una de las cláusulas 1 a 8, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 75 ppm o más.

[0046] 10. El método de una de las cláusulas 1 a 9, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo en un rango de a aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 350 ppm.

[0047] 11. El método de una de las cláusulas 1 a 10, en donde la composición de tensioactivos comprende un tensioactivo no iónico, un tensioactivo aniónico, o una combinación de los mismos.

[0048] 12. El método de una de las cláusulas 1 a 11, en donde la composición de tensioactivos comprende un tensioactivo seleccionado de un grupo que consiste en alcoholes etoxilados, carbohidratos etoxilados, aceites vegetales etoxilados, polietilenglicoles (PEG), polipropilenglicoles (PPG), monoésteres y diésteres de PEG y PPG, sulfatos de alquilo lineales o ramificados, aminas etoxiladas, organosulfatos, ácidos grasos, ácidos grasos etoxilados, amidas grasas, dietanolamidas grasas, saponina, tensioactivos a base de azúcar y combinaciones de los mismos.

[0049] 13. El método de la cláusula 11, en donde la composición de tensioactivos comprende, además, uno o más compuestos ácidos.

[0050] 14. El método de una de las cláusulas 1 a 13, en la que un nivel de concentración bacteriana indeseable en la solución acuosa de fermentación después de un ciclo de fermentación de doce horas se reduce en al menos un factor de 10, con respecto a un único ciclo de fermentación de doce horas de la solución acuosa de fermentación a un pH igual a aproximadamente 2 acidificado con ácido sulfúrico y sin la composición de tensioactivos.

[0051] 15. El método de una de las cláusulas 1 a 14, en la que un nivel de concentración de subproductos bacterianos indeseable en la solución acuosa de fermentación después de un ciclo de fermentación de doce horas se reduce en un 50% o más, con respecto a un único ciclo de fermentación de doce horas de la

solución acuosa de fermentación a un pH igual a aproximadamente 1,0 acidificado con ácido sulfúrico y sin la composición de tensioactivos.

[0052] 16. Una solución acuosa de fermentación que comprende agua, azúcar, levadura, ácido, y una composición antibacteriana que comprende una composición de tensioactivos, en donde la composición de tensioactivos está presente en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo en igual a aproximadamente 5 ppm o más; y donde la solución acuosa de fermentación tiene un valor de pH en un rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1,0.

[0053] 17. Un método para controlar la contaminación bacteriana mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en una fermentación acuosa ácida del azúcar que comprende mezclar una solución acuosa de fermentación con levadura, en donde dicha solución acuosa de fermentación comprende una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos.

[0054] 18. Un método para controlar la contaminación bacteriana mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en una fermentación acuosa ácida del azúcar que comprende mezclar una solución acuosa de fermentación con una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos, en donde dicha solución acuosa de fermentación comprende levadura.

[0055] 19. Un método para controlar la contaminación bacteriana mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en una fermentación acuosa ácida del azúcar que comprende mezclar una solución acuosa de fermentación con una mezcla que comprende una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos y levadura.

[0056] 20. Un método para controlar la contaminación bacteriana mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en una fermentación acuosa ácida del azúcar que comprende mezclar una solución acuosa de fermentación, una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos y levadura.

[0057] 21. Un método para controlar la contaminación bacteriana mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en una fermentación acuosa del azúcar que comprende ajustar el pH de una solución acuosa de fermentación a aproximadamente 4,5 o menos, en donde dicha solución acuosa de fermentación comprende una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos y levadura.

[0058] 22. Un método para controlar la contaminación bacteriana mediante la inhibición del crecimiento bacteriano en una fermentación acuosa del azúcar que comprende fermentar una mezcla que comprende una solución acuosa de fermentación, levadura y una cantidad efectiva de una composición de tensioactivos a un pH de aproximadamente 4,5 o menos.

[0059] 23. Una solución acuosa ácida de fermentación compuesta de agua, azúcar, levadura y una composición de tensioactivos, en donde la composición de tensioactivos está presente en una cantidad antibacterialmente eficaz.

[0060] 24. Una solución acuosa ácida de fermentación compuesta de agua, azúcar, levadura y una composición de tensioactivos, en donde la composición de tensioactivos está presente en una cantidad suficiente para presente en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de tensioactivo de aproximadamente 5 ppm o más.

