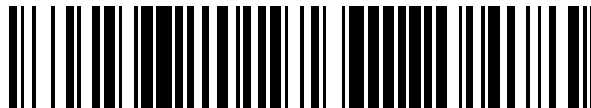


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 717**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12N 1/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2010 E 10741704 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2396412**

54 Título: **Control de la contaminación microbiana en procesos de fermentación alcohólica**

30 Prioridad:

**12.02.2009 BR PI0900238**

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

**23.11.2015**

73 Titular/es:

**ARCH CHEMICALS, INC. (100.0%)  
90 Boroline Road  
Allendale, NJ 07401, US**

72 Inventor/es:

**FRANZIN, MAURICIO DA SILVA y  
PRIOLI, MARIA REGINA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 551 717 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

Control de la contaminación microbiana en procesos de fermentación alcohólica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición antimicrobiana y a un proceso para controlar la contaminación microbiana en procesos de fermentación alcohólica, particularmente en la producción de etanol a partir de la caña de azúcar.

10

**Antecedentes de la invención**

A pesar de las mejoras introducidas en los procesos de fermentación en los últimos años, todavía no presentan un rendimiento satisfactorio con referencia al control de la contaminación, debido a la dificultad y a los elevados costes en relación con el control de los niveles de contaminación de la materia prima que se lleva al molino y se procesa para formar el mosto que se va a fermentar.

15

Hoy en día, las características del procesamiento de la caña de azúcar en los molinos de producción de alcohol dan lugar normalmente a la aparición de una microbiota bacteriana que excede generalmente  $10^4$  células/ml en el mosto en fermentación. Además, el mismo mosto, que es un medio favorable para la proliferación bacteriana, tiene variedades de bacterias contaminantes tales como *Lactobacilli* y levaduras salvajes además de las levaduras de fermentación *Saccharomyces cerevisiae*.

20

La presencia de contaminantes puede causar una disminución en la productividad de la fermentación y otros problemas operativos. Por ejemplo, las levaduras salvajes, pueden competir con las levaduras de fermentación absorbiendo el azúcar en el mosto que se va a fermentar sin convertirlo a alcohol.

25

Adicionalmente, la presencia de bacterias, *Lactobacilli* y levaduras salvajes en el mosto en fermentación tiende a provocar la aglomeración de estos organismos en torno a las levaduras de fermentación, produciendo de este modo la floculación y alterando la actividad productiva de las levaduras de fermentación.

30

Cabe observar también que, con el aumento de la densidad bacteriana y *Lactobacilli* en el mosto en fermentación, las concentraciones de ácido orgánico tienden a ser excesivamente altas. La concentración elevada de ácido orgánico inhibe la multiplicación de las levaduras de fermentación, que puede reducir la productividad de las instalaciones industriales aproximadamente un 10-20 %. En casos de contaminaciones más graves, pueden observarse reducciones más elevadas de la productividad de etanol.

35

Hasta la fecha, se han utilizado ampliamente antibióticos para controlar la contaminación del mosto en fermentación. Sin embargo, la eficacia de los antibióticos se limita normalmente a un cierto grupo de bacterias. Por ejemplo, aunque los antibióticos disponibles en la actualidad tienen una acción específica que se desea contra las bacterias Gram positivas y *Lactobacilli*, estos han reducido la acción contra las levaduras salvajes. De este modo, el uso de los antibióticos no elimina las pérdidas de productividad resultantes de la presencia de levaduras salvajes en el mosto en fermentación puesto que las levaduras salvajes compiten con las levaduras de fermentación por el azúcar contenido en el mosto que se va a fermentar.

40

45

Además, los antibióticos son de acción lenta en el mosto en fermentación. Esta característica de los antibióticos permite la proliferación de las levaduras salvajes, las bacterias y *Lactobacilli* sp durante una fase inicial de la acción antibiótica. Por consiguiente, se requiere normalmente una elevada carga antibiótica para controlar el aumento del grado de contaminación de bacterias y *Lactobacilli* del mosto en fermentación. Además, con el tiempo, cada vez más bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos, que también puede requerir elevadas cargas de antibióticos para obtener niveles de productividad aceptables.

