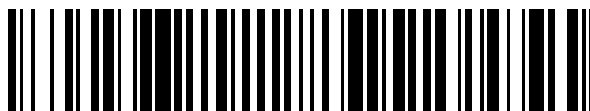


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 030**

51 Int. Cl.:

A01N 59/08 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

A01N 59/00 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2007 E 07796269 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 2192840**

54 Título: **Proceso para prevenir el crecimiento bacteriano en procesos de fermentación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2013

73 Titular/es:

**E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY
(100.0%)
1007 MARKET STREET
WILMINGTON, DE 19898, US**

72 Inventor/es:

**SUMNER, ERIC GUY;
OKULL, DERRICK y
DISCHERT, DWAYNE WILLIAM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 401 030 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para prevenir el crecimiento bacteriano en procesos de fermentación

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un proceso de fermentación para producir etanol y, de manera específica, a un proceso en el que se evita sustancialmente la infección bacteriana.

Antecedentes de la invención

10 A medida que se agotan las reservas de petróleo y se eleva su precio, se incrementa la necesidad de fuentes de energía alternativas y, preferentemente, sostenibles. Desde hace algunos años, se considera y se utiliza el etanol como una opción para la sustitución parcial o completa de los combustibles basados en el petróleo en diferentes aplicaciones. Los automóviles impulsados por etanol son una realidad. El etanol tiene ventajas sobre el uso de la gasolina convencional como fuente de combustibles renovables.

15 El etanol es un importante producto químico, que ha sido producido por el hombre durante milenios a partir de fuentes naturales. Actualmente, el etanol se produce a gran escala a partir de fuentes naturales a través de un proceso de fermentación en el que levaduras convierten el azúcar en etanol y dióxido de carbono. Pueden usarse numerosas materias primas para suministrar el azúcar que se va a fermentar. Fuentes naturales actuales incluyen maíz, milo (*variedad africana del sorgo*), trigo, avena, mijo, paja, sorgo, caña de azúcar, remolacha, melaza, suero de leche y patatas. De hecho, cualquier almidón o material celulósico, lo cual incluye prácticamente todas las plantas, se puede utilizar como fuente de azúcar usado en la producción de etanol, dado que el almidón o la celulosa pueden ser precursores de azúcar.

20 Un problema importante de los sistemas de fermentación convencionales es la dificultad para prevenir la contaminación microbiana, en especial la infección bacteriana. Desgraciadamente, la atmósfera óptima para la fermentación también es extremadamente propicia para el crecimiento de bacterias. Las bacterias pueden convertir azúcar (glucosa) en ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido láctico más que en etanol. Además, las bacterias crecen rápidamente en el ambiente rico en nutrientes de un sistema de fermentación, y muchas de ellas consumen azúcar (glucosa) más rápidamente que las levaduras. Por otra parte, los ácidos orgánicos producidos por las bacterias inhiben el rendimiento y el crecimiento de las levaduras. De este modo, la infección bacteriana tiene como consecuencia un rendimiento menor de etanol y el proceso de fermentación pierde rentabilidad económica.

25 Las estrategias industriales actuales para combatir la infección bacteriana en los sistemas de fermentación incluyen la supervisión de la presencia de ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético y ácido láctico), seguida de un tratamiento para corregirla. Es decir, cuando se detectan ácidos, se pueden agregar antibióticos o biocidas para controlar el crecimiento bacteriano. Sin embargo, el crecimiento y las infecciones bacterianas son un problema recurrente. Cualquier elemento que se suministre a un sistema de fermentación tal como agua, macerado, enzimas y levaduras, así como el propio tanque de fermentación (si no se desinfecta entre lotes) puede ser una fuente de bacterias. Por lo tanto, se requiere una supervisión frecuente y puede ser necesario introducir antibióticos repetidamente.

35 El uso de antibióticos para reducir el crecimiento bacteriano en un sistema de fermentación está siendo cuestionado. Determinados antibióticos se mantienen y acumulan en los productos sólidos de fermentación si no son desactivados por la reacción con las bacterias diana. Los productos sólidos incluyen granos secos de destilador con solubles (DDGS, por sus siglas en inglés) y granos húmedos de destilador con solubles (DWGS, por sus siglas en inglés). DDGS y DWGS son valiosos productos secundarios de la fermentación que se usan en la alimentación animal. En muchos países, la cantidad de antibióticos en la nutrición animal se encuentra bajo control regulatorio o se está considerando su inclusión.

40 Por lo general, los biocidas tienen un rendimiento bajo en los sistemas de fermentación porque carecen de especificidad y también pueden atacar las levaduras. El dióxido de cloro estabilizado (SCD) es un biocida que se ha utilizado en sistemas de fermentación para tratar infecciones bacterianas. En tanto que las levaduras parecen no verse afectadas, este tratamiento es correctivo, es decir, se aplica solo después de que el sistema haya desarrollado una infección. Tal como se ha indicado anteriormente, pueden ser necesarias adiciones repetidas.

45 La Patente de EE.UU. 4.929.365 describe un proceso de tratamiento correctivo para eliminar microorganismos y biopelículas producidas por los mismos que, seguidamente, colonizan la biopelícula desde un sustrato sumergido en un ambiente acuoso. El proceso utiliza dióxido de cloro estabilizado (SCD) que se introduce en el sustrato y se hace penetrar a través de la biopelícula de protección y en la capa de microorganismos. Para crear un ambiente ácido en el interior de la biopelícula se requiere una fuente de nutrientes. El ambiente ácido activa el SCD que, por su parte, mata y destruye los microorganismos y la biopelícula desde el sustrato sumergido.