[0061] 25. El método de una de las cláusulas 17 a 22, en donde el pH de la solución acuosa de fermentación se ajusta a un pH deseado con un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido sulfúrico, sulfato de hidrógeno, ácido levulínico, ácido caprílico, ácido caproico, ácido cítrico, ácido adípico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido succínico, ácido málico, ácido sórbico, ácido acético, y combinaciones de los mismos.

[0062] 26. El método de una de las cláusulas 17 a 22, en donde la solución acuosa de fermentación tiene un valor de pH en un rango de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1,0.

[0063] 27. El método de una de las cláusulas 17 a 22, en donde la solución acuosa de fermentación tiene un valor de pH en un rango de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 1,0.

[0064] 28. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26 o 27, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 5 ppm o más.

[0065] 29. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26 o 27, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 25 ppm o más.

[0066] 30. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26 o 27, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 50 ppm o más.

[0067] 31. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26 o 27, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo igual a aproximadamente 75 ppm o más.

[0068] 32. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26 o 27, en donde se añade la composición de tensioactivos en una cantidad suficiente para proporcionar una concentración de un tensioactivo en un rango de a aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 350 ppm.

[0069] 33. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, o 32, en donde la composición de tensioactivos comprende un tensioactivo no iónico, un tensioactivo aniónico, o una combinación de los mismos.

[0070] 34. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, o 33, en donde la composición de tensioactivos comprende un tensioactivo seleccionado de un grupo que consiste en alcoholes etoxilados, carbohidratos etoxilados, aceites vegetales etoxilados, polietilenglicoles (PEG), polipropilenglicoles (PPG), monoésteres y diésteres de PEG y PPG, sulfatos de alquilo lineales o ramificados, aminas etoxiladas, organosulfatos, ácidos grasos, ácidos grasos etoxilados, amidas grasas, dietanolamidas grasas, saponina, tensioactivos a base de azúcar y combinaciones de los mismos.

[0071] 35. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, o 34, en la que un nivel de concentración bacteriana indeseable en la solución acuosa de fermentación después de un ciclo de fermentación de doce horas se reduce en al menos un factor de 10, con respecto a un único ciclo de fermentación de doce horas de la solución acuosa de fermentación a un pH igual a aproximadamente 2 acidificado con ácido sulfúrico y sin la composición de tensioactivos.

[0072] 36. El método de una de las cláusulas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35, en la que un nivel de concentración de subproductos bacterianos indeseable en la solución acuosa de fermentación después de un ciclo de fermentación de doce horas se reduce en al menos un 50 %

o más, con respecto a un único ciclo de fermentación de doce horas de la solución acuosa de fermentación a un pH igual a aproximadamente 1,0 acidificado con ácido sulfúrico y sin la composición de tensioactivos.

[0073] Los siguientes ejemplos describen realizaciones de la invención. Otras realizaciones en el ámbito de las reivindicaciones del presente documento serán evidentes para un experto en arte al considerar las especificaciones o la práctica de la invención divulgada en el presente documento. Lo que se pretende es que las especificaciones, junto con los ejemplos, se consideren únicamente a modo de ejemplo, en donde las reivindicaciones indiquen el alcance y el espíritu de la invención, que siguen los ejemplos.

[0074] EJEMPLO 1

[0075] Experimental

[0076] Método para determinar el recuento de bacterias: La metodología empleó los colorantes azul de metileno y nilo, que distinguen las células vivas de las células muertas. Las células muertas se tiñen de un color azul mientras que las células vivas permanecen sin color. El resultado en las células/mL se obtiene por: Células contadas/campos contados * factor de microscopio * 1/volumen de la muestra * factor de dilución.

[0077] Método para determinar el ácido láctico (y unidades): Las concentraciones de lactato se determinaron mediante un método cromatográfico, utilizando una columna de intercambio iónico con una solución de KOH como eluyente y un detector de conductividad. Los valores obtenidos son en mg/L.

