

MÉTODO PARA CONTROLAR LA CONTAMINACIÓN PROCARIÓTICA EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN DE LEVADURA

CAMPO DE LA INVENCION

La invención proporciona un método para controlar las contaminaciones de procariotas que se sabe que residen junto a la levadura durante los procesos de fermentación, por ejemplo, contaminaciones bacterianas. El método conduce a un aumento en el rendimiento de la producción del producto final, por ejemplo, etanol, a la vez que se mantiene la viabilidad de la levadura.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El biocombustible a base de etanol (también denominado “bioetanol”) se considera uno de los combustibles sostenibles en muchos países. Puede usarse directamente como etanol puro o mezclarse con gasolina. El bioetanol es menos tóxico, fácilmente biodegradable y produce contaminantes transportados por el aire en menor medida que el combustible de petróleo.

Los métodos de producción convencionales de etanol usan una variedad de sustratos de carbohidratos, por ejemplo, azúcar (derivado, por ejemplo, de caña de azúcar y remolacha azucarera), almidón (derivado, por ejemplo, de maíz, trigo, o patatas) u otros polisacáridos. Los azúcares monosacáridos se convierten en etanol principalmente mediante variedades de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante un proceso de fermentación.

Generalmente, el proceso de fermentación implica contactar a un medio rico en sustrato de carbohidrato con levadura y fermentarlo hasta que se consuma el sustrato, o hasta que la levadura sea inhibida por el aumento de la concentración de etanol. En muchos casos, las levaduras en fermentación se desechan y los *inóculos* frescos se usan para cada ciclo de fermentación. Por el contrario, las destilerías de Brasil han adoptado un proceso de fermentación durante el cual se reciclan las células de levadura (también denominado en la presente descripción como el “proceso brasileño de producción de etanol”). Al final de cada ciclo de

fermentación del proceso brasileño para la producción de etanol, se procesa el caldo fermentado para separar las células de levadura en forma de una crema concentrada del líquido que se somete a una mayor destilación. Después de ser tratadas con ácido sulfúrico diluido en agua (a un pH de 2,0-2,5, durante 1-2 horas), estas células de levadura se devuelven a tanques de fermentación de gran volumen (250-3000 L) para un nuevo ciclo de fermentación (Lopes y otros *Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry*. Brazilian Journal of Microbiology: 47S: 64-76. 2016). En general, el proceso brasileño de producción de etanol da como resultado un mejor rendimiento de etanol, ya que se consume menos azúcar para la multiplicación de las células de levadura. Sin embargo, los contaminantes bacterianos también se reciclan en el proceso de fermentación y pueden ser problemáticos, por ejemplo debido a la competencia del sustrato, lo que reduce de esta manera el rendimiento general de etanol durante la fermentación.

Como se sabe en la técnica, las bacterias causan diversos problemas adicionales durante la fermentación, que generalmente conducen a la inhibición de la fermentación de la levadura y a la reducción de los rendimientos industriales. Estos problemas incluyen, por ejemplo, la producción de ácidos orgánicos y la estimulación de la floculación de las células de levadura. Uno de los desafíos particulares es el control de la contaminación por el crecimiento de bacterias del ácido láctico y acético, tal como las bacterias del género *Lactobacillus sp* y *Acetobacter sp.*, que producen ácido láctico o ácido acético en lugar de etanol.

Para reducir el nivel de contaminantes bacterianos, el proceso brasileño de producción de etanol usa ácido sulfúrico diluido para matar las bacterias, como se detalló anteriormente. Sin esta etapa de tratamiento ácido, las fermentaciones industriales están sujetas a pérdidas de azúcar y a una reducción del rendimiento de etanol debido a la presencia de contaminación bacteriana.

Actualmente, existen diversos métodos empleados para eliminar de manera selectiva contaminantes bacterianos sin dañar la levadura durante la fermentación, entre los que se encuentra el uso de antibióticos. Los antibióticos más usados son la penicilina, virginiamicina, eritromicina, tilosina, tetraciclina y monensina. Sin embargo, existen varias preocupaciones relacionadas con el uso de antibióticos, por ejemplo, la aparición de bacterias resistentes debido al uso de antibióticos. Esta preocupación surge en particular debido a la presencia de residuos de antibióticos

en los granos secos de destilería (DDG), un coproducto rico en nutrientes de la producción de etanol derivado de materia prima como el maíz y vendida como alimento para el ganado. Varios países no aceptan residuos de antibióticos en la levadura seca inactiva para alimentación animal, por lo que es conveniente evitar el uso de antibióticos.

Otros diversos métodos se usan para superar los problemas relacionados con la contaminación bacteriana durante la producción de etanol (fermentación). Uno de los métodos más comúnmente usados es la aplicación de un biocida durante las etapas del proceso de fermentación. Por ejemplo, la publicación US 2012/0009641 (de Kulkarni y *otros*) sugiere un método que incluye un pretratamiento en el que la caña de azúcar se lava con agua que comprende un biocida. Adicionalmente, los biocidas tales como compuestos cuaternarios de amonio, carbamatos, glutaraldehído, y biocidas orgánicos halogenados no oxidantes están entre las posibles soluciones propuestas (descritas en, *entre otros*, documentos US 2011/0027846, y US 2010/0297719). Además, entre los nuevos antimicrobianos usados se encuentran el dióxido de cloro y los derivados de los ácidos del lúpulo (fracción alfa y beta). El dióxido de cloro (ClO_2) es un biocida oxidante comúnmente usado, que se ha sugerido para los procesos de fermentación, por ejemplo, en el documento US 9,926,576, sin embargo, adolece de varias desventajas. Primero, al ser un agente oxidante fuerte, el ClO_2 carece de selectividad y, aunque elimina las bacterias, también puede dañar la levadura y reducir su viabilidad, lo que conduce a una reducción general del rendimiento de etanol. Además, el uso de ClO_2 está asociado con preocupaciones de seguridad, ya que la producción de gas de Cl_2 puede provocar una explosión. Otra alternativa propuesta para el uso de antibióticos es una combinación de un biocida no oxidante, un biocida oxidante estabilizado y un péptido antibacteriano (documento WO 2011/116042).

Además, la publicación US 2003/0228373 se refiere a una composición para inhibir el crecimiento microbiano en aguas industriales, que incluye triamina y un biocida que es un biocida oxidante (por ejemplo, un agente bromado), un biocida no oxidante o una de sus combinaciones. Adicionalmente, la publicación WO 2020/240559 describe métodos para el control microbiano con compuestos a base de bromo y ácido cis-2-decenoico.

RESUMEN DE LA INVENCION

Ahora se ha demostrado inesperadamente que puede ser posible controlar la contaminación procariótica en un cultivo de levadura mediante el uso de un biocida oxidante a base de bromo, que es un producto de oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico que es una solución que comprende ácido bromhídrico, o una sal de bromuro metálico. Por tanto, la forma oxidante "activa" del biocida a base de bromo se obtiene en el lugar, por ejemplo, al poner en contacto composiciones a base de bromo (por ejemplo, una solución que comprende ácido bromhídrico o una sal de bromuro metálico que puede considerarse como "prebiocidas") con un oxidante, como se describe en más detalle a continuación. El trabajo experimental realizado en apoyo de esta invención en modelos de laboratorio examinó el efecto del biocida oxidante a base de bromo que es una solución de ácido bromhídrico y urea ("Solución Bactebrom™", fabricada por ICL, <https://www.icl-ip.com/product/bactebrom-solution/>, también denominado en la presente descripción "Bactebrom™"), activado en el lugar con hipoclorito sódico para proporcionar "Bactebrom™ activado" (también denominado en la presente descripción la forma biocida activa) sobre la viabilidad de varias especies bacterianas (específicamente, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *E. coli*) con respecto a su efecto sobre la viabilidad de la levadura (*S. cerevisiae*). A menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera, el término "Bactebrom™", como se usa en la presente, particularmente en referencia a sus propiedades y actividad biocida, se refiere a "Bactebrom™ activado" y se usa indistintamente con este término.

Como se detalló anteriormente, los contaminantes bacterianos abundan en los reactores de fermentación de alcohol, lo que afecta el rendimiento de la levadura y el rendimiento de alcohol. Los modelos de laboratorio detallados en la presente descripción buscan imitar el entorno de microorganismos presentes durante la fermentación del alcohol. Sorprendentemente, los experimentos realizados demuestran que Bactebrom™ activado es un agente antibacteriano efectivo contra las especies bacterianas probadas, como un agente biocida único. Sorprendentemente, con la dosis biocida probada de 0,5 y 1 ppm de equivalente de cloro total (en la presente descripción: "ppm de TCE", como se detalla más abajo), hubo un efecto insignificante sobre la viabilidad de la levadura probada (*S. cerevisiae*) a una variedad de valores de pH. Además, incluso en una dosis de 2,5

ppm de TCE, el Bactebrom™ activado tuvo un efecto marginal en la levadura analizada, al tiempo que demostró un efecto antibacteriano. Cabe señalar que los términos "etanol" y "alcohol" se usan en la presente descripción indistintamente, y ambos se refieren al alcohol etílico.