50 El documento WO 2004/072291 describe un procedimiento de reducción del crecimiento de bacterias en un proceso de fermentación, que comprende introducir ácidos de lúpulo en un sistema de fermentación que comprende un

inoculador (levadura) y melaza de remolacha a una concentración de ácido acético y ácido láctico entre 0,1 y 0,2% (p/v) y entre 0,6 y 0,8%, respectivamente.

5 Una alternativa al tratamiento correctivo es la prevención del crecimiento bacteriano. Se ha utilizado la adición de antibióticos en cantidades capaces de impedir el crecimiento de bacterias. No obstante, persiste el problema de la acumulación de antibióticos en los sólidos de fermentación. El desarrollo de resistencia bacteriana es también una consecuencia bien conocida del uso de antibióticos.

Existe, por consiguiente, la necesidad de prevenir el crecimiento bacteriano en el proceso de fermentación, reduciendo o eliminando al mismo tiempo el uso de antibióticos. La presente invención satisface esta necesidad.

Resumen de la invención

10 La presente invención ofrece un procedimiento para prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias en un sistema de fermentación, que comprende la introducción de un azúcar fermentable, un inoculante y un dióxido de cloro estabilizado en un sistema de fermentación en el que el inoculante convierte el azúcar en etanol y dióxido de carbono; y en el que se agrega dióxido de cloro estabilizado, en una cantidad eficaz para prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias, a uno o más de los elementos consistentes en el azúcar fermentable, el inoculante, o el sistema de fermentación, en concentraciones en el sistema de fermentación de ácido acético no mayores que 0,30% (peso/volumen) y de ácido láctico no mayores que 0,60% (peso/volumen). El dióxido de cloro estabilizado comprende al menos un complejo de oxi-cloro que contiene dióxido de cloro, un componente que contiene clorita, o un elemento capaz de formar dióxido de cloro en un medio líquido cuando se expone a un ácido. La cantidad de dióxido de cloro estabilizado agregada es de aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 5%, basada en el peso de dióxido de cloro activado que se puede producir y el peso total del sistema de fermentación.

15 El dióxido de cloro estabilizado se puede agregar a uno o más de los elementos consistentes en el azúcar fermentable, el inoculante, o el sistema de fermentación, en una cantidad eficaz para prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias y, por lo tanto, la formación de ácidos orgánicos en el sistema. Preferentemente, el dióxido de cloro estabilizado se agrega al sistema de fermentación antes de la adición del azúcar fermentable o antes de la adición del inoculante al sistema de fermentación, más preferentemente antes de la adición del inoculante.

Breve descripción del dibujo

Figura 1 muestra la densidad óptica de células bacterianas suspendidas en medio de cultivo líquido; se agregó dióxido de cloro estabilizado a concentraciones crecientes al medio de cultivo que contenía las células y se monitorizó la densidad óptica durante un periodo de 22 horas.

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la producción industrial de etanol por medio de fermentación. A continuación, se describe la forma en que este proceso se puede llevar a cabo usando maíz como materia prima. El experto en la técnica entenderá que este proceso se puede variar usando, por ejemplo, otras materias primas.

35 El etanol se puede producir a partir del maíz o de otros granos en procedimientos de molienda húmeda y seca, tal como son conocidos por los expertos en la técnica. En el procedimiento de molienda húmeda, el maíz se empapa o impregna y, a continuación, se separa en componentes. En el procedimiento de molienda seca, se tritura el maíz hasta formar harina y se procesa sin separación. El componente almidón de maíz procedente de la molienda húmeda o la harina del procedimiento de molienda seca se mezclan con agua y se someten a cocción para solubilizar el almidón.

40 El almidón de maíz es un polisacárido, es decir, un polímero compuesto por unidades individuales de glucosa. El almidón se convierte en polisacáridos más pequeños (más cortos), es decir, dextrinas, por medio de enzimas (α -amilasa). Los polisacáridos de menor tamaño se convierten en un azúcar fermentable, es decir, glucosa (monosacárido), usando la enzima glucoamilasa.

45 El procedimiento para producir etanol comprende, seguidamente, fermentar el azúcar en un reactor semicontinuo o continuo, poniendo en contacto el azúcar con un inoculante tal como levadura, en un sistema de fermentación, para producir un producto de fermentación que comprende etanol y dióxido de carbono. Etapas subsiguientes incluyen la destilación del producto de fermentación para retirar aproximadamente 95% del líquido, así como los sólidos y producir un etanol destilado que comprende aproximadamente 5% de agua; y deshidratar el etanol destilado, produciendo de este modo etanol al 100% (200 proof). Etapas adicionales comprenden la desnaturalización del etanol desecado mezclándolo en aproximadamente 2 a 5% de gasolina u otro aditivo para usos distintos de la elaboración de bebidas alcohólicas; y recuperación del dióxido de carbono y de los sólidos producidos. Etapas adicionales en la producción de etanol para bebidas pueden incluir envejecimiento, mezclado y embotellado tal como se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. 2006/0159812 A1. Estas etapas adicionales se describen también en la obra de Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, "Beverage Spirits, Distilled", por John E. Bujake, John Wiley & Sons, Inc. (Nueva York), 2001. Los expertos en la técnica conocen estas etapas.