[0078] Método para el cálculo de la viabilidad de la levadura: La viabilidad de la levadura puede determinarse mediante dos métodos. El primer método es una microscopía convencional, en donde las células se tiñen con el tinte eritrosina y se cuentan. Las células muertas se tiñen de un rosa mientras que las células vivas permanecen sin color. El resultado en % se obtiene dividiendo el número de células vivas por la suma del número de células vivas y células muertas, multiplicado por 100. El segundo método es el conteo de placas. Las alícuotas del medio fermentado, tomadas simultáneamente a las muestras utilizadas para el método de conteo, se diluyen en serie, y se sembró un volumen apropiado en medio de extracto de levadura peptona dextrosa (YEPD) que contiene 1,5 % de agar e incubado a 30 °C por 3 días o hasta la aparición de colonias que pudieran ser contadas visualmente. El medio de YEPD contenía extracto de levadura (1 %),

peptona (1 %) y dextrosa (2 %) a un pH de aproximadamente 6,0. Los resultados se expresaron en CFU/mL (unidades formadoras de colonias por mL de caldo de fermentación).

[0079] Las tablas 1 a 5 contienen resultados de un estudio de desarrollo realizado para evaluar el impacto del valor de pHs, la concentración antimicrobiana, y la fuente de ácido en el proceso de fermentación de etanol a escala de laboratorio. Se usó la misma fuente de melaza (para el proceso de fermentación) y cepas de *Lactobacillus* (para inoculación). Se evaluó el artículo de ensayo considerando diferentes combinaciones de 3 dosis, 3 valores de pH y 2 fuentes de ácidos con el fin de comprender el impacto de estos parámetros en el proceso de fermentación de etanol. Este fue un estudio ciego de desarrollo de productos. Se usó un diseño de medidas repetidas para evaluar un artículo de ensayo con dos replicaciones de punto central por fuente de ácido por semana, dos repeticiones de control negativo por semana, y diferentes combinaciones de dosis extremas y pH con ácidos sulfúrico y cítrico. Se usaron cinco (5) ciclos de fermentación para verificar la consistencia de los parámetros de fermentación, incluyendo la capacidad antimicrobiana de los tratamientos. Este experimento se llevó a cabo en 5 ciclos de fermentación, simulando las condiciones impuestas por la fermentación industrial. El primer ciclo de fermentación empezó con la adición de aproximadamente 10^8 células de bacterias/mL y no se permitió la recontaminación de bacterias (se utilizó sustrato esterilizado). Para simular el proceso de fermentación, el artículo de ensayo se añadió en un “mash” de pequeño volumen en donde las bacterias y la levadura se encontraban en una concentración muy alta (concentración de levadura de 30-35 %). Se añadió ácido para alcanzar el nivel de pH deseado. En esta etapa, el volumen total en la cuba era de 12 mL, la mitad de la cual estaba compuesta de agua y el artículo de ensayo. Se añadió el artículo de ensayo a la cuba de fermentación en un volumen preestablecido para alcanzar la concentración final en 40 mL. Con el fin de simular el proceso industrial de fermentación del etanol, la metodología utilizada para este ensayo siguió condiciones específicas: 1- Simulación de fermentación por lotes alimentados, observando el tiempo de alimentación y la fermentación; 2- Simulación de una concentración en la centrifugadora de aproximadamente 60 – 70 % de levadura y desangrado de aproximadamente 1 - 5% de la levadura (mezclado con bacterias); 3- Separación de la levadura al final de la fermentación con una fuerza centrífuga igual a la impuesta

en el proceso industrial (800 xg); 4- Simulación de las condiciones de fermentación de reciclaje (usualmente cinco ciclos permiten que la fermentación muestre la efectividad de un agente antimicrobiano); 5- Uso de un sustrato industrial (basado en la melaza) con contenido de azúcares reductores totales (TRS) que produce alrededor de 8 a 9% de etanol al final de la fermentación; 6- Uso de una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* que normalmente se encuentra en el mosto; 7- Contaminación de la fermentación con un mínimo de 5 cepas de *Lactobacillus* (homo y heterofermentativas) aisladas recientemente que pueden simular un desafío de contaminación industrial. El medio que contiene un sustrato industrial estéril (melaza) y un sustrato de azúcares reductores totales (TRS) se introdujo en la cuba de fermentación dando como resultado un medio con 8 a 9% de etanol al final de la fermentación. Se contaminó artificialmente a la fermentación con un mínimo de 5 cepas de *Lactobacillus* (homo y hetero fermentativas) aisladas recientemente, que simulaban un reto de contaminación industrial.