50

Los antibióticos son normalmente caros, el aumento de las cargas de antibióticos puede elevar el coste de fermentación a un nivel inaceptable. Por otra parte, las cargas más altas de antibióticos también pueden causar alergias y otras enfermedades que afectan a los operadores implicados en esta fase del proceso. Además, existe una creciente demanda por parte de los consumidores en subproductos resultantes del proceso de fermentación de estos productos que son ecológicos y no provocan daño alguno al ser humano y al medio ambiente. Esto se traduce en una demanda de cantidades residuales cada vez más pequeñas de antibióticos en el producto.

55

Como consecuencia de las limitaciones e inconvenientes relacionados con el uso de antibióticos para controlar los contaminantes, se ha intentado desarrollar un agente capaz de minimizar las deficiencias comentadas previamente, algunas de las cuales son inherentes al uso de elevadas cargas de antibióticos, mientras que al mismo tiempo son efectivas en reducir los efectos negativos de las bacterias, *Lactobacilli* y levaduras salvajes presentes en el proceso de fermentación.

60

65

Se conoce el uso de compuestos de biguanida como agentes antimicrobianos para inhibir la proliferación de microorganismos del cancro del microorganismo contaminante en plantas. La Solicitud de la Patente Brasileña PI 0505795-7 (correspondiente a la Solicitud de la Patente Estadounidense US 60/640.595), de Ecolab, Inc. desvela una composición para reducir la población de microorganismos del cancro (por ejemplo, microorganismos del cancro cítrico), en una serie de objetos, tales como, plantas de cítricos, frutas, semillas, flores cortadas, etc. Según la memoria descriptiva, la composición antimicrobiana puede incluir un agente metálico antimicrobiano, por ejemplo, ion de plata, y un polímero, por ejemplo, una poli(hexametil biguanida) (PHMB). Esta composición tiene acción bacteriostática y/o biocida y ayuda a controlar la proliferación del cancro mediante la aplicación de la composición antimicrobiana en una cantidad y durante un tiempo suficientes para reducir la población microbiana.

Sin embargo, la acción del compuesto de biguanida o poli(hexametil biguanida) (PHMB) en la composición de Ecolab se asocia obligatoriamente con otro agente antimicrobiano inorgánico, para que pueda tener de manera efectiva la función antimicrobiana en el "objeto", en ciertas cantidades de dicho agente en la mezcla de los componentes que forman la composición, para reducir la población de patógenos de plantas. Aunque los compuestos inorgánicos a base de plata se conocen en la técnica anterior, su uso en la formación de composiciones para controlar la contaminación microbiana en los procesos de fermentación alcohólica es económicamente inviable, hace la propuesta de la técnica anterior inadecuada para su uso en medios de fermentación alcohólica para la obtención de etanol.

Otra aplicación de la polihexametileno biguanida (PHMB) se describe por Elszetin, C. y Morais, M. A., en un artículo titulado "*Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process*", publicado en *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, (2008), 35: 967-973. En el artículo, los autores examinaron la actividad fungicida de la poli(hexametil biguanida) (PHMB). A partir de los efectos de la PHMB en la inhibición de la proliferación y la eliminación de microorganismos, evaluados en cultivos de laboratorio y muestras industriales, los autores propusieron el uso de PHMB a 200 mg/l para controlar los principales contaminantes de etanol combustible a escala industrial.

