

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 902**

51 Int. Cl.:

A01N 37/02	(2006.01) C12N 1/14	(2006.01)
A01N 37/04	(2006.01) C12N 1/20	(2006.01)
A01N 37/10	(2006.01) C12N 1/18	(2006.01)
A01N 37/36	(2006.01)	
A01N 37/40	(2006.01)	
C12P 7/06	(2006.01)	
A01P 1/00	(2006.01)	
A61K 31/19	(2006.01)	
A61K 31/192	(2006.01)	
A61K 31/194	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027675**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14152734**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14719582 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2967043**

54 Título: **Composiciones sinérgicas que contienen ácido cítrico y ácido propiónico para controlar microorganismos en procesos de fermentación**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313834259

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2017

73 Titular/es:

**SOLENI TECHNOLOGIES CAYMAN, L.P.
(100.0%)
Mühlentalstrasse 38
8200 Schaffhausen, CH**

72 Inventor/es:

**CONSALO, CORINNE, E. y
CHAPMAN, JOHN, S.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 634 902 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

Composiciones sinérgicas que contienen ácido cítrico y ácido propiónico para controlar microorganismos en procesos de fermentación

5

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos de control de microorganismos no deseados en procesos de fermentación tal como se define en las reivindicaciones 1, 5 y 6 usando una combinación de ácido cítrico o su sal y ácido propiónico o su sal a la razón de desde 32:1 hasta 1:32.

10

Antecedentes de la invención

Se usan microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias para producir varios productos de fermentación, tales como etanol de calidad industrial, bebidas alcohólicas destiladas, cerveza, vino, productos farmacéuticos y nutracéuticos (productos alimenticios que proporcionan beneficios para la salud, tales como alimentos enriquecidos y complementos dietéticos), productos químicos industriales y de la industria panificadora.

15

Se usa comúnmente levadura en procesos de fermentación. Un tipo común de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*, la especie predominantemente usada en panadería y fermentación. También se usan levaduras distintas de *Saccharomyces*, también conocidas como levaduras no convencionales, para preparar varios productos comerciales.

20

También pueden usarse otros microorganismos en la preparación de productos de fermentación. Por ejemplo, la producción de etanol celulósico, producción de etanol a partir de biomasa celulósica, utiliza hongos y bacterias. Los ejemplos de estos hongos celulolíticos incluyen *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride*. Un ejemplo de una bacteria usada en la producción de etanol celulósico es *Clostridium ljungdahlii*.

25

La mayoría de las levaduras usadas en destilerías y plantas de etanol para combustible se adquieren de fabricantes de levaduras especializadas. La levadura se fabrica a través de un proceso de propagación. La propagación implica hacer crecer una gran cantidad de levadura a partir de un pequeño cultivo de laboratorio de levadura. Durante la propagación, se proporcionan a la levadura oxígeno, nitrógeno, azúcares, proteínas, lípidos e iones que son necesarios o deseables para el crecimiento óptimo a través de respiración aerobia.

30

Una vez en la destilería, la levadura puede someterse a acondicionamiento. El acondicionamiento es diferente de la propagación porque no implica hacer crecer una gran cantidad a partir de un pequeño cultivo de laboratorio. Durante el acondicionamiento, se proporcionan condiciones para rehidratar la levadura, sacarla de la hibernación y permitir una reproducción y un crecimiento anaerobio máximos. El objetivo de tanto la propagación como el acondicionamiento es suministrar un gran volumen de levadura al tanque de fermentación con alta viabilidad, alta gemación y un bajo nivel de infección por otros microorganismos.

35

40

Tras la propagación y/o el acondicionamiento, la levadura entra en el proceso de fermentación. La levadura se combina en una disolución acuosa con azúcares fermentables. La levadura consume los azúcares, convirtiéndolos en alcoholes alifáticos, tales como etanol.