Los procedimientos para la producción de etanol se llevan a cabo bajo condiciones que no impiden la introducción de bacterias en los sistemas de fermentación. Las fuentes de bacterias en un sistema de fermentación pueden incluir cualquiera de los suministros (azúcar fermentable, inoculante) introducidos en el sistema. Una limpieza inadecuada de los sistemas de fermentación entre lotes o ciclos puede representar, igualmente, una fuente de bacterias para fermentaciones posteriores. Las infecciones bacterianas de los sistemas de fermentación producen ácidos orgánicos como productos secundarios a partir del azúcar fermentable, en particular ácido acético y ácido láctico. De esta forma, las bacterias consumen ingredientes (azúcar fermentable) e inhiben la actividad del inoculante. La levadura produce también ácidos acético y láctico durante la fermentación, pero en cantidades insuficientes para interferir de manera significativa con el rendimiento global y la eficacia del proceso que se describe en este documento. Concentraciones crecientes de los ácidos orgánicos indican un aumento de infecciones bacterianas en el sistema de fermentación.

En el procedimiento de la presente invención, se agrega dióxido de cloro estabilizado (SCD) a uno o más de los elementos siguientes: azúcar fermentable, inoculante o el sistema de fermentación, en una cantidad eficaz para prevenir sustancialmente el crecimiento bacteriano y, de esta forma, la formación de ácidos orgánicos en el sistema. En este contexto, el SCD se agrega antes de la aparición de un crecimiento sustancial de bacterias en el sistema, por ejemplo antes de la introducción de cualquiera o de todos los ingredientes necesarios para iniciar el proceso de fermentación, o según la determinación de las concentraciones de ácido acético y ácido láctico en el sistema. Por consiguiente, en presencia de SCD se impide sustancialmente el crecimiento bacteriano en el sistema de fermentación. Sorprendentemente, el SCD permanece en el sistema y se evita de manera sustancial que las bacterias crezcan y contaminen el producto por la generación *in situ* de dióxido de cloro activado, es decir, ClO₂, por la reacción de SCD con los ácidos producidos en el sistema.

Con el fin de prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias y la formación significativa de ácidos orgánicos en un sistema de fermentación, el dióxido de cloro estabilizado se agrega a una concentración de ácido acético no mayor que 0,30% (peso/volumen) y a una concentración de ácido láctico no mayor que 0,60% (peso/volumen). A concentraciones de ácidos por encima de estos niveles, se producen un efecto perjudicial importante sobre la levadura y un descenso significativo del rendimiento de etanol por la conversión del azúcar. De este modo, la adición de dióxido de cloro estabilizado por encima de los niveles citados sería una solución correctiva, dado que ya se ha producido un crecimiento bacteriano importante tal como lo indican las concentraciones de ácidos orgánicos.

Azúcar fermentable

Básicamente, se puede obtener un azúcar fermentable adecuado para usar en esta invención a partir de cualquier fuente vegetal que comprenda azúcar, almidón y/o celulosa. Esto significa que se pueden convertir el almidón y/o la celulosa mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, con el empleo de enzimas, en un azúcar apto para ser usado como azúcar fermentable en esta invención. El azúcar fermentable se puede obtener a partir de uno o múltiples productos a base de granos tales como maíz, astillas de madera, paja de trigo, rastrojo de maíz, brotes de hierba. Alternativamente, el azúcar fermentable se puede obtener a partir de milo, avena, sorgo, caña de azúcar, remolacha, melaza, suero de leche, patatas. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para convertir estas fuentes en azúcar fermentable. De manera conveniente, el azúcar fermentable se deriva del maíz, usando el procedimiento de molienda húmeda o molienda seca para producir un almidón licuado. El almidón licuado se somete a sacarificación en la que el almidón se pone en contacto con enzimas para convertir el almidón en glucosa, formando de este modo el azúcar fermentable.

El término "macerado" se usa en este documento para hacer referencia a una composición que comprende un azúcar fermentable. El macerado incluye cualquier mezcla de granos mixtos u otros carbohidratos fermentables en agua que se utilizan en la producción de etanol en cualquier etapa, desde la mezclado del azúcar fermentable en agua hasta antes de cualquier cocción y la sacarificación hasta la finalización de la fermentación, según se define en Jacques, K.A., Lyons, T.P., Kelsall, D.R., "The Alcohol Textbook", 2003, 426-424, Nottingham University Press, Reino Unido.

En un proceso de fermentación, el azúcar se encuentra presente en el sistema de fermentación típicamente en una concentración en el intervalo de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40% (peso/volumen), preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10 a 35% (peso/volumen).

Inoculante

A los efectos del presente documento, un inoculante es un microorganismo capaz de convertir un azúcar fermentable en etanol. Inoculantes frecuentemente utilizados en la fermentación de etanol son las levaduras. Las levaduras son microorganismos capaces de vivir y crecer en entornos tanto aeróbicos (con oxígeno) como anaeróbicos (carentes de oxígeno).

La discusión siguiente se refiere a un procedimiento en el que el inoculante es levadura.

Con respecto a las bacterias, las levaduras pueden tener tasas de fermentación moderadas a bajas. Para compensar su tasa metabólica, pueden ser necesarias grandes cantidades de levadura en la producción industrial de etanol a gran escala. Antes de introducir levaduras en un tanque de fermentación, se produce un inóculo de

levadura en un tanque de preparación, separado del tanque de fermentación. En un tanque de propagación, se alimenta un cultivo iniciador de levadura con una composición de nutrientes que pueden comprender azúcar fermentable, enzimas y agua para activar o hacer crecer la levadura. También se produce propagación de la levadura durante la etapa de fermentación. Sin embargo, la activación de la levadura en un tanque de propagación proporciona una levadura altamente activa tras su introducción en el tanque de fermentación.