Según el artículo, el efecto fungicida de PHMB se testó en las células de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (JP1 y P2) y en las levaduras salvajes de *Dekkera bruxellensis*, recogidas directamente de los procesos industriales. Aunque estos resultados demuestran que la presencia de PHMB reduce *D. bruxellensis* por debajo de 1 log (44 %) en la tabla 2, página 971, los resultados también muestran que la levadura de fermentación *S. cerevisiae* PE2 es muy sensible a PHMB a concentraciones superiores a 20 ppm. Por consiguiente, los autores recomiendan utilizar PHMB en combinación con una cepa resistente a PHMB de alta fermentación. Los autores recomiendan también utilizar un biocida de PHMB sólo en los recipientes prefermentación, en los que se airea la biomasa de la levadura y se alimenta con jugo de caña diluido, para prevenir o reducir cualquier efecto negativo de la PHMB en las células *S. cerevisiae* cuando se exponen a la sacarosa y a una baja cantidad de etanol.

Mientras se demuestra la actividad de PHMB como agente biocida en distintas aplicaciones, las soluciones reunidas hasta el momento no tienen en cuenta el efecto letal de las proporciones/concentraciones sugeridas en la misma, tanto de los antibióticos ampliamente utilizados como el compuesto de poli(hexametil biguanida), en las levaduras de fermentación *S. cerevisiae*.

Recientemente, la Solicitud de la Patente Internacional WO 2009/001205 A2 desvela un método de producción de productos basados en la fermentación, en particular etanol, que comprende la fermentación de un medio que contiene azúcar con levaduras en presencia de un aditivo, por ejemplo, compuestos a base de guanidina, tales como PHMB, solo o en combinación con otros biocidas orgánicos tales como monoaldehídos y dialdehídos alifáticos y aromáticos etc., para reducir o controlar una población bacteriana en el medio que contiene azúcar.

Aunque la técnica anterior disponible puede dar lugar a buenos resultados en el control microbiano en el medio de fermentación y también a una reducción en las cantidades residuales de antibióticos en los subproductos (levaduras secas), ninguna de las composiciones o métodos anteriores da lugar a un aumento de la tasa de conservación de la levadura *S. cerevisiae* junto con un aumento de la velocidad de eliminación de la levadura salvaje, *Lactobacilli* y otras bacterias en el medio de fermentación, con el fin de permitir tasas de productividad inesperadas en procesos de fermentación.

Otro inconveniente de los procedimientos conocidos resulta del uso de ácido para tratar el jugo mezclado recibido en el molino y para tratar la levadura restante de la fermentación de una carga de mosto para eliminar las bacterias que permanecen con vida después del proceso de fermentación, permitiendo de este modo utilizar la levadura en la fermentación de una nueva carga de mosto. El uso de ácidos tiene una serie de inconvenientes, como la necesidad de proporcionar un equipo resistente al ataque del ácido, un aumento del coste asociado con mayores cantidades de ácido necesarias para tratar elevadas cargas de bacterias restantes en la levadura que se va a reutilizar, la toxicidad de este aporte de ácido, y la necesidad de eliminar el ácido del subproducto (levaduras secas) del proceso de fermentación, en particular cuando se utiliza en la producción de alimentación con dieta para animales.

Ninguno de los procesos industriales de fermentación alcohólica conocidos son satisfactorios de una manera económicamente factible, todas las nuevas demandas actuales se relacionan con la eficacia del proceso de

fermentación, con la reducción de las cargas de antibióticos que se emplean en el proceso, con el nivel de bacterias residuales y antibióticos en el subproducto (levaduras secas), y también con la reducción de la cantidad de ácido, generalmente ácido sulfúrico, que se utiliza para el tratamiento de la levadura, debido a las bacterias residuales que pueden encontrarse en la misma.

5

### Sumario de la invención

10 En vista de las limitaciones de la técnica anterior, la invención tiene como objetivo proporcionar una composición antimicrobiana que puede aplicarse al mosto contenido en los depósitos de fermentación para la producción de alcohol, para controlar la contaminación mediante levaduras salvajes, *Lactobacilli* y bacterias presentes en el material en fermentación, impidiendo que las levaduras de fermentación compitan con dichos microorganismos contaminantes por el nutriente disponible en el sustrato, y permitiendo un aumento de la productividad en los procesos de fermentación y el uso de cargas reducidas de antibióticos en el medio de fermentación.