Preparación de levadura:

- 1- Reactivación de la deformación industrial PE-2 (mantenida bajo refrigeración ultra-congeladora a -80 °C) mediante cultivo en 5 ml de medio YEPD durante 48 horas a 30 °C.
- 2- El medio con levadura se diluyó en melaza de caña de azúcar (estéril) que contenía 10% de TRS (definido como medio de melaza) y el crecimiento se mantuvo durante 48 horas a 30 °C.
- 3- Se añadió medio de melaza que contenía 10% de TRS (duplicando el volumen de suspensión de levadura cada 24-48 horas) para obtener la biomasa necesaria para el ensayo (aproximadamente 50 g de levadura fresca), que se recogió por centrifugación a 800 xg.

Preparación de las bacterias:

- 1- Se añadieron al menos cinco cepas de *Lactobacillus* (recientemente aislado de varias destilerías y almacenado en -80 °C) que comprenden ambos tipos de metabolismo (homo y heterofermentativo) en 3 ml de medio MRS y se cultivaron a 32 °C por 48 horas.
- 2- Se añadió el medio MRS con los Lactobacilos a un medio de melaza de 100 ml con 3 % de TRS e incubado a 32 °C por 48 horas para generar biomasa aclimatada a un medio de melaza en una cantidad suficiente para permitir una contaminación bacteriana de aproximadamente 10^8 células/mL.

Preparación de la levadura contaminada con bacterias: se contaminó la biomasa de levadura con bacterias (a nivel de 10^8 bastones por ml) y se sometió a dos ciclos de fermentación para una estabilización previa de la contaminación (adaptación bacteriana al medio de fermentación).

Conducción de fermentaciones con reciclado celular: la fermentación se llevó a cabo para simular las condiciones del proceso industrial por

lotes alimentados con reciclado de células. La suspensión de levadura (30 - 35% de concentración de levadura) se preparó y se trató con ácido y el artículo de ensayo durante 1 hora. Esta levadura tratada fue alimentada gradualmente con sustrato (por un periodo de 4 horas) para obtener una concentración final de etanol de entre 8 y 9%. La velocidad de fermentación se calculó en pérdida de peso (evolución de dióxido de carbono). Al final de la fermentación, la levadura se separó por centrifugación (800 xg por 15 minutos), se pesó y reutilizó en una fermentación posterior, que consiste en 5 ciclos de fermentación.

[0080] TABLA 1: Datos de los Experimentos del Primer Ciclo de Fermentación.

	Fuente del ácido	pH	Dosis (ppm)	Primer ciclo				
				Recuento de bacterias (células/mL).	L	Ácido láctico (mg/L)	Levadura viab (%)	Levaduras CFU/mL
1-1	sulfúrico	3,3	325	1,86E+07	5,10E+07	1,939	70,3%	2,23E+08
1-2	cítrico	2	500	4,09E+06	6,67E+06	1,379	50,2%	2,00E+08
1-3	sulfúrico	4,5	150	1,72E+08	6,10E+08	4,512	90,40%	2,80E+08
1-4	sulfúrico	2	0	2,22E+08	6,63E+08	5,626	96,0%	2,83E+08
1-5	cítrico	3,3	325	4,64E+07	7,67E+07	2,185	72,0%	1,70E+08
1-6	cítrico	4,5	150	2,76E+08	7,03E+08	4,534	94,4%	3,00E+08
1-7	sulfúrico	2	150	5,41E+07	1,40E+08	2,171	89,5%	2,67E+08
1-8	sulfúrico	2	500	1,27E+07	2,53E+07	1,640	53,7%	2,20E+08
1-9	cítrico	3,3	325	1,09E+07	3,53E+07	1,962	68,4%	2,33E+08
1-10	sulfúrico	2	0	2,24E+08	8,07E+07	5,589	93,4%	2,97E+08
1-11	cítrico	4,5	500	1,36E+07	2,67E+07	1,868	61,4%	1,90E+08
1-12	sulfúrico	4,5	500	1,13E+07	4,30E+07	2,180	57,1%	1,97E+08
1-13	sulfúrico	3,3	325	2,50E+07	6,60E+07	2,173	74,8%	2,07E+08
1-14	cítrico	2	150	1,72E+07	2,67E+06	1,188	83,9%	3,00E+08

[0081] Discusión de la Tabla 1 – Después de completar el primer ciclo, se observó una disminución en el conteo de bacterias (células/mL y CFU/mL) y la viabilidad de las células de levadura (%) en el nivel de dosis de 325 y 500 ppm. Los otros parámetros no fueron afectados por el tratamiento.