El efecto de Bactebrom™ activado a 2,5 y 5 ppm de TCE sobre la viabilidad de la levadura se evaluó adicionalmente mediante análisis de microscopía óptica, como se detalla microcódigo, que demostró que Bactebrom™ activado no afectó la viabilidad de la levadura e incluso tuvo un efecto beneficioso sobre la misma. También vale la pena señalar que, si bien la forma activa de Bactebrom™ afectó de manera selectiva a las bacterias sin dañar la levadura, el biocida no oxidante 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida (DBNPA) generalmente mostró un efecto insignificante tanto en las cepas bacterianas como en la levadura.

Por lo tanto, el control microbiano se logra mediante el uso de un biocida que contiene bromo oxidante como se describe en la presente descripción, lo que lleva a la descontaminación selectiva del crecimiento procariótico durante el proceso de fermentación, por ejemplo, crecimiento bacteriano, con un efecto limitado sobre la viabilidad de la levadura, de esta manera se reduce o elimina la necesidad de la aplicación de antibióticos durante los procedimientos de fermentación.

En otras palabras, la presente invención proporciona un método para la descontaminación y/o control bacteriano selectivo durante el proceso de fermentación. El método comprende fermentar un sustrato fermentable y levadura en presencia de al menos un biocida oxidante base de bromo como se define en la presente descripción, para producir etanol y contenido de sólidos, en donde el biocida oxidante puede estar presente como el único biocida y controla el crecimiento de bacterias sin afectar sustancialmente la población de levaduras, y en donde el método comprende además destilar el sustrato fermentado para separar al menos una porción del etanol del contenido sólido producido durante la fermentación. El método de acuerdo con la invención proporciona una solución sostenible, al reducir o eliminar por completo el uso de antibióticos durante la fermentación.

Por lo tanto, según uno de sus aspectos, la presente invención proporciona un método para producir etanol mediante fermentación propensa a la contaminación

procariótica, dicho método comprende:

- a) proporcionar un sustrato fermentable;
- b) combinar dicho sustrato fermentable con levaduras en presencia de agua para obtener un caldo de fermentación; y
- c) fermentar dicho caldo de fermentación para obtener un caldo fermentado; en donde el proceso comprende además poner en contacto las levaduras con al menos un biocida oxidante a base de bromo, obtenido mediante oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico, en donde la fuente de bromuro es una solución que comprende ácido bromhídrico o una sal de bromuro metálico.

En algunas modalidades, el método de acuerdo con la invención comprende además

- d) separar dicho caldo fermentado en levaduras gastadas y líquido que contiene etanol; y opcionalmente
- e) recuperar dicha levadura gastada, en donde la etapa de recuperación puede comprender poner en contacto dicha levadura gastada con dicho biocida oxidante a base de bromo y opcionalmente con ácido sulfúrico diluido para obtener levadura recuperada.

En algunas modalidades, el método de acuerdo con la invención se realiza esencialmente en ausencia de antibióticos. Alternativamente, se puede agregar cierta cantidad de antibióticos según sea necesario, como se describe sustancialmente en la presente descripción. En modalidades específicas, el antibiótico se añade en una cantidad inferior al 70 % de la cantidad necesaria para controlar la contaminación en condiciones idénticas, pero sin el uso de biocida oxidante a base de bromo.

En particular, el método de acuerdo con la invención es aplicable en donde la fuente de bromuro inorgánico se selecciona de una solución que comprende HBr y/o bromuro de metal alcalino.

La fuente de bromuro inorgánico oxidado en el lugar puede seleccionarse del grupo que consiste en HBr; una solución de HBr y urea; y bromuro de sodio. La fuente de bromuro inorgánico puede oxidarse en el lugar con cualquiera de hipoclorito, cloro, peróxido de hidrógeno, ozono o electroquímicamente para producir su forma activa (es decir, el biocida oxidante a base de bromo). En particular, es aplicable el método

de acuerdo con la invención en donde dicho biocida oxidante a base de bromo es una solución acuosa de ácido bromhídrico y urea, que reacciona con hipoclorito en el lugar, para producir las especies de bromo activas oxidantes.

El método de acuerdo con la invención es particularmente aplicable a la inhibición de la contaminación procariótica que surge de bacterias del ácido láctico, por ejemplo del género (género) *Lactobacillus* (por ejemplo, *Lactobacillus fermentum* o *Lactobacillus plantarum* o una de sus combinaciones), *E. coli* o cualquiera de sus combinaciones.

Preferentemente, es aplicable el método de acuerdo con la invención en donde dicha levadura recuperada se usa durante al menos uno(s) ciclo(s) de fermentación adicional(es).

En algunas modalidades, el método de acuerdo con la invención es en donde dicho al menos un biocida oxidante a base de bromo se aplica o añade a un nivel de dosificación de 0,2 a 25 ppm de TCE. En concreto, en dependencia de la cepa de levadura, dicho al menos un biocida oxidante a base de bromo se aplica en un nivel de dosificación de 0,2 a 10 ppm de TCE, de 0,2 a 7 ppm de TCE, o de 0,2 a 5 ppm de TCE, por ejemplo, de 0,5 - 5 ppm de TCE.

La presente descripción proporciona además un método para purificar un cultivo de levadura propenso a la contaminación procariótica, dicho método comprende poner en contacto dicho cultivo de levadura con al menos un biocida oxidante a base de bromo, como se define en la presente descripción, obtenido mediante oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico que es una solución que comprende ácido bromhídrico o una sal de bromuro metálico.

El al menos un biocida oxidante a base de bromo como se define en la presente descripción se puede agregar de forma continua o intermitente. En algunas modalidades, el contacto de las levaduras con el al menos un biocida oxidante a base de bromo como se define en la presente descripción se realiza durante la fermentación de dicho caldo de fermentación.

En algunas modalidades, el método definido en la presente descripción es aplicable a la levadura *S. cerevisiae*, preferentemente seleccionado de cepas de *S. cerevisiae*

cepa PE-2, S288c, levadura de panadería y cepa CEN.PK113-7D.

En las modalidades anteriores y otras del método definido en la presente descripción, separar el caldo fermentado comprende centrifugar dicho caldo fermentado y recolectar al menos una porción de dicha levadura gastada. En algunas modalidades, el método de acuerdo con la presente descripción comprende además separar etanol de dicho líquido que contiene etanol. En modalidades específicas la separación se realiza por destilación.

En varias modalidades, el método de acuerdo con la presente descripción es en donde el sustrato fermentable se deriva de materias primas que contienen azúcar, preferentemente remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza, suero, sorgo o frutas, materias primas que contienen almidón, preferentemente cultivos de cereales o raíces, tales como maíz, trigo, arroz o mandioca, o cualquiera de sus combinaciones.

En modalidades específicas, el sustrato fermentable se deriva de materias primas que contienen azúcar, preferentemente remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza, suero, sorgo o frutas o cualquiera de sus combinaciones. En modalidades específicas adicionales el sustrato fermentable se deriva de materias primas que contienen almidón, preferentemente cultivos de cereales o raíces, tales como maíz, trigo, arroz o mandioca, o cualquiera de sus combinaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades se describirán ahora, solo a modo de ejemplo no limitante, con referencia a las figuras acompañantes en las cuales:

La Figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de Bactebrom™ en el intervalo de concentración indicado (como ppm de equivalentes de cloro total, TCE) sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus fermentum* (9338) a pH 5,5. **Abreviaturas:** UFC, unidades formadoras de células; ml, mililitro; *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus*, *Lactobacillus fermentum*, ppm, partes por millón.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de Bactebrom™ en el intervalo de concentración indicado (como ppm de TCE) sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus fermentum* (9338) a pH 3,5. **Abreviaturas:** *Lactobacillus*, *Lactobacillus fermentum*.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto de Bactebrom™ en el intervalo de concentración indicado (como ppm de TCE) sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus plantarum* (8014) a pH 5,5.

La Figura 4 es un gráfico que muestra el efecto de Bactebrom™ en el intervalo de concentración indicado (como ppm de TCE) sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus plantarum* (8014) a pH 3,5.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de Bactebrom™ en el intervalo de concentración indicado (como ppm de TCE) sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *E. coli* (8739) a pH 5,5.

La Figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de Bactebrom™ en el intervalo de concentración indicado (como ppm de TCE) sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *E. coli* (8739) a pH 3,5.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el efecto de la 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida (DBNPA) en el intervalo de concentración indicado sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus fermentum* (9338) a pH 5,5. **Abreviaturas:** DBNPA, 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida.

La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto del DBNPA en el intervalo de concentración indicado sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus fermentum* (9338) a pH 3,5.

La Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto del DBNPA en el intervalo de concentración indicado sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus plantarum* (8014) a pH 5,5.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto del DBNPA en el intervalo de concentración indicado sobre la viabilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa bacteriana *Lactobacillus plantarum* (8014) a pH 3,5.

La Figura 11 es una micrografía que muestra células de levadura teñidas con eritrosina, en una cámara de Neubauer. Las células teñidas de rojo (indicadas por una flecha) son células muertas y las células no teñidas son células viables en el microscopio óptico (100X).