15 El objeto de la composición antimicrobiana de la invención comprende un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, como por ejemplo, poli(hexametil biguanida) (PHMB); un agente antibiótico, y un agente tensioactivo, en cantidades adecuadas, suficientes para controlar la levadura salvaje, los *Lactobacilli* y la microbiota bacteriana contenidos en el mosto que se va a fermentar; para producir un efecto de defloculación en dicho mosto; y para impedir que las levaduras de fermentación compitan con la microbiota de los contaminantes por el azúcar contenido en el mosto que se va a fermentar; caracterizado por que la composición comprende entre el 1 y el 5 % en peso del agente antimicrobiano de la familia de la guanidina; del 0,05 % al 0,5 % en peso del agente antibiótico; y del 94,5 % al 98,95 % en peso del tensioactivo.

25 La invención se refiere además a un método para controlar la contaminación microbiana en los medios de fermentación alcohólica, con el fin de obtener etanol y/u otros productos obtenidos a partir de la fermentación, añadiendo a una carga de mosto que se va a fermentar, agentes biocidas, antibióticos y tensioactivos mencionados previamente en cantidades adecuadas y suficientes para controlar la levadura salvaje, los *Lactobacilli* y la microbiota bacteriana contenidos en el mosto que se va a fermentar; para producir un efecto de defloculación en dicho mosto; y para impedir que las levaduras de fermentación compitan con los contaminantes mencionados por el azúcar contenido en el mosto que se va a fermentar. Específicamente, la invención se refiere a un proceso para controlar la contaminación microbiana en procesos de fermentación alcohólica, caracterizados por que el proceso comprende la etapa de adición al mosto que se va a fermentar de un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina; un agente antibiótico; y un surfactante, en cantidades adecuadas, suficientes para controlar los contaminantes que son la levadura salvaje, los *Lactobacilli* y la microbiota bacteriana contenidos en el mosto que se va a fermentar; para producir un efecto de defloculación en dicho mosto; e impedir que la levadura de fermentación compita con los contaminantes por el azúcar contenido en el mosto que se va a fermentar; caracterizado por que la etapa de adición del agente antimicrobiano, el agente antibiótico y el tensioactivo al mosto de fermentación comprende la adición a este último de 5 ppm a 26 ppm del agente antimicrobiano de la familia de la guanidina; 0,26 ppm a 2.6 ppm del agente antibiótico; y 491 ppm a 514 ppm del tensioactivo en peso de la carga del mosto en fermentación.

40 Otro aspecto con respecto a los tratamientos conocidos actualmente resulta del hecho de que la carga de la levadura seca, que se retira al final del proceso de fermentación y se procesa para devolverse a una nueva fermentación, presenta una carga de bacterias que ha resistido a la acción antibiótica y que necesita neutralizarse a fin de no reintroducirse en un nuevo lote de fermentación.

45 Con la acción combinada de los agentes descritos previamente, se mejora el rendimiento de la levadura de fermentación en uso y libre de la microbiota de los contaminantes, y con respecto a la contaminación, esta levadura tendrá un número reducido o no de bacterias, reduciendo de este modo las cantidades necesarias de ácido, generalmente ácido sulfúrico, para tratar bacterias residuales en la levadura seca, y que es altamente problemática en los molinos.

50

### Descripción detallada de la invención

55 Uno de los objetos genéricos mencionados previamente se consigue mediante la provisión de la composición antimicrobiana que comprende aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 5 % en peso de un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, como por ejemplo, poli(hexametil biguanida) (PHMB); aproximadamente del 0,05 % a aproximadamente el 0,5 % en peso de un agente antibiótico; y aproximadamente del 98,95 % a aproximadamente el 94,5 % en peso de un agente tensioactivo.

60 El agente antibiótico se selecciona generalmente en función de las características del mosto en fermentación y de los microorganismos contaminantes (microbiota de contaminantes) hallados en dicho mosto, así como las condiciones a las que se somete la materia prima hasta llegar a los depósitos de fermentación.