La levadura inoculante se agrega al sistema de fermentación en una cantidad típica de aproximadamente 1,0 kilogramo de levadura seca por 8.000 litros de composición que comprende azúcar fermentable, es decir, macerado. Los tiempos de espera típicos para la etapa de fermentación tras esta carga de levadura son de entre 40 y 72 horas. Los expertos en la técnica sabrán que la cantidad de levadura agregada puede variar junto con los tiempos de espera.

Dióxido de cloro estabilizado

La expresión "dióxido de cloro estabilizado" como se usa en este documento significa uno o múltiples complejos de oxi-cloro que contienen dióxido de cloro, y/o uno o múltiples componentes que contienen clorita, y/o uno o múltiples elementos adicionales capaces de formar dióxido de cloro en un medio líquido cuando son expuestos a un ácido. De este modo, el dióxido de cloro estabilizado comprende al menos un complejo de oxi-cloro que contiene dióxido de cloro, un componente que contiene clorita o un elemento capaz de formar dióxido de cloro en un medio líquido cuando se le expone a un ácido. En la presente invención, el dióxido de cloro estabilizado reacciona con un ácido orgánico tal como ácido acético y/o ácido láctico producido, por ejemplo, por bacterias contaminantes. Cuando es activado por un ácido, el dióxido de cloro es un biocida de amplio espectro, capaz de eliminar el impacto perjudicial de las bacterias contaminantes en un sistema de fermentación. El dióxido de cloro estabilizado se denomina también "precursor de dióxido de cloro", o se abrevia en este documento como "SCD".

Los complejos preferidos de oxi-cloro que contienen dióxido de cloro se seleccionan del grupo consistente en un complejo de dióxido de cloro con carbonato, un complejo de dióxido de cloro con bicarbonato, y mezclas de los mismos. Ejemplos de componentes que contienen clorita incluyen cloritas metálicas y, en particular, cloritas de metales alcalinos y metales alcalino-térreos. Un ejemplo específico de un componente que contiene clorita, que resulta útil como precursor de dióxido de cloro, es la clorita sódica, que se puede utilizar como clorita sódica de calidad técnica. La composición química exacta de muchos dióxidos de cloro estabilizados y, en especial, de los complejos de dióxido de cloro no está completamente definida. La fabricación o producción de determinados precursores de dióxido de cloro se describe en Gordon, Patente de EE.UU. 3.585.147 y Lovely, Patente de EE.UU. 3.591.515. Ejemplos específicos de dióxidos de cloro estabilizados incluyen, por ejemplo, ANTHIUM DIOXIDE, disponible en International Dioxide Inc., North Kingstown, RI; OXINE y PUROGENE, disponibles en Bio-Cide International, Inc., Norman, OK.

El dióxido de cloro estabilizado (precursor de dióxido de cloro), SCD, se puede suministrar en un medio líquido a una concentración predeterminada, por ejemplo, a una concentración seleccionada para proporcionar una cantidad desinfectante de dióxido de cloro en respuesta al menos a un factor diferente de la presencia de los ácidos orgánicos que se deben reducir. Preferentemente, el medio líquido contiene suficiente SCD para alcanzar una concentración potencial de dióxido de cloro en el intervalo de aproximadamente 0,002% hasta aproximadamente 40% en peso, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2% hasta aproximadamente 25% en peso, en base al peso total del medio líquido, incluidos los complejos que contienen dióxido de cloro, y/o uno o múltiples componentes que contienen clorita, y/o uno o múltiples elementos adicionales capaces de formar dióxido de cloro.

El dióxido de cloro estabilizado se puede suministrar como material sólido tal como una composición que contiene un polvo de clorita de metal alcalino o alcalino-térreo, ingredientes inertes y, opcionalmente, un activador anhidro tal como un ácido seco. Preferentemente, la clorita metálica es una clorita de metal alcalino y, más preferentemente, clorita sódica.

El dióxido de cloro estabilizado se activa *in situ* mediante la reducción del pH a menos de pH 8, por ejemplo mediante la adición de ácido, metales y/o por la producción *in situ* de ácido, por ejemplo a partir de ciertas bacterias productoras de ácido. Cuanto más bajo es el pH, más rápida es la activación del SCD. A los efectos de este documento, el SCD permanece inactivo en la solución hasta la generación de ácido que convierte el SCD en dióxido de cloro activado. Cuanto mayor sea la cantidad de ácido generada, más dióxido de cloro activado se produce. El dióxido de cloro activado destruye las bacterias por la reacción con una serie de componentes celulares (proteínas, lípidos, etc.). Dado que el dióxido de cloro ataca múltiples sitios sobre o en el interior de la célula, es improbable que se produzca resistencia, que es un problema conocido con los antibióticos.