[0082] TABLA 2: Datos de los Experimentos del Segundo Ciclo de Fermentación.

2º ciclo							
	Fuente del ácido	pH	Dosis (ppm)	Recuento de bacterias (células/mL).	Ácido láctico (mg/L)	Levadura viab (%)	Levaduras CFU/mL
1-1	sulfúrico	3,3	325	1,18E+07	407	72,5%	2,67E+08
1-2	cítrico	2	500	2,27E+06	315	51,8%	1,83E+08
1-3	sulfúrico	4,5	150	2,09E+07	2,565	90,7%	2,40E+08
1-4	sulfúrico	2	0	1,25E+08	3,268	97,7%	2,97E+07
1-5	cítrico	3,3	325	5,00E+06	481	75,8%	2,28E+08
1-6	cítrico	4,5	150	5,96E+07	2,711	89,6%	3,17E+08
1-7	sulfúrico	2	150	1,24E+07	494	85,7%	2,93E+08
1-8	sulfúrico	2	500	8,64E+06	334	56,0%	1,90E+08
1-9	cítrico	3,3	325	6,37E+06	448	66,6%	2,27E+08
1-10	sulfúrico	2	0	2,77E+08	3,341	94,0%	3,07E+08
1-11	cítrico	4,5	500	5,00E+06	416	49,2%	1,93E+07
1-12	sulfúrico	4,5	500	4,09E+06	449	48,7%	1,93E+08
1-13	sulfúrico	3,3	325	7,28E+06	514	72,5%	2,10E+08
1-14	cítrico	2	150	1,41E+07	282	86,3%	2,67E+08

[0083] Discusión de la Tabla 2 - Después de completar el segundo ciclo, la disminución en la viabilidad de las células de levadura (%) a una dosis de 325 y 500 ppm continuó. También se observó una disminución en el conteo de células de bacterias (células/mL) y ácido láctico (mg/L) a una dosis de 150, 325 y 500 ppm. Los otros parámetros no fueron afectados por el tratamiento.

[0084] TABLA 3: Datos de los Experimentos del Tercer Ciclo de Fermentación.

3er ciclo								
	Fuente del ácido	pH	Dosis (ppm)	Recuento de bacterias (células/mL).	Bacterias CFU/mL	Ácido láctico (mg/L)	Levadura viab (%)	Levaduras UFC (CFU/mL)
1-1	sulfúrico	3,3	325	9,55E+06	<0,33+06	316	65,1%	2,27E+08
1-2	cítrico	2	500	2,73E+06	6,70E+05	367	46,0%	9,30E+07
1-3	sulfúrico	4,5	150	1,13E+07	1,00E+08	1,680	87,0%	2,53E+08
1-4	sulfúrico	2	0	1,63E+08	7,00E+08	2,962	96,1%	2,33E+08
1-5	cítrico	3,3	325	3,64E+06	<0,33+06	322	68,4%	2,47E+08
1-6	cítrico	4,5	150	2,04E+07	6,43E+07	1,621	86,4%	2,40E+08

1-7	sulfúrico	2	150	5,91E+06	<0,33+06	312	83,6%	2,47E+08
1-8	sulfúrico	2	500	4,09E+06	<0,33+06	292	44,9%	1,17E+08
1-9	cítrico	3,3	325	5,91E+06	<0,33+06	297	56,3%	1,67E+08
1-10	sulfúrico	2	0	2,63E+08	6,97E+08	3,634	95,1%	2,70E+08
1-11	cítrico	4,5	500	1,13E+07	<0,33+06	359	32,4%	1,70E+08
1-12	sulfúrico	4,5	500	4,55E+06	<0,33+06	331	37,8%	1,77E+08
1-13	sulfúrico	3,3	325	5,46E+06	<0,33+06	353	60,3%	2,03E+08
1-14	cítrico	2	150	1,04E+06	<0,33+06	261	76,0%	2,07E+08

[0085] Discusión de la Tabla 3 - Después de completar el tercer ciclo, se observó la disminución en la viabilidad de las células de levadura (%) a una dosis de 325 y 500 ppm, y la disminución en el conteo de células de bacterias (células/mL) y ácido láctico (mg/L) a una dosis de 150, 325 y 500 ppm. Los otros parámetros no fueron afectados por el tratamiento.