La Figura 12 es una representación esquemática del proceso brasileño de producción de alcohol mediante fermentación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, se proporciona en la presente descripción un método para controlar una contaminación procariótica en un proceso a base de levadura para producir etanol, también denominado en la presente descripción proceso de fermentación. Se ha descubierto inesperadamente que mediante el uso de un biocida oxidante a base de bromo obtenido por oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico (la fuente de bromuro es una solución que comprende ácido bromhídrico o una sal de bromuro metálico), es posible erradicar de manera selectiva el crecimiento de células procarióticas sin afectar sustancialmente la viabilidad de la levadura. Por tanto, el método de la invención comprende poner en contacto la levadura con un biocida oxidante a base de bromo como se define en la presente descripción.

En otras palabras, por uno de sus aspectos, la presente descripción proporciona un método para purificar un cultivo de levadura propenso a la contaminación procariótica, dicho método comprende poner en contacto dicho cultivo de levadura con al menos un biocida oxidante a base de bromo, obtenido mediante oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico que es una solución que comprende ácido bromhídrico o una sal de bromuro metálico.

Además, la presente descripción proporciona un método para producir etanol mediante fermentación propensa a la contaminación procariótica, dicho método comprende:

- a) proporcionar un sustrato fermentable;
- b) combinar dicho sustrato fermentable con levaduras en presencia de agua para obtener un caldo de fermentación; y
- c) fermentar dicho caldo de fermentación para obtener un caldo fermentado; en donde el proceso comprende además poner en contacto las levaduras con al menos un biocida oxidante a base de bromo, obtenido mediante oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico que es una solución que comprende ácido bromhídrico o una sal de bromuro metálico.

Como podrán apreciar los expertos en la técnica, por el término "purificar" se entiende descontaminar o desinfectar al menos parcialmente, de contaminación procariótica, de manera que el cultivo de levadura o cualquier medio que lo comprenda (por ejemplo, el caldo de fermentación) está sustancialmente purificado, específicamente al menos un 60 % libre, preferentemente al menos un 75 % libre, y con mayor preferencia al menos un 90 % libre de contaminación procariótica.

La etapa de contacto se puede llevar a cabo al añadir un biocida oxidante a base de bromo a un líquido que contiene levadura o un líquido que contiene un cultivo de levadura contaminado con un crecimiento procariótico. Esta etapa se puede realizar en cualquier momento durante el curso del proceso (por ejemplo, para producir etanol) y en cualquier etapa del mismo, a manera de ejemplo, durante la etapa en la que se recupera (recicla) la levadura después de que se completa una etapa de fermentación (dicha levadura también se denomina en la presente descripción "levadura gastada") o durante la etapa de pretratamiento del sustrato fermentable, para descontaminar el sustrato antes de que comience la etapa de fermentación. La etapa de contacto puede realizarse alternativamente o adicionalmente durante la fermentación del caldo de fermentación. La etapa de contacto de agregar un biocida oxidante a base de bromo a un líquido que contiene levadura generalmente se lleva a cabo con un nivel de dosificación de al menos 0,2 ppm de equivalente de cloro total (TCE), con el límite superior dictado por las necesidades del proceso, como se describe generalmente por debajo, pero puede ser hasta, por ejemplo, 25 ppm de equivalente de cloro total. Generalmente, como se ha demostrado en los ejemplos siguientes, los niveles de dosificación del biocida a base de bromo de entre 0,5 y

5,0 ppm de TCE son eficaces para erradicar de manera selectiva la contaminación procariótica, cuando se realizan en un medio acuoso libre de compuestos orgánicos. Se debe entender que en presencia de azúcares reductores y otros componentes de la fermentación/caldo fermentado, la dosis requerida de biocidas a base de bromo puede ser mayor, lo que puede corresponder a concentraciones de TCE significativamente más altas en un medio libre de compuestos orgánicos. Por tanto, los niveles de dosificación en medio libre de compuestos orgánicos pueden servir como punto de partida estandarizado para determinar los niveles de dosificación requeridos del biocida a base de bromo en el proceso de producción de etanol. Por lo tanto, el proceso también puede comprender predeterminar la cantidad máxima admisible de biocidas a base de bromo para la cepa específica de la levadura que se está usando en el proceso (es decir, el nivel de dosificación que aún no mata la levadura), y en base a los resultados experimentales demostrados en la presente descripción, para seleccionar un nivel de dosificación que sea inferior a la cantidad máxima admisible para el proceso, al esperar que sea suficiente para erradicar cualquier contaminación procariótica razonable.

Por tanto, específicamente, en dependencia de la cepa de levadura, dicho al menos un biocida oxidante a base de bromo como se define en la presente descripción puede usarse a un nivel de dosificación de 0,2 a 25 ppm de TCE, por ejemplo de 0,2 a 10 ppm de TCE, de 0,2 a 7 ppm de TCE, de 0,2 a 5 ppm de TCE, por ejemplo de 0,5 a 5 ppm de TCE. La concentración real del biocida oxidante a base de bromo requerida para el proceso puede determinarse al monitorear, continuamente o de manera intermitente, los valores de TCE y ajustar el nivel de dosificación (por ejemplo, la velocidad de introducción) del biocida oxidante en consecuencia durante el proceso o confiar en valores predeterminados, por ejemplo como se describió anteriormente. Las cantidades requeridas también dependerán de la composición específica del medio en donde se añade el biocida oxidante a base de bromo, particularmente del contenido orgánico del mismo.

El proceso de fermentación suele realizarse en medio acuoso. Por tanto, todos los componentes del proceso de fermentación, como se describe en más detalle a continuación, pueden agregarse o estar contenidos en un medio acuoso, por ejemplo agua destilada.

Los biocidas oxidantes a base de bromo (por ejemplo HBr, HBr y urea, bromuros

de metales alcalinos) proporcionan especies activas de bromo en el medio en el que se suministran, por ejemplo agua, a través de la oxidación del bromuro que convierte el $\text{Br}^{(-)}$ en dichas especies de bromo activas, por ejemplo especies de bromo elemental y/o especies de Br^{+} (por ejemplo, ácido hipobromoso/hipobromito). La oxidación se consigue normalmente con ayuda de un oxidante químico, por ejemplo hipoclorito sódico, cloro, peróxido de hidrógeno u ozono, o electroquímicamente. La dosificación de los biocidas oxidantes a base de bromo descritos en la presente descripción generalmente se expresa como partes por millón de equivalente de cloro total (ppm de TCE), es decir, las especies oxidantes totales presentes en la solución expresadas como equivalentes titrimétricos de cloro libre.

La concentración equivalente de cloro total puede determinarse, por ejemplo, mediante una valoración yodométrica. La valoración se puede realizar directamente, por ejemplo mediante el uso de buretas de valoración o con un valorímetro automático, por ejemplo el titroprocesador Titrino 848 plus. Las especies oxidativas pueden hacerse reaccionar con un exceso de solución de yoduro para formar yodo que luego se valora directamente con una solución calibrada de tiosulfato, o con un exceso de solución calibrada de tiosulfato, el resto del cual luego se valora cuantitativamente con yodo. Adicionalmente, el equivalente de cloro total se puede determinar mediante el método reactivo DPD (dietil-p-fenilendiamina) mediante el uso de un espectrofotómetro, por ejemplo, Merck SQ-300.

Las fuentes de bromuro inorgánico, específicamente soluciones que comprenden sales de bromuro metálico y/o ácido bromhídrico (HBr), incluida una solución de HBr y urea, proporcionan especies de bromo activas en el medio al que se suministran (por ejemplo, agua) tras la oxidación, por ejemplo, mediante un oxidante (tal como mediante oxidación química mediante el uso de hipoclorito, cloro gaseoso, peróxido de hidrógeno u ozono y/o mediante oxidación electroquímica, concretamente, bromo generado anódicamente). Los productos disponibles comercialmente incluyen bromuro de sodio activado (que consiste de una solución acuosa de bromuro de sodio e hipoclorito sódico preparada en el lugar y entregada inmediatamente al sistema a tratar); una solución de ácido bromhídrico que reacciona en el lugar con el hipoclorito sódico; una solución de HBr y urea (por ejemplo, solución Bactebrom™, compuesta de ácido bromhídrico y urea, de ICL-

IP), que reacciona en el lugar con hipoclorito sódico. Dicha composición se puede preparar, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2012/038954, incorporado en la presente descripción como referencia.

En modalidades específicas, la fuente de bromuro inorgánico se selecciona del grupo que consiste en: HBr, una solución de HBr y urea y bromuro de sodio. En las modalidades anteriores y otras, la fuente de bromuro inorgánico se oxida en el lugar con cualquiera de hipoclorito, cloro, peróxido de hidrógeno, ozono y/o electroquímicamente, para producir dicho biocida oxidante a base de bromo.

Los biocidas oxidantes a base de bromo, tal como se definen en la presente descripción, adecuados para su uso en la presente invención, están disponibles en el mercado en diferentes formas, es decir, sólidos (tales como polvos y formas compactadas, por ejemplo, gránulos y tabletas) y líquidos (por ejemplo, concentrados acuosos u otras formulaciones fluidas que se pueden suministrar fácilmente al sistema de fermentación a tratar).