65 Teniendo en cuenta la fermentación de un mosto de jugo de caña de azúcar ("garapa"), el antibiótico utilizado para formar la presente composición antimicrobiana puede ser un ionóforo seleccionado entre virginamicina, penicilina, penicilina V, clindamicina, ácido láctico, beta-lactámicos, tetraciclina, y en particular monensina, tal como la

conocida por el nombre comercial Kamoran, de Elanco, en los porcentajes en peso de la composición, como se ha mencionado previamente.

5 El biocida utilizado en la presente composición, en los porcentajes que se han definido previamente, es un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, poli(hexametil biguanida) (PHMB), cuya función biocida/bactericida se conoce de la técnica anterior. La PHMB utilizada en la presente invención se conoce comercialmente como "Vantocil IB", fabricado por el presente solicitante.

10 Con el objetivo de aumentar aún más la eficacia del proceso de fermentación, la composición antimicrobiana comprende un agente tensioactivo no iónico apropiado, incluyendo alcoholes alcoxilados, preferentemente alcoholes etoxilados.

15 En particular, los compuestos activos de los agentes tensioactivos no iónicos apropiados pueden describirse ampliamente como compuestos producidos por la condensación de los grupos óxido de alquileo, que son de índole hidrófila (como se encuentran en la naturaleza), con un compuesto hidrófobo orgánico, que puede ser de índole aromática alquilo o alifática (como se encuentra en la naturaleza). La longitud del radical hidrófilo o polioxialquileo que se condensa con cualquier grupo hidrófobo particular puede ajustarse fácilmente para producir un compuesto soluble en agua, que tiene un cierto equilibrio deseado entre los elementos hidrófilos e hidrófobos. Los alcoholes alcoxilados preferentes se seleccionan entre el grupo que comprende alcoholes etoxilados de fórmula general: R- $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-OH}$ , en la que R es alquilo  $\text{C}_8\text{-C}_{18}$  o hidroxialquilo lineal o ramificado, y n es, de media, 1-14. Los alcoholes apropiados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, un alcohol graso de coco y/o un poliglicoléter, preferentemente conocido por la denominación comercial "Genapol", producido por Clariant, siendo utilizados también tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros y otros tipos no iónicos de agentes tensioactivos.

25 Ha de entenderse que los diferentes tipos de tensioactivos pueden utilizarse para aumentar el grado de dispersión de los biocidas activos y el grado de la defloculación de las levaduras de fermentación en el mosto y, de ese modo, el área de superficie de contacto de dichas levaduras con el azúcar.

30 El uso de antibióticos y PHMB en las concentraciones que se han definido previamente permite que el PHMB actúe inocuamente en las levaduras de fermentación, pero eficazmente en las levaduras salvajes y bacterias contaminantes (*Lactobacilli sp* y *Acrobacter sp*) contenidas en el mosto en fermentación, inmediatamente después de aplicar la composición para controlar los contaminantes.

35 La presencia de PHMB en la composición antimicrobiana como un medio de control, en concentraciones debidamente limitadas, para evitar su acción perjudicial en las levaduras de fermentación, permite que este biocida actúe rápidamente en las levaduras salvajes e incluso en un gran número de bacterias contaminantes susceptibles a su acción bactericida, impidiendo a dichos contaminantes competir por los nutrientes del mosto en fermentación (azúcar) con las levaduras productivas.

40 Un aspecto importante de esta acción de PHMB en las levaduras salvajes y en las bacterias contaminantes resulta del hecho de que esta acción es inmediata después de la aplicación de la composición, es decir, la PHMB comienza su acción biocida/bactericida en menos de cinco minutos, provocando la reducción de las levaduras salvajes y el control de las bacterias susceptibles a su acción, y previniendo la proliferación de dichos contaminantes y reduciendo su acción de aglomeración en las levaduras de fermentación.