Procedimiento

La presente invención es un procedimiento para prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias en un sistema de fermentación, que comprende la introducción en un sistema de fermentación de un azúcar fermentable, un inoculante y un dióxido de cloro estabilizado. El SCD se agrega a concentraciones en el sistema de fermentación de ácido acético no mayores que 0,30% (peso/volumen) y de ácido láctico no mayores de 0,60% (peso/volumen), en una cantidad eficaz para prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias. Los expertos en la técnica conocen

que el ácido acético y el ácido láctico pueden estar presentes en el sistema de fermentación en cantidades reducidas, es decir, sin que haya un crecimiento sustancial de bacterias. Estos ácidos orgánicos pueden formarse como producto secundario de la fermentación del azúcar por la levadura. En el caso de que la exposición del SCD a pequeñas cantidades de ácido genere dióxido de cloro activado, los efectos adversos sobre el inoculante (por ejemplo, levadura), el proceso de fermentación y el rendimiento de etanol son prácticamente nulos.

El SCD se puede agregar al azúcar fermentable o al inoculante antes de su introducción en el sistema de fermentación. El proceso de fermentación puede ser semicontinuo o continuo. Por "sistema de fermentación" se hace referencia en este documento al tren de licuefacción de flujo semicontinuo o continuo y a los tanques, recipientes y reactores de fermentación, intercambiadores de calor, conjunto de tuberías (tal como un reactor de flujo en pistón) o sus combinaciones en los que tiene lugar la fermentación del azúcar. De forma alternativa o adicional, el SCD se puede agregar como una corriente separada al sistema de fermentación, aparte del azúcar fermentable y el inoculante. En un procedimiento semicontinuo, el SCD se puede agregar, además, antes, durante y/o después de la adición del azúcar fermentable y/o del inoculante al sistema de fermentación. Cuando el inoculante es levadura, el SCD se puede agregar al tanque de propagación de levadura. Preferentemente, el SCD se agregará antes de la adición del azúcar fermentable o antes de la adición del inoculante al sistema de fermentación para obtener resultados óptimos. De manera muy preferida, el SCD se agrega antes de la adición del inoculante, especialmente cuando el inoculante es levadura. El SCD se debe agregar al azúcar fermentable, inoculante o al sistema de fermentación a concentraciones en el sistema de ácido acético no mayores que 0,30% (peso/volumen) y ácido láctico no mayores que 0,60% (peso/volumen). A estas concentraciones de ácidos no se aprecia ningún efecto perjudicial sustancial sobre el proceso de fermentación causado por bacterias.

El dióxido de cloro estabilizado se agrega en una cantidad eficaz. Por "cantidad eficaz" se entiende una cantidad que es capaz de generar suficiente dióxido de cloro activado en el sistema de fermentación para impedir sustancialmente el crecimiento de bacterias, sin afectar adversamente el proceso de fermentación. Por la expresión "impedir sustancialmente el crecimiento de bacterias" se quiere dar a entender que la concentración en el sistema de fermentación de ácido acético no es mayor que 0,30% (peso/volumen) y la concentración de ácido láctico no es mayor que 0,60% (peso/volumen). Estas condiciones permiten que el inoculante convierta rápida y eficazmente el azúcar fermentable en etanol. De este modo, en el procedimiento de esta invención se reduce la producción de ácido en relación con la operación del sistema en ausencia de una cantidad eficaz de dióxido de cloro estabilizado. Además, en el procedimiento de esta invención se observa también una reducción de la producción de ácido y un incremento de la producción de etanol con respecto al tratamiento correctivo con SCD en un proceso infectado. En el tratamiento correctivo, la producción de ácido y la pérdida de rendimiento de etanol tienen lugar antes de que la adición correctiva de SCD ejerza su efecto. En el procedimiento de esta invención se observa, asimismo, una pérdida mínima del tiempo de ciclo, o rendimiento de etanol, en relación con el tratamiento correctivo.

El dióxido de cloro estabilizado se agrega en una cantidad eficaz para impedir sustancialmente el crecimiento de bacterias, pero que tiene escaso impacto sobre las principales variables del proceso de fermentación. Típicamente, esta cantidad será desde aproximadamente 0,0001 hasta aproximadamente 5% sobre la base del peso de dióxido de cloro activado que se puede producir y el peso total del contenido del sistema de fermentación – una vez que se han agregado al sistema todos los reactivos. Se entenderá que la cantidad de SCD necesaria dependerá de la carga total de bacterias introducidas en el sistema. Factores adicionales que se deben considerar al determinar la cantidad de SCD que se debe agregar incluyen el ritmo de adición del inoculante (levadura) y el pH. Preferentemente, la cantidad de SCD agregada es de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 3%, más preferentemente de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 2% del volumen total de material presente en el recipiente de fermentación. Esta cantidad es suficientemente sustancial para minimizar las interrupciones del proceso debidas a la contaminación bacteriana y eliminar la necesidad de otros biocidas o antibióticos. Los expertos en la técnica entenderán que la concentración de SCD introducido en el proceso de fermentación puede variar en función de la concentración de dióxido de cloro disuelto disponible en la solución de SCD que se agrega.

Mediante la operación de una planta de fermentación según la presente invención se consigue reducir la frecuencia y, potencialmente, eliminar los efectos perjudiciales de la infección bacteriana. De esta forma, en la operación de la planta de fermentación se logran, con el procedimiento de esta invención, incrementos a largo plazo de la productividad y rentabilidad.

Se reconoce que los resultados individuales en diferentes plantas de fermentación de etanol, que funcionan bajo condiciones diferentes, pueden variar en cuanto a las mejoras relativas en el procedimiento de esta invención tales como la reducción de la producción de ácido y los incrementos de producción de etanol en relación con la ausencia de SCD o en relación con la adición correctiva de SCD.