En general, una solución acuosa de la fuente de bromuro y una solución acuosa del oxidante se mantienen en tanques separados. Con la ayuda de bombas dosificadoras, se suministran dos corrientes separadas desde los tanques y se mezclan justo antes de su uso, de manera que la corriente combinada ingresa al sitio de uso previsto poco después de que se haya formado (también denominado en la presente descripción "*en el sitio*" o "*en el lugar*"). El biocida oxidante a base de bromo tal como se define en la presente descripción puede suministrarse en modo continuo o en modo intermitente (dosificación) a intervalos de tiempo predeterminados, en dependencia de los requisitos del proceso. Por ejemplo, para producir el Bactebrom™ activo, poco antes de su uso se mezclan una primera corriente, que consiste de HBr y urea, y una segunda corriente, que comprende hipoclorito sódico.

En modalidades específicas, la presente descripción proporciona un método para producir etanol mediante fermentación propensa a contaminación procariótica, dicho método comprende:

- a) proporcionar un sustrato fermentable;
- b) combinar dicho sustrato fermentable con levaduras en presencia de agua para obtener un caldo de fermentación; y

c) fermentar dicho caldo de fermentación para obtener un caldo fermentado; y opcionalmente

d) separar dicho caldo fermentado en levaduras gastadas y líquido que contiene etanol; y

e) recuperar dicha levadura gastada,

en donde el proceso comprende además poner en contacto la levadura recuperada con al menos un biocida oxidante a base de bromo, obtenido mediante oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico que es una solución que comprende ácido bromhídrico o una sal de bromuro metálico.

Por lo tanto, la etapa de recuperación de la levadura gastada puede comprender poner en contacto la levadura gastada (recuperada) con al menos un biocida oxidante a base de bromo como se define en la presente descripción y opcionalmente comprende además poner en contacto la levadura gastada con ácido sulfúrico diluido, antes, después o simultáneamente que poner en contacto la levadura gastada con el biocida oxidante a base de bromo, como se detalla más abajo. La levadura recuperada puede usarse durante al menos uno(s) ciclo(s) de fermentación adicional(es).

La etapa de contacto (específicamente, la etapa que implica traer las levaduras y el biocida oxidante a base de bromo en conexión física) se puede realizar a cualquier valor de pH adecuado, aunque puede ser especialmente ventajoso seleccionar el valor de pH de acuerdo con los requisitos del proceso. Por ejemplo, entre 2 y 6, por ejemplo, entre 2 y 4 para una etapa de contacto realizada durante la etapa de recuperación de la levadura, o entre 4 y 6 para una etapa de contacto realizada durante la etapa de fermentación. Como se demuestra en la sección de Ejemplos más abajo, la erradicación selectiva de bacterias sobre levaduras se produce tanto a pH 3,5 como a 5,5, y sin estar ligado a una teoría particular, se cree que esta selectividad no se ve afectada por el pH del medio.

Como se analiza en la presente descripción, la etapa de contacto con los biocidas oxidantes a base de bromo como se define en la presente descripción se puede realizar como una etapa de descontaminación independiente, por ejemplo, como un método para purificar el cultivo de levadura de la descontaminación bacteriana o como una etapa durante la fermentación a base de levadura, en particular durante una etapa de recuperación de levadura, y opcionalmente puede estar asociado con

una etapa de acidificación como se conoce para el proceso brasileño de producción de etanol (por ejemplo, poner en contacto la levadura gastada con ácido sulfúrico diluido en agua (H_2SO_4), a un pH de 2,0-2,5, durante 1-2 horas). La etapa de contacto con los biocidas oxidantes a base de bromo se puede realizar antes o después de la etapa de acidificación como se define anteriormente o simultáneamente con la misma.

Sin estar ligado a una teoría particular, se cree que poner en contacto un cultivo de levadura potencialmente contaminado con al menos un biocida oxidante a base de bromo de acuerdo con la invención durante la etapa de recuperación de la levadura, puede ser suficiente para erradicar esencialmente la contaminación procariótica, de esta manera se inhibe de manera selectiva el crecimiento bacteriano sin afectar significativamente la viabilidad de la levadura, si se realiza a un nivel de dosificación del biocida a base de bromo oxidante de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 25 ppm de TCE, por ejemplo entre 2 y 10 ppm de TCE, entre 0,2 y 7 ppm de TCE o entre 0,2 y 5 ppm de TCE, por ejemplo entre 0,5 y 5 ppm de TCE; y/o a un valor de pH de 2 a 4. En las modalidades anteriores y otras, el tiempo de contacto entre la levadura y el biocida oxidante a base de bromo de la presente descripción es, por ejemplo, entre 30 y 120 minutos, o entre 45 y 75 minutos. El tiempo de contacto específico puede depender de la naturaleza de la contaminación procariótica, de la(s) cepa(s) particular(es) de levadura, del nivel de dosificación del biocida a base de bromo y de muchos otros factores. Idealmente, el tiempo de contacto, así como también el nivel de concentración/dosificación efectivo para cada proceso particular, pueden ser predeterminados en un experimento separado antes del proceso de producción en masa.

Generalmente, el sustrato fermentable (específicamente, la sustancia o material que se fermenta) es una mezcla de azúcares y/u oligo- y polisacáridos nutritivos, consumidos por los microorganismos utilizados en la etapa de fermentación. Las materias primas para el proceso son preprocesadas, mecánica, química, enzimática y/o mediante prefermentación con otro microorganismo, para hacer accesibles estos nutrientes a los microorganismos fermentadores de etanol, como se describe más abajo. Generalmente, existen tres etapas principales en la producción de etanol por fermentación: (1) obtener el caldo de fermentación, específicamente la solución que contiene sustrato fermentable, a partir de materias primas, (2) convertir azúcares y/u otros nutrientes en el caldo fermentable en etanol

mediante fermentación, de esta manera obtener el caldo fermentado, y (3) separar etanol y/o purificarlo mediante procesos adicionales, incluida, por ejemplo, la destilación.

El material de partida para la producción de etanol, también denominado en la presente descripción "sustrato fermentable", "sustrato", "puré fermentable" y similares, adecuado para la presente invención, puede derivarse, por ejemplo, de materias primas que contienen azúcar (por ejemplo, remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza, suero, sorgo y frutas) o materias primas que contienen almidón (por ejemplo cereales o tubérculos, tal como maíz, trigo, arroz, o mandioca, etc.). Preferentemente, el proceso puede usarse para producir el llamado "bioetanol de primera generación", específicamente, etanol directamente relacionado con una biomasa que en la mayoría de los casos es comestible. En particular, el sustrato fermentable es jugo de caña de azúcar, melaza o mezclas de los mismos.

En modalidades específicas, el sustrato fermentable se deriva de materias primas que contienen azúcar, preferentemente remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza, suero, sorgo o frutas, materias primas que contienen almidón, preferentemente cereales o cultivos de raíces, tal como maíz, trigo, arroz o mandioca, o cualquiera de sus combinaciones.

Por lo tanto, el sustrato fermentable se deriva de diversas materias primas adecuadas, por ejemplo, como se mencionó anteriormente, que han sido (opcionalmente) sometidas a procesos de pretratamiento adecuados para la materia prima particular usada, como se conoce en la técnica. Los métodos usados para el pretratamiento incluyen pretratamiento físico (por ejemplo, molienda mecánica para moler el sustrato y facilitar la trituración aguas abajo), pretratamiento químico (por ejemplo, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, ozonólisis, hidrólisis enzimática), pretratamiento fisicoquímico (por ejemplo, explosión de fibra de amoníaco o explosión de fibra en corriente) y procedimientos de pretratamiento biológico (por ejemplo, mediante el uso de diferentes especies de hongos). En general, los procedimientos de pretratamiento tal como se definen en la presente descripción incluyen cualquier proceso necesario para convertir las materias primas en azúcares fermentables disponibles para la producción de bioetanol mediante fermentación de levadura.

Se han revisado varios métodos de pretratamiento de materias primas para la fermentación de etanol y muchos otros aspectos del proceso, por ejemplo en Mohd-Azhar y otros, *Biochemistry and Biophysics Reports* 10 (2017) 52–61 incorporado en la presente descripción como referencia.

Por ejemplo, actualmente en Brasil, el sustrato fermentable comprende melaza (que es el residuo o subproducto de la producción de azúcar) diluida con agua, o una mezcla de jugo de caña de azúcar y melaza, y actualmente en Estados Unidos el sustrato fermentable comprende un licor de glucosa resultante del proceso de descomposición del almidón extraído del maíz.