45

El proceso de fermentación comienza con la preparación de un hidrato de carbono fermentable. En la producción de etanol, el maíz es un posible hidrato de carbono fermentable. Otros hidratos de carbono incluyendo granos de cereal y materiales que llevan celulosa-almidón, tales como trigo o mijo, podrían ser también sustitutos. También podría usarse biomasa celulósica tal como paja y tallos de maíz. La producción de etanol celulósico ha recibido recientemente atención porque usa biomasa no alimentaria fácilmente disponible para formar un combustible valioso.

50

Los procesos de propagación, acondicionamiento y fermentación pueden llevarse a cabo usando métodos continuos o discontinuos. El proceso discontinuo se usa para la producción a pequeña escala. Cada lote se completa antes de que comience uno nuevo. El método de fermentación continuo se usa para la producción a gran escala porque produce un suministro continuo sin volver a empezar cada vez.

55

Durante el proceso de propagación, acondicionamiento o fermentación, el macerado o la mezcla de fermentación puede contaminarse con otros microorganismos, tales como bacterias nocivas. Estos microorganismos compiten con la especie deseada de levadura por los azúcares fermentables y otros hidratos de carbono fermentables y retardan la reacción bioquímica deseada dando como resultado un menor rendimiento de producto. Esto puede producir también subproductos químicos no deseados, que pueden provocar el deterioro de todos los lotes de fermentación.

60

Los productores de etanol intentan aumentar la cantidad de etanol producida a partir de una fanega de granos de cereal (aproximadamente 56 libras (25,4 kilogramos)). La contaminación por microorganismos reduce la eficacia de la levadura, haciendo difícil lograr o superar los niveles deseados de 2,8-2,9 galones de etanol por fanega (0,42-0,44

65

litros por kilogramo). La reducción de la concentración de microorganismos estimulará la propagación y/o el acondicionamiento de la levadura y aumentará la eficacia de la levadura haciendo posible lograr y superar estos niveles deseados.

5 Durante cualquiera de estos tres procesos, la levadura puede contaminarse con levaduras, bacterias no deseadas u otros microorganismos no deseados. Esto puede producirse en uno de los muchos recipientes usados en la propagación, el acondicionamiento o la fermentación. Esto incluye, pero no se limita a, tanques de propagación, tanques de acondicionamiento, tanques iniciadores, tanques de fermentaciones y tuberías e intercambiadores de calor entre estas unidades.

10 La contaminación bacteriana o microbiana reduce el rendimiento de producto de fermentación de tres modos principales. En primer lugar, los azúcares que podrían estar disponibles para que la levadura produzca alcohol son consumidos por las bacterias u otros microorganismos no deseados y se desvían de la producción de alcohol, reduciendo el rendimiento. En segundo lugar, los productos finales del metabolismo microbiano, tales como ácido láctico y ácido acético, inhiben el crecimiento de la levadura y la fermentación/respiración de la levadura, lo que da como resultado una producción de la levadura menos eficaz. Finalmente, las bacterias u otros microorganismos no deseados compiten con la levadura por nutrientes distintos de azúcar.

20 Después de que el recipiente o sistema de fermentación se haya contaminado con bacterias u otros microorganismos no deseados, esas bacterias u otros microorganismos pueden crecer mucho más rápidamente que la levadura deseada. Las bacterias u otros microorganismos compiten con la levadura por los azúcares fermentables y retardan la reacción bioquímica deseada dando como resultado un menor rendimiento de producto. Las bacterias también producen subproductos químicos no deseados, que pueden provocar el deterioro de todos los lotes de fermentación. La eliminación de estas bacterias u otros microorganismos no deseados permite que la levadura deseada prospere, lo que da como resultado una mayor eficacia de producción.

25 Tan sólo una disminución de un uno por ciento en el rendimiento de etanol es altamente significativa para la industria del etanol para combustible. En instalaciones más grandes, una disminución de este tipo en la eficacia reducirá los ingresos desde 1 millón hasta 3 millones de dólares al año.