En el procedimiento de esta invención, la fermentación se produce en un sistema de fermentación semicontinuo o continuo. La mezcla de productos del sistema de fermentación comprende etanol, agua, inoculante, sólidos de grano y SCD que no ha reaccionado. Tras la descarga del sistema de fermentación, se pueden llevar a cabo etapas convencionales del procedimiento para la separación y purificación o procesamiento adicional del etanol. El producto de fermentación se puede destilar para separar el etanol del volumen de agua presente y de los sólidos (que incluyen inoculante y sólidos de grano). Los sólidos se pueden recuperar. El etanol destilado se puede someter a tratamientos adicionales, por ejemplo, poniéndolo en contacto con tamices moleculares para retirar el agua residual,

de modo que el producto de etanol sea esencialmente etanol puro al 100% (200 proof). En la producción de bebidas puede ser necesario aplicar otros procesamientos tales como envejecimiento, mezclado u otros. El combustible de etanol purificado se trata generalmente con un agente desnaturalizante. También se pueden recuperar el dióxido de carbono y los sólidos producidos simultáneamente.

- 5 Los sólidos recuperados se pueden usar en piensos animales y mezclarlos con granos de destilación. De manera conveniente, los sólidos recuperados comprenden SCD que, cuando se agrega a granos de destilación húmeda, puede ampliar su conservación. Del mismo modo, se pueden alcanzar otras ventajas tales como control del olor.

Ejemplos

10 En los ejemplos siguientes, el dióxido de cloro estabilizado que se utilizó fue ANTHIUM DIOXIDE, disponible en International Dioxide Inc., North Kingstown, RI, en forma de solución que contiene 5% de dióxido de cloro cuando se activa.

15 El total de bacterias viables en las muestras de este documento se midió como la concentración de unidades formadoras de colonia (UFC) por unidad de volumen (es decir, UFC/ml) o por unidad de masa (es decir, UFC/g) de muestra (Ejemplos 1 y 2), o en base a las lecturas de densidad óptica realizadas con un espectrofotómetro (Ejemplo 3). La densidad óptica medida usando el espectrofotómetro representa la cantidad de luz de longitud de onda específica (450 nm) absorbida por las células bacterianas, y es directamente proporcional a la concentración de bacterias en la muestra. Esto significa que cuanto mayor es la concentración de células en la suspensión, mayor es la densidad óptica, y viceversa. Cuando se utiliza para comparar las células bacterianas expuestas a condiciones variables, una densidad óptica más baja indica inhibición del crecimiento bacteriano. Se entiende, asimismo, que existe una correlación directa entre la concentración de bacterias en las muestras y la medición de UFC. De esta forma, cuanto mayor es la concentración de bacterias, más alto es el recuento de UFC, y viceversa. A modo de convención, las UFC se transforman matemáticamente en valores logarítmicos (\log_{10} UFC) para simplificar las comparaciones entre diferentes tratamientos.

Ejemplo 1

25 El azúcar fermentable usado en este ejemplo se obtuvo a partir de muestras de macerado, recogidas de una planta de procesamiento comercial de etanol. Las muestras se recogieron de la corriente del proceso inmediatamente después de la licuefacción, e inmediatamente antes de la introducción del inoculante (levadura) o cualquier otro ingrediente (urea, enzimas, antibióticos) en el sistema. Las muestras se conservaron en refrigerador a una temperatura de 4°C durante 5 días antes del ensayo. Las muestras de macerado se expusieron a concentraciones variables de dióxido de cloro estabilizado (SCD) del modo siguiente: se transfirieron 25 ml de macerado a tubos de centrifugación de 50 ml que, a continuación, se calentaron a 33°C en un baño de agua. Se agregó SCD a las muestras de macerado para alcanzar concentraciones de dióxido de cloro en el macerado de 62,5 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 150 ppm y 250 ppm. En la muestra de control no se agregó SCD al macerado.

35 Las muestras tratadas y la de control se mantuvieron en el baño de agua durante 30 minutos, tras lo cual se determinaron las bacterias supervivientes usando métodos microbiológicos convencionales. Estos métodos comprenden la dilución de cada muestra en un factor suficientemente grande, y que se denomina en este documento factor de dilución, para permitir una clara separación de las colonias bacterianas individuales sobre medio de cultivo sólido, lo que permitió realizar un recuento individual de colonias. En este ejemplo, el medio de cultivo fue MRS agar, disponible en Difco Laboratories, Sparks, MD, sobre el cual se sabe que crecen las bacterias productoras de ácido orgánico. Los métodos convencionales incluyen igualmente la incubación de placas de agar sobre las que se habían depositado/extendido muestras diluidas. En este ejemplo, las placas se incubaron a 33°C durante 48 horas. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Los resultados aparecen en la Tabla 1. Los Recuentos 1 y 2 indican los recuentos de colonias bacterianas en cada uno de los experimentos duplicados. El valor medio se toma de los Recuentos 1 y 2.