Los diferentes materiales de partida varían en la medida en que deben ser preprocesados (también denominados en la presente descripción "pretratados") antes de su uso para la fermentación con levadura, como se conoce bien en la técnica. Por tanto, el proceso puede comprender el pretratamiento del material de partida para obtener un sustrato o puré fermentable. Por ejemplo, cuando se usa caña de azúcar como material de partida para el proceso de producción de etanol, primero se puede lavar la caña. Preferentemente, el lavado de la caña se lleva a cabo en agua alcalina con un valor de pH de aproximadamente 11, por ejemplo entre 10 y 12. Luego la caña lavada se muele para obtener un jugo crudo y un residuo sólido. Los sólidos de caña pueden usarse como combustible de combustión normal (por ejemplo, para calentar los líquidos en las etapas posteriores del proceso). Luego, el jugo crudo puede precalentarse, por ejemplo, a una temperatura entre 60 y 80 °C, y luego clarificarse, por ejemplo, mediante la adición de óxido de calcio (cal viva) y/o pasar dióxido de azufre a través del mismo. El jugo crudo clarificado puede luego fosfatarse para precipitar los residuos de calcio y calentarse en un ensamble de decantación para separar el componente inorgánico, por ejemplo a aproximadamente 105 °C durante aproximadamente 2 horas. El líquido decantado puede luego filtrarse para eliminar los sólidos inorgánicos, que pueden usarse como fertilizante, mientras que el líquido (llamado en esta etapa "caldo clarificado") puede usarse para fabricar azúcar. Los residuos de fabricar azúcar (melaza), o el caldo clarificado, pueden diluirse con agua de jugo clarificado de caña de azúcar, como se describió anteriormente, para producir mosto, usado como puré fermentable.

Por medio de un ejemplo adicional, cuando se usa maíz como materia prima que

contiene almidón como materia prima (prima), su pretratamiento es un proceso de múltiples etapas, como se conoce en la técnica y como se describe brevemente más abajo. La primera etapa consiste en la molienda del maíz, mediante molienda seca o húmeda. Cuando se emplea la molienda húmeda, los granos de maíz se descomponen en almidón, fibra, germen de maíz y proteína mediante calentamiento en una solución de ácido sulfuroso durante intervalos de tiempo prolongados, por ejemplo de 1-3 días, tal como aproximadamente 2 días. Luego, el almidón se separa y puede usarse como material de partida para producir etanol (específicamente, el sustrato fermentable como se define en la presente descripción), así como también jarabe de maíz o almidón de grado alimenticio. La primera etapa de la molienda de maíz mediante un proceso de molienda en seco es moler el maíz mediante el uso de un molino adecuado, por ejemplo, un molino de martillos o un molino de rodillos. Una vez que el maíz se descompone, se mezcla con agua caliente para formar un puré o una suspensión. La suspensión comprende en esta etapa, entre otros constituyentes, partículas de maíz y gránulos de almidón de maíz. A continuación, la suspensión de maíz se somete a gelatinización y licuefacción (también denominada "cocción") en condiciones de temperatura y acidez como se detalla más abajo, durante las cuales el agua interactúa con los gránulos de almidón en el maíz cuando la temperatura es superior a 60 °C y forma una suspensión viscosa. La etapa de licuefacción es una hidrólisis parcial que reduce la viscosidad, esencialmente al romper las largas cadenas de almidón en cadenas más cortas. Para lograr la licuefacción, las condiciones de reacción generalmente se mantienen a un pH en el intervalo de 5,9 a 6,2, y se agregan amoníaco y ácido sulfúrico al tanque para mantener el valor del pH. La enzima alfa-amilasa también se puede agregar al puré antes de cocinar con chorro (durante 2-7 minutos a 105-120 °C) mejorar la fluidez del puré. En esta etapa, se produce dextrina más corta pero aún no se forma glucosa. Cuando se utiliza alfa-amilasa, existen varios procesos conocidos en la técnica, que implican hidrólisis enzimática y térmica en diversos órdenes. El primer proceso consiste en añadir alfa-amilasa e incubar el material a 85-95 °C. El segundo proceso consiste en colocar el puré en la cocina con chorro a 105-120 °C durante 2-7 minutos, luego fluirlo a un tanque flash a 90 °C y agregar alfa-amilasa tres horas después. El tercer proceso consiste en agregar la alfa-amilasa, calentar en la cocina con chorro a 150 °C, seguido de flujo al tanque flash a 90 °C y agregar más alfa-amilasa. Como se sabe en la técnica, la enzima alfa-amilasa actúa sobre los enlaces glicosídicos internos para producir dextrina y maltosa, para la licuefacción del material. La

siguiente etapa del pretratamiento del maíz es la sacarificación, específicamente, el proceso mediante el cual se produce una mayor hidrólisis a monómeros de glucosa, mediante el uso de la enzima glucoamilasa, que escinde los enlaces glicosídicos en los extremos de la dextrina para formar glucosa. Las condiciones óptimas de reacción requeridas son un pH de 4,5 y una temperatura de 55-65 °C.

Como se sabe en la técnica, si bien el tratamiento previo de la materia prima puede separarse del proceso de fermentación, el proceso de fermentación puede comenzar junto con la hidrólisis de la materia prima en un sustrato fermentable, siempre y cuando las condiciones de pretratamiento sean adecuadas para la fermentación.

En general, la fermentación comienza con la adición de un sustrato (sustrato fermentable), que puede estar compuesto, por medio de un ejemplo específico, por jugo de caña de azúcar y/o melaza en cualquier proporción, a un inóculo de un cultivo de levadura contenido en un biorreactor (recipiente fermentador) en presencia de agua. El sustrato normalmente contiene azúcares reductores (por ejemplo, sacarosa, glucosa, fructosa y sus mezclas), normalmente presentes en concentraciones de aproximadamente 150-250 g/L. La fermentación se puede realizar como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo, en modo por lotes (por ejemplo, mediante un proceso de alimentación por lotes), en modo continuo o en cualquier combinación de estos dos.

El sustrato fermentable se pone en contacto con el cultivo de levadura y agua en las condiciones deseadas de, por ejemplo, concentración de inóculo (cultivo de levadura), concentración de azúcar, temperatura, oxigenación, pH, tiempo de incubación y mezclado (velocidad de agitación). La mezcla de levadura, agua y sustrato fermentable (también denominada en la presente descripción "caldo de fermentación") se incuba luego durante un tiempo determinado, para efectuar la fermentación del sustrato fermentable. La temperatura típica puede estar entre 20 °C y 37 °C, preferentemente entre 32 °C y 34 °C. La temperatura se puede controlar como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de una tina con doble camisa y hacer circular un líquido de intercambio de calor, por ejemplo agua, a través de la camisa. La temperatura del líquido de intercambio de calor puede controlarse mediante una unidad de control de temperatura, por ejemplo mediante una unidad de calentamiento y/o una unidad de enfriamiento. La

temperatura del líquido de intercambio de calor puede controlarse mediante una temperatura medida en una tina de fermentación, por ejemplo, mediante un termopar interno. El intervalo de pH óptimo para *S. cerevisiae* es 4,0-5,0.

El tiempo necesario para el proceso, por ejemplo, para el consumo total del material de partida (es decir, hasta que quede presente menos de aproximadamente el 0,1 % de azúcares fermentables) u otro punto final predeterminado, suele estar dictado por la velocidad de consumo de los azúcares y/o por la producción de alcohol; uno o ambos pueden ser monitoreados continuamente o en momentos discretos, para propósitos de control del proceso.

La etapa de fermentación puede comprender alimentar gradualmente el sustrato fermentable para combinarlo con la levadura y el agua (es decir, mediante el modo de alimentación por lotes). Esta adición gradual puede ser particularmente ventajosa para reducir la producción de coproductos tóxicos, de esta manera causa menos estrés a la levadura y, en consecuencia, aumenta el rendimiento de la producción de etanol. Alternativamente, el sustrato fermentable se puede combinar sustancialmente por completo con la levadura y el agua para iniciar la etapa de fermentación. Cuando se emplea la adición gradual, se puede llevar a cabo dentro de aproximadamente 4-6 horas, mientras que la fermentación se completa dentro de 6-10 horas después del inicio de la alimentación, lo que alcanza un 7-10 % (v/v) de etanol en el caldo fermentado (es decir, la mezcla obtenida de la etapa de fermentación). Durante la alimentación y la fermentación, la temperatura dentro del recipiente fermentador se mantiene entre 27 °C y 37 °C, preferentemente entre 32 °C y 34 °C. Por tanto, se puede producir ventajosamente etanol con una eficiencia de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, lo que significa que el 90 % del azúcar contenido en el sustrato se ha convertido en etanol.

Las levaduras adecuadas para la producción industrial de etanol mediante fermentación suelen ser cepas de *S. cerevisiae*, sin embargo, también se pueden usar otros géneros conocidos en la técnica, por ejemplo, *Pichia Stipidis* (por ejemplo, cepa NRRL-Y-7124), o *Kluyveromyces fragilis* (por ejemplo, cepa Kf1). La presente invención es por tanto aplicable a cualquier levadura adecuada para la producción industrial de etanol por fermentación, en particular al menos una cepa de *S. cerevisiae*. Algunos ejemplos no limitativos de cepas de *S. cerevisiae* son la cepa PE-2, S288c, levadura de panadería y CEN.PK113-7D. La levadura adecuada

para el proceso puede ser nativa o modificada genéticamente, por ejemplo, para consumir pentosas o para expresar genes que codifican enzimas líticas efectivas contra bacterias. Adicionalmente, o alternativamente, la levadura puede ser una mezcla de varios géneros y/o cepas, para maximizar la utilización de los nutrientes y la conversión a etanol. Algunos microorganismos de levadura adicionales, adecuados para fermentar el sustrato fermentable en etanol, se describen, por ejemplo, en Mohd Azhar 2017 (*vide supra*).