[0086] TABLA 4: Datos de los Experimentos del Cuarto Ciclo de Fermentación.

4° ciclo							
	Fuente del ácido	pH	Dosis (ppm)	Recuento de bacterias (células/mL).	Ácido láctico (mg/L)	Levadura viab (%)	Levaduras UFC (CFU/mL)
1-1	sulfúrico	3,3	325	7,73E+06	273	58,8%	1,73E+08
1-2	cítrico	2	500	1,82E+06	335	40,6%	1,10E+08
1-3	sulfúrico	4,5	150	9,55E+06	858	84,2%	2,63E+08
1-4	sulfúrico	2	0	2,07E+08	2,681	95,4%	2,27E+08
1-5	cítrico	3,3	325	2,73E+06	295	56,9%	1,93E+08
1-6	cítrico	4,5	150	1,72E+07	860	78,0%	2,13E+08
1-7	sulfúrico	2	150	4,09E+06	290	84,0%	2,83E+08
1-8	sulfúrico	2	500	5,46E+06	290	29,0%	1,10E+08
1-9	cítrico	3,3	325	1,36E+06	251	47,0%	1,63E+08
1-10	sulfúrico	2	0	2,88E+08	3,364	93,4%	3,00E+08
1-11	cítrico	4,5	500	7,28E+06	314	21,5%	8,70E+07
1-12	sulfúrico	4,5	500	4,09E+06	290	30,6%	1,13E+08
1-13	sulfúrico	3,3	325	5,91E+06	263	52,3%	1,83E+08
1-14	cítrico	2	150	8,19E+06	240	83,9%	2,60E+08

[0087] Discusión de la Tabla 4 - Después de completar el cuarto ciclo, la dosis de 325 y 500 ppm siguió causando la disminución en la viabilidad de las células de levadura (%). La dosis de 150, 325 y 500 ppm siguió disminuyendo el conteo de células de bacterias (células/mL) y ácido láctico (mg/L). Los otros parámetros no fueron afectados por el tratamiento.

[0088] TABLA 5: Datos de los Experimentos del Quinto Ciclo de Fermentación.

	Fuente del ácido	pH	Dosis (ppm)	5° ciclo				
				Recuento de bacterias (células/mL).	Bacterias CFU/mL	Ácido láctico (mg/L)	Levadura viab (%)	Levaduras UFC (CFU/mL)
1-1	sulfúrico	3,3	325	3,18E+06	<0,33E+06	233	50,4%	2,00E+08
1-2	cítrico	2	500	1,36E+06	1,00E+06	346	37,6%	1,00E+08
1-3	sulfúrico	4,5	150	9,10E+06	1,30E+07	526	89,4%	2,50E+07
1-4	sulfúrico	2	0	1,33E+08	6.25E+08	2,320	92,5%	2,60E+08
1-5	cítrico	3,3	325	2,27E+06	<0,33+06	289	49,0%	1,43E+08
1-6	cítrico	4,5	150	1,04E+07	4,30E+05	399	82,0%	2,10E+08
1-7	sulfúrico	2	150	3,18E+06	<0,33+06	219	82,6%	2,83E+08
1-8	sulfúrico	2	500	5,00E+06	6,70E+05	247	29,9%	1,00E+08
1-9	cítrico	3,3	325	4,55E+05	<0,33+06	215	47,0%	1,50E+08
1-10	sulfúrico	2	0	1,85E+08	7,00E+08	3,290	95,0%	2,85E+08
1-11	cítrico	4,5	500	4,55E+06	1,00E+06	291	22,1%	1,03E+08
1-12	sulfúrico	4,5	500	3,64E+06	<0,33+06	287	24,4%	1,00E+08
1-13	sulfúrico	3,3	325	5,00E+06	<0,33+06	257	41,1%	1,55E+08
1-14	cítrico	2	150	5,00E+06	<0,33+06	199	70,0%	1,97E+08

[0089] Discusión de la Tabla 5 - Después de completar el quinto y último ciclo, la dosis de 325 y 500 ppm causó la disminución en la viabilidad de las células de levadura (%). La dosis de 150, 325 y 500 ppm disminuyó los conteos de células de

bacterias (células/mL) y ácido láctico (mg/L). Los otros parámetros no fueron afectados por el tratamiento. Como conclusión general, los mejores resultados de contaminación bacteriana y viabilidad de la levadura se observaron usando una dosis de 150 ppm con ácido sulfúrico y pH bajo pH ($p < 0,05$).