45 Tabla 1. Bacterias Viables Recuperadas de Muestras de Macerado tras la Exposición a SCD durante 30 minutos.

Concentración de SCD en el macerado	Recuento		Media	Factor de Dilución	UFC/ml	Log UFC/ml
	1	2				
(Control) 0 ppm	704	900	802	10.000	80.200.000	7,9
62,5 ppm	40	89	64,5	10.000	6.450.000	6,81
75 ppm	320	270	295	10.000	2.950.000	6,47
100 ppm	200	360	280	10.000	2.800.000	6,45
150 ppm	26	28	27	100	2.700	3,43

Concentración de SCD en el macerado	Recuento		Media	Factor de Dilución	UFC/ml	Log UFC/ml
	1	2				
200 ppm	25	29	27	10	270	2,43

El número de bacterias viables en el macerado tratado con SCD fue más bajo que en las muestras de macerado no tratadas. Las cargas mayores de SCD dieron como resultado menos bacterias en las muestras.

Ejemplo 2

5 Durante un proceso normal de fermentación en una planta de etanol de molienda en seco, se agregaron 1.000 litros de SCD a un fermentador inmediatamente antes de rellenarlo con macerado y antes de la adición de levadura, enzimas y urea al fermentador. No se agregó ningún compuesto antibiótico al fermentador. En este proceso, el fermentador se llenó con macerado con un caudal de 2.450 litros por minutos hasta un volumen de 2.500.000 litros. Por lo tanto, la concentración de SCD agregado al recipiente varió a medida que aumentó el volumen de macerado. Es decir, en el momento inicial de llenado, el SCD se diluyó gradualmente hasta una concentración final de 0,041%.

10 El SCD usado en este ejemplo fue una solución que contuvo 5% de dióxido de cloro activo. Después de 90 minutos de llenado, se agregaron desde el tanque de propagación de levadura 28.000 litros de suspensión de levadura al macerado, que contuvieron aproximadamente $1,0 \times 10^8$ células por ml. Una vez agregados todos los componentes al recipiente de fermentación, las concentraciones de antibiótico (virginiamicina) y urea fueron 0,0001% y 0,0016%, respectivamente. Se controlaron de la manera habitual los indicadores de rendimiento de fermentación, que se muestran en la Tabla 2. Se recopilaron los datos de lotes de fermentación sometidos a ciclos concurrentes bajo cada condición y se calculó el valor medio. La Tabla 2 muestra las medias de 16 lotes de fermentación que usaron

15 antibióticos y 15 lotes de fermentación en los que se agregó SCD.

Tabla 2. Parámetros Clave para las Fermentaciones de Lote

Tratado con Antibióticos							
	pH	Temp. (°C)	Azúcares %	Ácido Láctico %	Glicerol %	Ácido Acético %	Etanol %
Inoculante	5,38	37	9,10	0,07	0,39	0,02	0,74
10 horas	5,47	33	23,53	0,18	0,80	0,03	1,32
22 horas	4,81	32	11,54	0,28	1,46	0,02	7,53
36 horas	4,76	30	3,94	0,32	1,67	0,03	11,64
Final	4,91	29	1,14	0,35	1,72	0,05	13,81
Tratado con SCD							
	pH	Temp. (°C)	Azúcares %	Ácido Láctico %	Glicerol %	Ácido Acético %	Etanol %
Inoculante	5,39	37	8,94	0,07	0,40	0,02	0,92
10 horas	5,60	33	24,70	0,15	0,75	0,03	1,00
22 horas	4,84	33	13,69	0,23	1,40	0,01	6,53
36 horas	4,74	29	5,75	0,25	1,66	0,02	10,91
Final	4,88	29	1,14	0,25	1,77	0,04	14,08

20 Tal como se ve en la Tabla 2, el rendimiento medio de etanol al término de la fermentación (Final) para la fermentación tratada con SCD fue mayor que con el tratamiento con antibiótico. Las concentraciones medias de ácidos láctico y acético también fueron menores en el fermentador tratado con SCD. Por lo tanto, el uso de SCD, con respecto al antibiótico, incrementa el rendimiento de etanol de forma que en una planta de etanol que produce 212 millones de litros al año se obtienen 4,2 millones de litros adicionales al año. A un precio de \$ 2,20 por 3,785 litros, el aumento de producción supone unos beneficios anuales adicionales de \$ 2,35 millones.

25

Ejemplo 3

5 A partir de muestras de macerado obtenidas previamente de un proceso de fermentación comercial se aislaron e identificaron cultivos puros de bacterias productoras de ácido láctico. Tres de los aislados que se identificaron con mayor frecuencia se combinaron en un cóctel y se expusieron a concentraciones crecientes de SCD en caldo MRS (Difco, Sparks, MD, EE.UU.), un medio selectivo para bacterias productoras de ácido láctico. Las especies usadas fueron *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc citreum*. Los tres aislados se cultivaron durante la noche sobre MRS agar, se retiraron a continuación por lavado con una solución tampón de fosfato (pH 6,4), se mezclaron y la densidad celular total se ajustó con la solución tampón para dar como resultado aproximadamente 10⁴ UFC/ml de células viables en un medio de cultivo líquido. La suspensión celular en el medio líquido se combinó con SCD a concentraciones para alcanzar dióxido de cloro activo de 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, y 150 ppm en placas de microtitulación de 96 pocillos.

10 Las lecturas de densidad óptica de cada pocillo se registraron a intervalos de 2 horas durante 22 horas, usando un lector automatizado de placas de microtitulación. La densidad óptica se midió usando un espectrómetro. La densidad óptica indica la concentración de células bacterianas en el medio. Una mayor turbidez de las muestras indica concentraciones elevadas de las bacterias en el medio.