Como se sabe en la técnica, las células de levadura se reproducen por en ciernes. Por lo tanto, las células de levadura (denominadas indistintamente en la presente descripción cultivo de levadura) de la presente invención son un cultivo de levadura que contiene una colección heterogénea de células de levadura en diversas etapas del ciclo de vida y ocasionalmente también pueden incluir células de levadura muertas. La levadura utilizada en el proceso de acuerdo con la invención puede ser levadura libre o levadura inmovilizada.

Una vez completada la etapa de fermentación, de acuerdo con el proceso brasileño aceptable para la producción de etanol, las levaduras se separan del caldo fermentado y se tratan con un ácido para eliminar contaminantes, y de esta manera se reciclan o recuperan, mientras que de acuerdo con otros procesos (no brasileños) las levaduras se procesan para obtener productos que generalmente no están relacionados con una fermentación adicional.

El inóculo para la fermentación se puede preparar a partir de células de levadura frescas o, como en el proceso brasileño para la producción de etanol (por ejemplo, como se presenta esquemáticamente en la Figura 12), células de levadura o cultivo de levadura recolectados y recuperados al final de un ciclo de fermentación (por ejemplo, el ciclo anterior) se usan nuevamente después de ser tratados (recuperados) por ejemplo como se detalla en la presente descripción.

De acuerdo con la presente invención, el contacto de levaduras con los biocidas oxidantes a base de bromo como se define en la presente descripción también se puede realizar después de que se completa la etapa de fermentación de azúcares en etanol.

En dependencia del material de partida, el caldo fermentado puede contener sólidos gruesos, por ejemplo, restos del proceso de maceración, así como también masa de levadura dispersa. El caldo fermentado se somete en primer lugar a separar la fracción líquida de la fracción sólida. Cuando el sustrato contiene sólidos insolubles y/o forma productos de fermentación insolubles, estos pueden separarse del caldo fermentado mediante decantación, filtración o cualquier otro método conocido en la técnica. La levadura se puede separar del caldo fermentado (que no contiene ninguna cantidad apreciable de otros productos insolubles), por ejemplo, centrifugando el caldo fermentado a una fuerza g adecuada. El caldo fermentado puede contener entre 8 % y 16 % de levadura, preferentemente entre 10 % y 14 %; después de la centrifugación, la crema de levadura obtenida (también denominada en la presente descripción "levadura gastada") puede contener entre 40 % y 80 % de levadura. La corriente líquida separada como sobrenadante durante la etapa de centrifugación (también denominada "vino fermentado", es decir, líquido sin células de levadura) se puede procesar adicionalmente para extraer etanol, por ejemplo, destilar para recuperar etanol en una unidad de destilación.

Luego, la crema de levadura puede someterse a una etapa de recuperación de la levadura, al poner en contacto la levadura gastada con al menos un biocida oxidante a base de bromo como se detalló anteriormente.

En otras palabras, en algunas modalidades el método para producir etanol mediante fermentación propensa a contaminación procariótica comprende:

- a) proporcionar un sustrato fermentable;
- b) combinar dicho sustrato fermentable con levaduras en presencia de agua para obtener un caldo de fermentación;
- c) fermentar dicho caldo de fermentación para obtener un caldo fermentado;
- d) separar dicho caldo fermentado en levaduras gastadas y líquido que contiene etanol; y
- e) recuperar dicha levadura gastada,

en donde el proceso comprende además poner en contacto las levaduras recuperadas con al menos un biocida oxidante a base de bromo, obtenido mediante oxidación en el lugar de una fuente de bromuro inorgánico que es una solución que comprende ácido bromhídrico, o una sal de bromuro metálico (por ejemplo, una solución de HBr y urea oxidada en el lugar con hipoclorito) y opcionalmente con ácido sulfúrico diluido para obtener levadura recuperada.

Generalmente, la cantidad de levaduras que se recuperan (reciclado) viene dictada por las necesidades del proceso, y el exceso de levadura producida en el proceso se elimina opcionalmente para su posterior procesamiento o se desecha. Brevemente, las levaduras pueden ponerse en contacto consecutivamente con el(los) biocida(s) oxidante(s) a base de bromo como se define(n) en la presente descripción, y el ácido para asegurar la descontaminación. Alternativamente, las levaduras pueden ponerse en contacto primero con ácido, para reducir la carga biológica procariótica primaria, y luego con el biocida oxidante a base de bromo como se define en la presente descripción. El pH del medio se puede ajustar a cualquier valor adecuado de acuerdo con los requisitos de la cepa de levadura particular. Alternativamente, las levaduras pueden recuperarse mediante el uso de únicamente biocidas oxidantes a base de bromo, al obviar la necesidad de exponer los organismos fermentadores al ácido.

En otras palabras, la levadura se puede poner en contacto con una solución biocida oxidante a base de bromo como se describe en la presente descripción, opcionalmente simultáneamente con, precedido o sucedido por el tratamiento con ácido. El tratamiento con ácido de levadura se puede realizar en un recipiente de tratamiento de levadura designado, por ejemplo, al diluir la levadura gastada con agua (por ejemplo, en una proporción de 1:1) y reducir el pH a 1,8-2,5, por ejemplo, con ácido sulfúrico (98 %), e incubar durante aproximadamente 1 hora, a una temperatura entre 32 y 34 °C.

Además, la levadura se puede poner en contacto con el biocida oxidante a base de bromo de la presente invención en combinación con productos naturales que tienen propiedades antibacterianas, tal como, por ejemplo, compuestos de lúpulo (extraídos de *Humulus lupulus*), *propóleos* y *quitosano* así como también con bacteriófagos, que naturalmente antagonizan a las bacterias.

La suspensión de levadura recuperada puede transferirse al menos parcialmente para una etapa de fermentación adicional (por ejemplo, consecutiva) con sustrato fresco, por ejemplo, a una tina de fermentación vacía (reactor). Incluso mediante el uso del proceso brasileño convencional para la producción de etanol, es posible realizar dos ciclos de fermentación por día. Es evidente que aumentar la eficiencia del reciclaje de levadura mejorará los resultados generales del proceso.

La presente invención está dirigida a proporcionar control microbiano sobre la contaminación procariota de levadura, específicamente, especies bacterianas cuya presencia está asociada con la fermentación de etanol a base de levadura, a veces denominada "*contaminantes naturales*" de levadura. A modo de ejemplo no limitativo, los métodos de acuerdo con la invención son adecuados para el control de bacterias del ácido láctico (LAB), por ejemplo de los géneros (género) *Lactobacillus* (por ejemplo, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *L. vini*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. buchneri* y *L. brevis*), *Leuconostoc* (por ejemplo, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. citrovorum*, *L. dextranicum*), *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Weissella*, para el control de bacterias del ácido acético (AAB), por ejemplo del género *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Xanthomonas*, para el control de *E. coli* o cualquiera de sus combinaciones.

En modalidades específicas, las bacterias del ácido láctico a las que se aplica la presente descripción son del género *Lactobacillus*. En modalidades específicas adicionales, las bacterias del ácido láctico del género *Lactobacillus* son *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* o cualquiera de sus combinaciones.

El caldo fermentado de acuerdo con la presente invención contiene una fracción líquida y un sedimento sólido, que pueden separarse. Al separar la fracción líquida del caldo fermentado de la fracción sólida se obtiene *entre otros* una fracción sólida que contiene una cantidad mínima de biocida oxidante a base de bromo como se describe en la presente descripción. La fracción sólida de acuerdo con la presente invención se puede convertir además en granos secos de destilería (DDG) producto, que contiene una cantidad mínima de biocida oxidante a base de bromo y está esencialmente libre de antibióticos.

Preferentemente, el método de acuerdo con la presente invención evita por completo el uso de antibióticos, por lo tanto, en algunas modalidades preferidas particularmente, el proceso está esencialmente libre de antibióticos (específicamente, se realiza en ausencia de antibióticos). Es decir, el biocida oxidante a base de bromo como se describe en la presente descripción suele ser suficiente para mantener el cultivo de levadura libre de contaminación. Sin embargo, se prevé que algunos contaminantes pueden ser particularmente difíciles de controlar incluso en los niveles de dosificación más altos aplicados del biocida

oxidante a base de bromo. En tales casos, el proceso puede comprender proporcionar un antibiótico durante el proceso, por ejemplo al sustrato fermentable, al caldo fermentable y/o a la levadura. En otras palabras, el biocida oxidante a base de bromo como se describe en la presente descripción se puede aplicar en combinación con antibióticos, es decir, antes, después o simultáneamente que los antibióticos. Puede usarse cualquier agente antibiótico en el marco de la presente invención, preferentemente un agente antibiótico que elimine los contaminantes bacterianos sin dañar la levadura durante la fermentación. A manera de ejemplo, el agente antibiótico puede ser monensina, penicilina, virginiamicina, eritromicina, tilosina y tetraciclina, por nombrar sólo algunos. El agente antibiótico se puede aplicar en una dosis de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 ppm. El agente antibiótico se puede aplicar preferentemente durante la etapa de reciclaje de la levadura. Se observa que cuando se usa el antibiótico, se usa en una concentración inferior a la necesaria para controlar la contaminación en condiciones idénticas, pero sin el uso de biocida oxidante a base de bromo. Por ejemplo, cuando se usa antibiótico, puede usarse en una cantidad inferior al 70 % de la cantidad necesaria para controlar la contaminación en condiciones idénticas, pero sin el uso de biocida oxidante a base de bromo, preferentemente, por debajo del 50 %, con mayor preferencia por debajo del 30 %.