[0090] Tabla 6. Control bacteriano como función de la dosis.

Tratamiento	Dosis	Recuento de bacterias
Control	N/A	4.96×10^7
Dosis de Prueba 1	50 ppm	1.58×10^7
Dosis de Prueba 2	100 ppm	2.99×10^6
Dosis de Prueba 3	150 ppm	4.55×10^5

[0091] Discusión de la Tabla 6 – El recuento de bacterias en caldo disminuyó de una manera dependiente de la dosis ante presencia del artículo de ensayo de 50 ppm a 150 ppm.

[0092] EJEMPLO 2

Se evaluó la eficacia antibacteriana del artículo de ensayo en una planta piloto con dos cubas de fermentación de capacidad de 2000L. El sistema piloto incluía un sistema completo de control de temperatura de fermentación que consiste en un enfriador y un intercambiador de calor de placas múltiples, centrifugadora continua exclusiva para reciclaje de biomasa, y tanques para almacenamiento y suministro de “mash” para el proceso de fermentación. El “mash” de prueba incluía jarabe, miel y agua, proporcionada por una planta, que proporcionó al sistema piloto las condiciones reales de procesamiento para los ensayos de fermentación. Para la fermentación se usó la levadura FERMELO® (disponible en Fermentec), cepa de levadura comúnmente utilizada para la producción comercial de etanol. Se probó el artículo de ensayo a una dosis de 150 ppm y se comparó con los resultados obtenidos con Kamoran® (disponible en Elanco), un producto antibacteriano de referencia usado en la cuba de control, a una dosis de 3 ppm.

[0093] Tabla 7 – Conteo de bastones en el ensayo a escala piloto

Contaminación (bastones/mL).		
Ciclo de fermentación	KAMORAN® – 3 ppm	Artículo de prueba - 150
1er ciclo	$8,50 \times 10^7$	$6,50 \times 10^7$
2° ciclo	$1,00 \times 10^5$	$1,10 \times 10^7$
3er ciclo	$1,00 \times 10^5$	$2,50 \times 10^6$
4° ciclo	$1,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$
5° ciclo	$1,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$
6° ciclo	$2,50 \times 10^6$	$2,10 \times 10^5$

7° ciclo	1,00E+05	1,00E+05
8° ciclo	1,00E+05	1,00E+04
9° ciclo	4,10E+05	4,10E+05
10° ciclo	8,20E+05	2,10E+05
Promedio	8,93E+06	7,96E+06

Discusión de la Tabla 7 – La Tabla 7 demuestra que una única dosis de 150 ppm del artículo de ensayo resultó en una reducción importante en el conteo de células bacterianas que, después de tres ciclo, era comparable a las reducciones observadas con Kamoran®. Adicionalmente, los conteos bacterianos reducidos persistieron durante 9 ciclos de fermentación, momento en el que Kamoran® empezó a perder eficacia.

[0094] EJEMPLO 3

Se evaluó la eficacia antibacteriana del artículo de ensayo en un entorno industrial bajo condiciones extremas en la Destilería A, conocida por tener una contaminación bacteriana resistente al tratamiento. Se probaron siete cubas con un volumen de trabajo de 1 millón de litros cada una en un proceso de fermentación por lotes. Las composiciones de “mash” incluían melaza y caldo. Se probó el artículo de ensayo a una dosis de 150 ppm administrada antes del segundo y el séptimo ciclo de fermentación. Las cubas ya estaban a un pH ácido de menos de 3 antes de administrar el artículo de ensayo. El artículo de ensayo redujo los niveles de contaminación bacteriana bajo condiciones extremas en la destilería con una persistencia de al menos 4 ciclos de fermentación.