45 Con la acción inmediata de PHMB en el microorganismo contaminante, se interrumpen la acción y la proliferación de las levaduras salvajes y bacterias contaminantes, reduciendo el volumen de las bacterias que se van a atacar específicamente mediante el antibiótico que presenta una acción considerablemente más lenta que la de la PHMB, y que es de aproximadamente 3 a 5 horas. Por lo tanto, la carga de antibióticos que debe tomarse para el proceso de fermentación se puede reducir sustancialmente a valores compatibles con la microbiota bacteriana restante en el mosto en fermentación.

50 Además de la acción de los agentes antimicrobianos y antibióticos en la microbiota de los contaminantes contenidos en el mosto que se va a fermentar, cabe señalar que la presencia del agente tensioactivo en la composición permite obtener una acción de defloculación en el mosto que se va a fermentar, proporcionando una separación no sólo de las partículas de la levadura de fermentación, sino también de las partículas de la microbiota contaminante. Esta defloculación aumenta el área superficial de contacto de la levadura de fermentación con el mosto (azúcar) y también el área superficial de contacto entre los contaminantes y los agentes antimicrobianos y antibióticos, lo que permite un aumento de la acción de los agentes en la microbiota contaminante y también una mejor eficacia de fermentación de la levadura al aumentar la productividad del proceso de fermentación.

60 Una formulación posible de la presente composición antimicrobiana comprende aproximadamente del 1 % a aproximadamente el 5 % en peso de un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, poli(hexametil biguanida) (PHMB); aproximadamente del 0,05 % a aproximadamente el 0,5 % en peso de un agente antibiótico; y aproximadamente del 98,95 % a aproximadamente el 94,5 % en peso de un agente tensioactivo, teniendo en cuenta que la dosis recomendada de dicha composición se encuentra aproximadamente al 0,052% en peso o 520 ppm, de

la carga de mosto en fermentación.

La presente invención tiene también como objeto proporcionar un proceso para controlar la contaminación microbiana en los procesos de fermentación alcohólica, en particular en la producción de etanol y/u otros productos obtenidos a partir de la fermentación de la caña de azúcar. El proceso comprende la etapa de adición al mosto en fermentación, de las siguientes cantidades en peso de la carga de mosto en fermentación de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 26 ppm de un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, como por ejemplo, poli(hexametil biguanida) (PHMB); aproximadamente 0,26 ppm a aproximadamente 2,6 ppm de un agente antibiótico, como se ha definido previamente para la formulación de la composición antimicrobiana y además aproximadamente 491 ppm a aproximadamente 514 ppm del agente tensioactivo seleccionado entre los grupos que se han definido previamente en relación con la composición antimicrobiana.

Además de los grandes beneficios económicos y ambientales que resultan de la reducción sustancial de la carga de antibióticos, la provisión de PHMB en la presente composición de control reduce, desde el comienzo del proceso de fermentación, las levaduras salvajes y la microbiota bacteriana que se aglomeran en la levadura de fermentación, afectando al contacto de la levadura con los nutrientes (azúcar) del mosto y a la productividad del proceso de fermentación.

Además, con la acción combinada del agente tensioactivo de la presente composición, junto con la acción de la PHMB y el antibiótico, se evita la floculación en el mosto en fermentación, permitiendo un grado muy alto de contacto de la levadura de fermentación con los nutrientes (azúcar) contenidos en el mosto al aumentar la eficiencia del proceso de fermentación.

Con la composición de la invención descrita previamente, se mejora el rendimiento de la levadura de fermentación. Además, la levadura seca tendrá un número reducido o no de bacterias al reducir de este modo la cantidad de aporte de ácido sulfúrico en el tratamiento de levadura seca.

El uso de los tres componentes descritos previamente para controlar la contaminación microbiana en los procesos de fermentación alcohólica se puede llevar a cabo a través de la presente composición antimicrobiana, o en forma de polvo, gel, pasta, líquido, píldora o comprimido, o también con los componentes por separado, para la adición al mosto en fermentación.

La siguiente tabla muestra el rendimiento de la composición en el presente proceso de fermentación alcohólica en relación con los resultados con respecto a la reducción de las levaduras de fermentación, las levaduras salvajes, los *Lactobacilli* y las bacterias presentes en el mosto en fermentación.