EJEMPLOS

Materiales

Los medios de cultivo, reactivos y soluciones usados se detallan en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1 Lista de materiales

Producto	Descripción	Fabricante
Agar Sabouraud Dextrosa	Medio de cultivo que contiene dextrosa (40 gr/l), digesto péptico de tejido animal (5 gr/l), digesto pancreático de caseína (5 gr/l) y agar (15 gr/l).	Neogen
Agar Nutriente (NA)	Medio de cultivo que contiene extracto de carne (3 gr/l), digesto enzimático de gelatina (5 gr/l) y agar (15 gr/l)	Neogen
Agar MRS	Medio de cultivo que contiene extracto de carne de vacuno (10 gr/l), peptona proteosa núm. 3 (10 gr/l), extracto de levadura (5 gr/l), dextrosa (20 gr/l), polisorbato 80 (1 gr/l), amonio citrato (2 gr/l), acetato de sodio (5 gr/l), sulfato de magnesio (0,1 gr/l), sulfato de manganeso (0,05 gr/l), fosfato dipotásico (2 gr/l) y Agar (15 gr/l)	Difco

Producto	Descripción	Fabricante
Neutralizador universal	Una solución que contiene Tween 80 (30 gr/l, Sigma), saponina (30 gr/l, Sigma), lecitina (3 gr/l, Across), tiosulfato de sodio (7,84 g/l, Merck), NaCl (8,5 gr/l, Merck), histidina (1 gr/l, Merck) y triptona (1 gr/l, Neogen)	Preparado por los inventores
Solución tampón de ácido cítrico, pH=3,5	Una solución que contiene Na ₂ HPO ₄ (4 gr/l, Merck) y ácido cítrico (4,66 gr/l, Merck)	Preparado por los inventores
Solución tampón de ácido cítrico, pH=5,5	Una solución que contiene Na ₂ HPO ₄ (7,89 gr/l, Merck), ácido cítrico (4,66 gr/l, Merck)	Preparado por los inventores
Neutralizador de tiosulfato de sodio	Tiosulfato de sodio (7,84 g/l, Merck)	Merck
Solución tampón de fosfato	1,25 ml de KH ₂ PO ₄ solución madre (que contiene 34 gr/l de KH ₂ PO ₄ (Merck) en 1 litro de agua)	Preparado por los inventores
Cuentas de vidrio	Se usan para preparar los cultivos de prueba	
Bactebrom™	Urea-HBr ac. Solución. 35 % como HBr	ICL
DBNPA	2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida	ICL
jugo de caña de azúcar natural	jugo de caña de azúcar natural derivado de la molienda de la caña de azúcar	Productor brasileño
papaína	Papaína pura	Dinamica
Eritrosina	Eritrosina	Dinamica

Microorganismos

Las pruebas se realizaron mediante el uso de las siguientes tres (3) especies de bacterias y una de levadura, todas obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC):

Escherichia coli, también conocido como *E. coli* o *E. coli* 8739 (ATCC 8739);

Lactobacillus fermentum, también conocido como *L. fermentum* o "*Lactobacillus* 9338" (ATCC 9338);

Lactobacillus plantarum, también conocido como *L. plantarum* o *Lactobacillus plantarum* 8014 (ATCC 8014); y

Saccharomyces cerevisiae, también conocido como *S. cerevisiae* o "saccharomyces" (ATCC 9763).

Levadura para microscopía óptica

Las levaduras para microscopía óptica se basaron en levadura de pan fresco comercial (*Saccharomyces cerevisiae*, levadura de pan fresco Itaiquara®, conservada a unos 4 °C hasta su uso) y en *Saccharomyces cerevisiae* industrial que consiste de crema de levadura recolectada en una destilería del estado de São

Paulo (temporada 2020/21), justo después de la etapa de centrifugación y antes del tratamiento ácido. La crema de levadura se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Preparación de biocida mediante activación de solución de HBr/urea.

El biocida se preparó mediante activación de una solución de HBr/urea mediante el uso de hipoclorito sódico (también denominado en la presente descripción Bactebrom™ activado) como sigue.

Solución madre 1: 8,94 gr de Bactebrom™ de ICL-IP (HBr: solución de urea) diluido con 241,06 gr de agua destilada.

Solución madre 2: NaOCl ~1 % preparado con 23,58 gr de NaOCl 10,6 % p/p diluido con 226,42 gr de agua destilada.

Se añadió gradualmente la solución madre 2 (250,00 g de NaOCl al 1,0 %) mientras se agitaba a la solución de Bactebrom™ diluido anteriormente (solución madre 1), para obtener el biocida activo (solución naranja) - peso total 500,00 gr. Concentración esperada de biocida determinada mediante valoración yodométrica mediante el uso de Titroprocessor: Titrino 848 plus.: ~ 0,5 % como Cl₂ (~5000 ppm como Cl₂ o TCE). El nivel de dosificación de biocida deseado en cada experimento se obtuvo mediante dilución con agua destilada.

Métodos

Preparación de suspensiones microbianas

Las bacterias *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* y las dos *Lactobacillus* se subcultivaron a partir del cultivo madre al sembrarlas en placas de cultivo que contenían agar Sabouraud Dextrosa, NA y MRS, respectivamente. Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 30 ± 2 °C para *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* y a 37 ± 2°C para los dos *Lactobacillus*. Luego, se preparó un segundo subcultivo a partir del primer subcultivo, de la misma manera, y los cultivos se incubaron como se detalló anteriormente, específicamente, de 18-24 horas a 30 ± 2°C para *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae* y a 37 ± 2°C para *Lactobacillus*.

Para preparar una suspensión de prueba microbiana, se colocó una solución tampón fosfato estéril (10 ml) en un matraz de 100 ml con 5 g de cuentas de vidrio. Se transfirió un bucle lleno de células del cultivo cultivado durante la noche al tampón fosfato. El matraz se agitó durante 3 minutos mediante el uso de un vórtex. La suspensión se aspiró de las cuentas de vidrio y se transfirió a otro tubo. El número de células en la suspensión se ajustó, por medio de una curva de calibración, a $1,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^7$ UFC/ml (unidades formadoras de colonias por ml), mediante el uso de solución tampón de fosfato.

Procedimiento de prueba de eficacia

La eficacia (la actividad antimicrobiana) de Bactebrom™ activado (en concentraciones de entre 0,5 a 2,5 ppm como Cl_2) y la eficacia de la 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida (DBNPA, en concentraciones entre 0,5 a 5 ppm) frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, contra *E. coli* y contra dos lactobacterias que se encuentran comúnmente en el proceso fermentativo: *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* a pH=5,5 y pH=3,5 (cada uno con un número de cepa y una fuente especificados como se detalla anteriormente) de acuerdo con una modificación de la norma europea EN 1040: 2005: "Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics – Tests method and requirements (phase 1)", como generalmente se describe más abajo.

Las pruebas se realizaron de la siguiente manera. Se transfirió solución tampón de fosfato (100 ± 2 ml) a matraces estériles. Se prepararon matraces duplicados para cada concentración de biocida analizada. Además, se prepararon controles duplicados sin biocidas. Cada recipiente de prueba se llevó a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e inoculado con cultivo puro para lograr un recuento microbiano de al menos 10^6 UFC/ml en el tiempo cero, después de lo cual se añadió la solución madre de biocida a los matraces duplicados de manera que el volumen de madre de biocida agregado no exceda el 1 % del volumen total del matraz. Los matraces se colocaron en un agitador para proporcionar mezcla, a una temperatura constante de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante los periodos de contacto.

Después de un período de tiempo de 1 hora $\pm$ 5 minutos de tiempo de contacto, se pipeteó 1 ml de la mezcla analizada en un tubo que contenía 9,0 ml de neutralizador

(neutralizador de tiosulfato de sodio para condiciones de pH=5,5 y neutralizador universal para condiciones de pH=3,5, ambos neutralizadores preparados como se describe anteriormente). Después de un período de tiempo de 5 min $\pm$ 10 s, se tomó una muestra de 1 ml (por duplicado) y después de una dilución seriada, se inoculó por el método de vertido en placa en una placa de Petri que contenía agar NA para *E. coli*, agar Sabouraud para *S. cerevisiae* y agar MRS para los dos lactobacillus (*L. fermento* y *L. plantarum*). Las placas se incubaron a 37 $\pm$ 2°C durante 48 horas para ambos lactobacillus y a 30 $\pm$ 2°C durante 48 horas para *E. coli* y *S. cerevisiae*. Después de la incubación, se observó un crecimiento visible y se contaron y registraron las unidades formadoras de colonias (UFC).