[0095] Tabla 8 – Contaminación bacteriana en el ensayo en la destilería A

Ciclo de	Contaminación	Artículo de
1er ciclo	5,88E+07	150 ppm
2° ciclo	6,01E+06	
3er ciclo	3,08E+06	
4° ciclo	5,17E+06	
5° ciclo	1,40E+07	
6° ciclo	5,37E+07	
7° ciclo	1,16E+08	150 ppm
8° ciclo	7,73E+06	
9° ciclo	8,42E+06	
10° ciclo	9,60E+06	
11° ciclo	4,21E+07	
12° ciclo	8,14E+07	

[0096] La reducción en la contaminación bacteriana redujo el balance del ácido láctico en las cubas, como se ilustra en la Tabla 9.

[0097] **Tabla 9 – Balance del ácido láctico en el ensayo en la destilería A.**

Balance del ácido láctico antes de aplicar el artículo de ensayo	1486,9 kg
Balance del ácido láctico en el primer ciclo después de aplicar el artículo de ensayo	463,6 kg

El ensayo en la Destilería A dio como resultado una reducción del 80,4% en la contaminación bacteriana y una reducción media del ácido láctico por ciclo de fermentación de aproximadamente 965,5 kg. El etanol recuperado como resultado de esta reducción de ácido láctico mejoró en 1135,44 litros por ciclo de fermentación. También se observó una reducción significativa de la aglomeración de células de levadura en los tanques de fermentación.

[0098] EJEMPLO 4

Se evaluó la eficacia antibacteriana del artículo de ensayo en un entorno industrial en una segunda destilería - la Destilería B. Se probaron seis cubas con un volumen de trabajo de 1 millón de litros cada una en un proceso de fermentación por lotes. Las composiciones de “mash” incluían melaza y caldo. Se probó el artículo de ensayo a una dosis de 75 ppm administrada antes del segundo y el séptimo ciclo de fermentación. Las cubas ya estaban a un pH ácido de menos de 3 antes de administrar el artículo de ensayo. El artículo de ensayo redujo los niveles de contaminación bacteriana bajo condiciones extremas en la destilería con una persistencia de al menos 4 ciclos de fermentación.

[0099] **Tabla 10 - Contaminación bacteriana en el ensayo en la destilería B**

Ciclo de fermentación	Contaminación (bastones/mL)	Artículo de prueba
1er ciclo	4,68E+07	75 ppm
2º ciclo	7,87E+06	
3er ciclo	1,89E+05	
4º ciclo	2,19E+05	

5° ciclo	1,54E+06
6° ciclo	5,05E+06

[00100] La reducción en la contaminación bacteriana redujo el balance del ácido láctico en las cubas, como se ilustra en la Tabla 11.

[00101] **Tabla 11 – Balance del ácido láctico en el ensayo en la destilería B.**

Balance del ácido láctico antes de aplicar el artículo de ensayo	237,6 kg
Balance del ácido láctico en el primer ciclo después de aplicar el artículo de	89,9 kg

El ensayo en la Destilería B dio como resultado una reducción del 91,9% en la contaminación bacteriana y una reducción media del ácido láctico por ciclo de fermentación de aproximadamente 147,7 kg. El etanol recuperado como resultado de esta reducción de ácido láctico mejoró en 173,7 litros por ciclo de fermentación. También se observó una reducción significativa de la aglomeración de células de levadura en los tanques de fermentación.

[00102] Tal como se usa en la presente invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “ella” incluyen el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De la misma manera, los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “al menos un” se pueden usar indistintamente en el presente documento. Se señala, además, que los términos “comprende”, “incluyendo”, “caracterizado por” y “que tiene” se pueden usar indistintamente.

[00103] Aunque la presente invención ha sido ilustrada por la descripción de una o más realizaciones de la misma, y aunque las realizaciones se han descrito de forma considerablemente detallada, no buscan restringir o limitar de modo alguno el alcance de las reivindicaciones adjuntas a dichos detalles. Las ventajas y modificaciones adicionales resultarán evidentes para los expertos en el arte. Por consiguiente, los aspectos más amplios de la invención no se limitan a los detalles específicos, a un aparato y métodos representativos, y a los ejemplos ilustrativos mostrados y descritos. Por consiguiente, es posible desviarse de dichos detalles sin alejarse del alcance o espíritu del concepto inventivo general de los Solicitantes.