Tabla 1

Nº	Muestras	WLN ufc/ml <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WLN + ufc/ml Levadura salvaje	MRS ufc/ml <i>Lactobacilli</i>	TSA ufc/ml Bacterias
01	3ppm de Kamoran	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>4</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	7x10 <sup>3</sup>
02	15ppm de PHBM + 1ppm de Kamoran	3x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>6</sup>	<10	4x10 <sup>1</sup>
03	15ppm de PHBM + 1ppm de Kamoran + genapol al 0,05 %	1,2x10 <sup>6</sup>	3x10 <sup>5</sup>	<10	1,4x10 <sup>2</sup>
04	Vacío	1,3x10 <sup>6</sup>	9,5x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	6x10 <sup>5</sup>

La Tabla 1 previa muestra la reducción de la levadura de fermentación, la levadura salvaje, los *Lactobacilli* y otras bacterias en el mosto en fermentación cuando se trata con solo un agente antibiótico (Kamoran); una composición que comprende el agente antibiótico (Kamoran) y un agente antimicrobiano (PHMB); y una composición que comprende los antibióticos (Kamoran), el agente antimicrobiano (PHMB) y el agente tensioactivo (Genapol).

Como puede observarse, el uso de solo un agente antibiótico (Kamoran), en una cantidad de 3 ppm de la carga de mosto en fermentación (muestra 1), ha dado lugar, en relación con la muestra de control 4, a una reducción de aproximadamente 1 log en la levadura; aproximadamente 3 log en la levadura salvaje; aproximadamente 4 log en los *Lactobacilli* y aproximadamente 2 log en otras bacterias. Como puede observarse, la acción antibiótica es eficaz para proporcionar una reducción sustancial y positiva de la microbiota de los contaminantes, pero también proporciona una reducción indeseable en la levadura de fermentación, al no permitir un aumento en la eficacia de los procesos de fermentación.

En la muestra 2, se utilizó una composición que comprende 15 ppm de PHMB (agente antimicrobiano) y 1 ppm de Kamoran (agente antibiótico). Esta composición ha proporcionado, en relación con la muestra de control 4, una reducción de aproximadamente 1 log en la cantidad de levadura de fermentación; aproximadamente 1 log en la

cantidad de levadura salvaje; aproximadamente 6 log en la cantidad de *Lactobacilli*; y aproximadamente 4 log en cantidad de otras bacterias. Como puede observarse, la acción del agente antimicrobiano junto con el agente antibiótico ha demostrado ser eficaz en proporcionar una reducción positiva de la microbiota de los contaminantes, incluso teniendo en cuenta que la reducción en la cantidad de la levadura salvaje fue inferior a la obtenida con solo el agente antibiótico (muestra 1). Sin embargo, esta composición también proporciona una reducción indeseable en la levadura de fermentación, al no permitir un aumento en la eficacia del proceso de fermentación.

En la muestra 3, se utilizó una composición que comprendía un agente antimicrobiano (15 ppm de PHMB); un agente antibiótico (1 ppm de Kamoran); y un agente tensioactivo (Genapol al 0,05 %). Esta composición, que es un objeto de la presente invención, ha proporcionado una reducción de aproximadamente 2 log en la cantidad de levadura salvaje; una reducción de aproximadamente 6 log en la cantidad de *Lactobacilli*; y una reducción de aproximadamente 3 log en la cantidad de otras bacterias.

El uso combinado de PHMB, el agente antibiótico y el agente tensioactivo, en las proporciones indicadas, ha producido una reducción efectiva de la microbiota de los contaminantes, sin afectar a las levaduras de fermentación (*Saccharomices cerevisiae*), permitiendo obtener un aumento en la eficacia del proceso de fermentación considerado en el presente documento.