Preparación de muestras de levadura para microscopía óptica

Se trituró levadura de pan fresca comercial en jugo natural de caña de azúcar (4 gr de levadura en 500 ml de jugo) dando como resultado una concentración de células de levadura de aproximadamente 10⁸ UFC/ml. La *Saccharomyces cerevisiae* industrial (específicamente, crema de levadura obtenida de una destilería como se detalló anteriormente) consiste de un concentrado de células de levadura (cultivo) y contaminación bacteriana (presente de forma natural) obtenida de la industria del azúcar y el etanol. Las muestras se descongelaron 24 horas antes de la prueba, a temperatura ambiente (específicamente, temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C) y luego se agregaron a jugo de caña de azúcar fresco (100 ml de jugo) y se dejaron durante toda la noche a temperatura ambiente.

Análisis de viabilidad de levaduras mediante microscopía óptica

La viabilidad de la levadura se evaluó de acuerdo con el método estándar aplicado por los destiladores de etanol brasileños (Ceccato-Antonini, SR Microbiologia da fermentação alcoólica – A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. Tecnologia Sucroalcooleira – Coleção UAB-UFSCar 105p, 2010), como se detalla más abajo. Se añadió jugo de caña de azúcar fresco (250 ml) a la crema de levadura (levadura de pan o levadura industrial recolectada como se detalló anteriormente) mientras se mezclaba. En cada ensayo, se trataron 50 ml de la mezcla de levadura resultante con diferentes concentraciones de Bactebrom™ a 0 ppm (control), 2,5 y 5 ppm (como Cl₂ o TCE) durante un período de 1 hora, al agregar Bactebrom™ activado al nivel de dosificación deseado. Se recogieron

muestras en los momentos inicial y final del tratamiento y se añadió papaína (a 5 mg) a cada una de las muestras. A continuación, (después de 5 minutos), las muestras se diluyeron 10 o 100 veces y se tiñeron con eritrosina (solución al 0,02 % preparada en tampón fosfato). Los números de células de levadura viables (células transparentes) y muertas (coloreadas de rojo) se contaron mediante microscopía óptica en una Cámara de Neubauer Mejorada (profundidad: 0,1 mm, 25 cuadrados con 16 retículas y 400 cámaras, HBG), mediante el uso de una lente de 40x. La viabilidad se calculó como el porcentaje de células viables sobre el número total de células de levadura (tanto viables como muertas).

EJEMPLOS 1-6

El efecto antibacteriano de Bactebrom™

El efecto de Bactebrom™ activado se probó en tres cepas bacterianas diferentes, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *E. coli* y se comparó su efecto sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como se detalla anteriormente y se resume en la Tabla 2 más abajo (en relación con los Ejemplos 1-6). Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 1 a la Figura 6 (correspondientes a los Ejemplos 1-6).

Tabla 2 Cepas bacterianas y condiciones de pH en los Ejemplos 1-6

Ejemplo Núm.	Cepa bacteriana	pH	Figura núm.
1	<i>L. fermentum</i>	5.5	1
2	<i>L. fermentum</i>	3.5	2
3	<i>L. plantarum</i>	5.5	3
4	<i>L. plantarum</i>	3.5	4
5	<i>E. coli</i>	5.5	5
6	<i>E. coli</i>	3.5	6

Las Figuras 1-6 muestran que Bactebrom™ activado es un agente antibacteriano eficaz contra todas las bacterias probadas, en todas las concentraciones probadas de las mismas y en ambas condiciones de pH probadas, después de un tiempo de contacto de 1 hora con las bacterias. Sorprendentemente, a las concentraciones biocidas de 0,5 y 1 ppm, no hubo ningún efecto o fue insignificante sobre la viabilidad de la levadura. Además, incluso en una concentración de 2,5 ppm, Bactebrom™ tuvo un efecto marginal sobre la levadura analizada, al tiempo que demostró un efecto biocida.

EJEMPLOS 7-10 - comparativos
El efecto antibacteriano de DBNPA

A continuación, el efecto de DBNPA fue probado en las dos cepas bacterianas diferentes, *L. fermentum* y *L. plantarum* y se comparó su efecto sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como se detalla anteriormente y se resume en la Tabla 3 más abajo (en relación con los Ejemplos 7-10). Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 7 a la Figura 10, correspondientes a los Ejemplos 7-10.

Tabla 3 Cepas bacterianas y condiciones de pH en los Ejemplos 7-10

Ejemplo Núm.	Cepa bacteriana	pH	Figura núm.
7	<i>L. fermentum</i>	5.5	7
8	<i>L. fermentum</i>	3.5	8
9	<i>L. plantarum</i>	5.5	9
10	<i>L. plantarum</i>	3.5	10

Como se muestra en las Figuras 7-10, cuando DBNPA estaba en concentraciones comparables a las concentraciones biocidas de Bactebrom™ activado, no hubo efecto o fue insignificante tanto en las cepas bacterianas como en la levadura, después de un tiempo de contacto de 1 hora, en ambas condiciones de pH probadas. No obstante lo anterior, se demostró un efecto biocida menor contra *Lactobacillus fermentum* a pH 3,5.

EJEMPLO 11
Pruebas de viabilidad de levaduras mediante microscopía óptica

El efecto de Bactebrom™ activado a 2,5 y 5 ppm de TCE sobre la viabilidad de la levadura también se evaluó mediante análisis de microscopía óptica, como se detalla anteriormente.

Brevemente, la viabilidad de la levadura en presencia de Bactebrom™ se evaluó aplicando Bactebrom™ activado en niveles de dosificación de 0, 2,5 y 5 ppm de TCE a muestras de levadura de pan o de levadura industrial preparadas como se detalla anteriormente. Después de un período de incubación de una hora, se añadió papaína (5 mg) y después de 5 minutos de incubación adicional, las muestras se diluyeron, se tiñeron con eritrosina y se contó el número de células de levadura

viables y muertas mediante el uso de microscopía óptica como se describió anteriormente. La viabilidad se calculó como el porcentaje de células viables del número total de células de levadura (es decir, células de levadura viables y muertas). Los resultados se resumen en la Tabla 4 más abajo.

Tabla 4: Viabilidad de la levadura (% de células viables/levadura total) después de ningún tratamiento (Control), 2,5 y 5 ppm (como Cl₂) de Bactebrom™ activado.

Exp. Núm.	1		2		3		4		5	
Levadur a	Levadura de pan		Levadura de pan		Levadura de pan		Ind. Levadura		Ind. Levadura	
	Viabilidad de la levadura (%)		Viabilidad de la levadura (%)		Viabilidad de la levadura (%)		Viabilidad de la levadura (%)		Viabilidad de la levadura (%)	
Trat.	T0	Tf (1 h)	T0	Tf (1 h)	T0	Tf (1 h)	T0	Tf (1 h)	T0	Tf (1 h)
Control	ND	79,3	65,1	38,8	94	94,7	83	85,6	87,5	81,3
2,5 ppm Bacteb.	ND	98,6	ND	42,1	ND	100,0	ND	87,3	ND	89,7
5 ppm Bacteb.	ND	89	ND	41,3	ND	94,5	ND	85,9	ND	87,0

Abreviaturas: T0, medida de la viabilidad celular obtenida antes de la incubación con Bactebrom; Tf(1 h), medición de la viabilidad celular después de 1 hora de incubación con Bactebrom; ND, no determinado; Bacteb, Bactebromo; Ind. Levadura, levadura industrial.

Como se evidencia de la Tabla 4, la exposición de la levadura al biocida Bactebrom™ activado no produjo ninguna reducción en la viabilidad de la levadura o una mejora de la viabilidad de la levadura, como se muestra en presencia de Bactebrom™ activado a 2,5 ppm de TCE. Curiosamente, en todos los ensayos realizados (5 experimentos en total) la viabilidad después del tratamiento con Bactebrom™ activado a 2,5 ppm de TCE fue mayor en comparación con la medición de control, lo que demuestra que Bactebrom™ activado no afectó la viabilidad de la levadura e incluso tuvo un efecto beneficioso.

La mejora de la viabilidad puede contribuir al hecho de que el biocida ha eliminado específicamente y sólo las bacterias dañinas que pueden provocar una reducción

de la viabilidad de la levadura, lo que conduce, entre otras cosas, a una reducción del rendimiento del proceso de fermentación.

En general, los resultados obtenidos muestran que Bactebrom™ activado aplicado en determinadas concentraciones puede actuar de manera selectiva sobre las bacterias y eliminar las contaminaciones bacterianas sin dañar el crecimiento de la levadura. El efecto beneficioso mostrado por Bactebrom™ activado puede mejorar la viabilidad de la levadura y, en consecuencia, mejorar el rendimiento de etanol en los procesos de fermentación basados en levadura. Además, dado que Bactebrom™ es un biocida no antibiótico, su uso evitará la formación de bacterias tolerantes y resistentes en el proceso de fermentación, y no habrá residuos de antibióticos en la levadura seca recuperada del proceso de fermentación.