15 Las bacterias expuestas a diversos niveles de SCD exhiben densidades ópticas más bajas en comparación con las células no tratadas a lo largo del mismo periodo de 22 horas. La Figura 1 demuestra que por medio de la inclusión de SCD en el medio de cultivo es posible reducir la concentración de bacterias y controlar su velocidad de crecimiento, tal como se mide por la densidad óptica de la suspensión.

20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias en un sistema de fermentación, que comprende introducir en un sistema de fermentación un azúcar fermentable, un inoculante y un dióxido de cloro estabilizado, en donde el inoculante convierte el azúcar en etanol y dióxido de carbono; en el que se agrega el dióxido de cloro estabilizado, en una cantidad eficaz para prevenir sustancialmente el crecimiento de bacterias, a uno o múltiples azúcares fermentables, el inoculante o el sistema de fermentación, a concentraciones en el sistema de fermentación de ácido acético no mayores que 0,30% (peso/volumen) y de ácido láctico no mayores que 0,60% (peso/volumen) y, adicionalmente, en el que la cantidad de dióxido de cloro estabilizado que se agrega es de 0,0001 hasta 5% en base al peso de dióxido de cloro activado que se puede producir y al peso total del sistema de fermentación.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el dióxido de cloro estabilizado se agrega antes de la adición del azúcar fermentable, o antes de la adición del inoculante al sistema de fermentación.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el dióxido de cloro estabilizado se agrega en una cantidad dentro del intervalo de aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 3% en base al peso de dióxido de cloro activado que se puede producir y al peso total del contenido del fermentador.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el dióxido de cloro estabilizado se agrega en una cantidad dentro del intervalo de aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 2% en base al peso de dióxido de cloro activado que se puede producir y al peso total del contenido del fermentador.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el dióxido de cloro estabilizado es un complejo de oxi-cloro que contiene dióxido de cloro, que es un complejo de dióxido de cloro con carbonato, dióxido de cloro con bicarbonato, o una mezcla de los mismos.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dióxido de cloro estabilizado es un componente que contiene clorita, que es una o múltiples cloritas metálicas.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el azúcar fermentable se obtiene a partir de uno o múltiples de los siguientes elementos: maíz, astillas de madera, paja de trigo, rastrojo de maíz, brotes de hierba, milo (sorgo africano), avena, mijo, sorgo, azúcar de caña, remolacha, melaza, suero de leche, patatas.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el azúcar fermentable deriva del maíz.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el azúcar fermentable está presente en el sistema de fermentación en una concentración de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 40% (peso/volumen).
10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el azúcar fermentable deriva del maíz y está presente en el sistema de fermentación en una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 10 a 35% (peso/volumen); el inoculante es levadura; el dióxido de cloro estabilizado se agrega al sistema de fermentación antes de la adición del azúcar fermentable o antes de la adición del inoculante al sistema de fermentación; el dióxido de cloro estabilizado se agrega en una cantidad dentro del intervalo de aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 3% en base al peso de dióxido de cloro activado que se puede producir y al peso total del contenido del fermentador; el dióxido de cloro estabilizado es una clorita de metal alcalino o una clorita de metal alcalino-térreo, que se suministra en un medio líquido a una concentración que muestra una concentración potencial de dióxido de cloro estabilizado dentro del intervalo de aproximadamente 2% hasta aproximadamente 25% en peso, basada en el peso total del medio líquido.

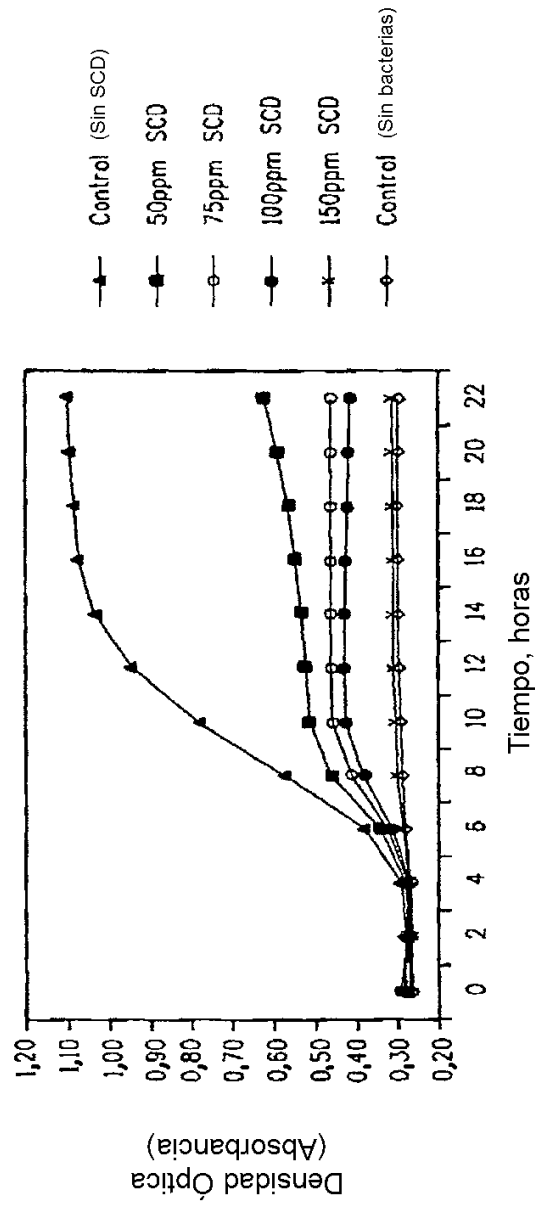


FIG. 1