La invención se describió con referencia a posibles realizaciones de la invención, así como las formas preferentes de las aplicaciones. Sin embargo, ha de entenderse que se pueden realizar muchas variaciones y modificaciones, siempre que caigan dentro del espíritu y el alcance de protección de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana para controlar la contaminación microbiana en los procesos de fermentación alcohólica, **caracterizada por que** la composición comprende: un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina; un agente antibiótico; y un tensioactivo, en cantidades adecuadas, suficientes para controlar los contaminantes que son levadura salvaje, *Lactobacilli* y la microbiota bacteriana contenidos en el mosto que se va a fermentar; para producir un efecto de defloculación en dicho mosto y para impedir que las levaduras de fermentación compitan con los contaminantes por el azúcar contenido en el mosto que se va a fermentar;  
5 **caracterizada por que** la composición comprende del 1 % al 5 % en peso del agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, del 0,05 % al 0,5 % en peso del agente antibiótico y del 94,5 % al 98,5 % en peso del tensioactivo.
2. La composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** el agente antimicrobiano de la familia de la guanidina es poli(hexametil biguanida) (PHBM).
- 15 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, **caracterizada por que** el agente antibiótico se selecciona entre virginiamicina, penicilina, penicilina V, clindamicina, ácido láctico, beta-lactámicos, tetraciclinas y preferentemente monensina.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada por que** el tensioactivo es no iónico e incluye alcoholes alcoxilados, preferentemente alcoholes etoxilados, de fórmula general:  $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$ , en la que R es alquilo  $C_8-C_{18}$  o hidroxialquilo lineal o ramificado, y n es, de media, 1-14.
- 20 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada por que** el tensioactivo se selecciona entre alcohol graso de coco, poliglicoléter, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros y otros tipos de tensioactivos no iónicos.
- 25 6. La composición según la reivindicación 1, **caracterizada por que** se presenta en forma de polvo, píldora, comprimido o líquido, para la adición al mosto que se va a fermentar.
- 30 7. Un proceso para controlar la contaminación microbiana en procesos de fermentación alcohólica, **caracterizado por que** el proceso comprende la etapa de adición al mosto que se va a fermentar de un agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, un agente antibiótico y un tensioactivo, en cantidades adecuadas, suficientes para controlar los contaminantes que son una levadura salvaje, *Lactobacilli* y microbiota bacteriana, contenidos en el mosto que se va a fermentar para producir un efecto de defloculación en dicho mosto y para impedir que la levadura de fermentación compita con los contaminantes por el azúcar contenido en el mosto que se va a fermentar;  
35 **caracterizado por que** la etapa de adición del agente antimicrobiano, el agente antibiótico y el tensioactivo al mosto en fermentación comprende la adición a este último de 5 ppm a 26 ppm del agente antimicrobiano de la familia de la guanidina, 0,26 ppm a 2.6 ppm del agente antibiótico y 491 ppm a 514 ppm del tensioactivo en peso de la carga del mosto en fermentación.
- 40 8. El proceso según la reivindicación 7, **caracterizado por que** el agente antimicrobiano de la familia de la guanidina es poli(hexametil biguanida) (PHMB).
9. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado por que** el agente antibiótico es un ionóforo seleccionado entre virginiamicina, penicilina, penicilina V, clindamicina, ácido láctico, beta-lactámicos, tetraciclinas y preferentemente monensina.
- 45 10. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, **caracterizado por que** el tensioactivo es no iónico e incluye alcoholes alcoxilados, preferentemente alcoholes etoxilados, de fórmula general:  $R-(OCH_2CH_2)_n-OH$ , en la que R es alquilo  $C_8-C_{18}$  o hidroxialquilo lineal o ramificado, y n es, de media, 1-14.
- 50 11. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, **caracterizado por que** el agente tensioactivo se selecciona entre alcohol graso de coco, poliglicoléteres, tensioactivos catiónicos, tensioactivos anfóteros y otros tipos de tensioactivos no iónicos.
- 55 12. El proceso según la reivindicación 7, **caracterizado por que** los agentes biocidas, antibióticos y tensioactivos están en forma de polvo, píldora, comprimido o líquido para la adición al mosto que se va a fermentar.