30 Algunos métodos de reducción de bacterias u otros microorganismos no deseados durante la propagación, el acondicionamiento y la fermentación se aprovechan de la tolerancia al pH y la temperatura superior de las levaduras con respecto a otros microorganismos. Esto se realiza aplicando calor o disminuyendo el pH de la disolución de levadura. Sin embargo, estos procesos no son totalmente eficaces en el retardo del crecimiento bacteriano. Además, los microorganismos de levadura deseables, aunque sobreviven, se ven sometidos a estrés y no son tan vigorosos o sanos. Por tanto, las levaduras tampoco tienen un buen rendimiento.

35 La tendencia predominante en la industria del etanol es a reducir el pH del macerado (materia prima) hasta menos de 4,5 al inicio de la fermentación. La disminución del pH del macerado reduce la población de algunas especies de bacterias. Sin embargo, es mucho menos eficaz en la reducción de bacterias problemáticas, tales como bacterias productoras de ácido láctico. También reduce significativamente el rendimiento de etanol al someter a estrés a la levadura usada para la producción de etanol.

45 Otro enfoque implica lavar la levadura con ácido fosfórico. Este método no destruye eficazmente las bacterias y otros microorganismos. También puede suponer un estrés para la levadura usada para la producción de etanol, disminuyendo de ese modo su eficacia.

50 Aún otro método es usar calor o productos químicos fuertes para esterilizar el equipo de proceso entre lotes. Es ineficaz destruyendo bacterias y otros microorganismos dentro de la mezcla de levaduras durante la producción.

55 En aún otro método, se añaden antibióticos al lote de propagación, acondicionamiento o fermentación de levaduras para neutralizar las bacterias. Las industrias de la fermentación aplican normalmente antibióticos a los procesos de acondicionamiento, propagación y fermentación. Las tasas de dosificación de antibióticos oscilan entre 0,1 y 3,0 mg/l y generalmente no superan 6 mg/l. Sin embargo, existen problemas con el uso de antibióticos en el acondicionamiento, la propagación y la fermentación. Los antibióticos son caros y pueden añadir un gran coste a la producción a gran escala. Además, los antibióticos no son eficaces contra todas las cepas de bacterias, tales como cepas de bacterias resistentes a antibióticos. El uso excesivo de antibióticos puede conducir a la creación de variantes adicionales de cepas de bacterias resistentes a antibióticos.

60 Los residuos de antibióticos y el establecimiento de cepas resistentes a antibióticos es una preocupación global. Estas preocupaciones pueden conducir a una acción regulatoria futura contra el uso de antibióticos. Un área de preocupación son los granos de destilería que se usan para pienso para animales. Los granos de destilería son el residuo de grano del proceso de fermentación. Los países europeos no permiten que los subproductos de una planta de etanol se vendan como pienso para animales si se usan antibióticos en la instalación. Las ventas de granos de destilería representan hasta el 20 % de las ganancias de una planta de etanol. La concentración de antibiótico en el subproducto puede oscilar entre el 1-3 % en peso, anulando por tanto esta importante fuente de ingresos.

Además, hay otros problemas a considerar cuando se usan antibióticos. Las mezclas de antibióticos deben equilibrarse y cambiarse frecuentemente con el fin de evitar usos de un solo tipo que conducirán a cepas resistentes a antibióticos. Algunas veces no puede añadirse la cantidad eficaz de antibiótico a la mezcla de fermentación. Por ejemplo, la utilización de más de 2 mg/l de virginiamicina suprimirá la fermentación, pero se requieren más de 25 mg/l para inhibir el crecimiento de *Weissella confusa*, una cepa bacteriana problemática emergente. La sobredosisificación o el uso excesivo de antibiótico puede suponer un estrés para la levadura y tener un impacto sobre la eficacia o provocar un no cumplimiento regulatorio.

El documento US 2011/054024 A1 da a conocer el uso de ácidos de lúpulo y sus mezclas para controlar los microbios no deseados que compiten con la levadura por los nutrientes. Con la reciente expansión del etanol para combustible, se han utilizado ácidos de lúpulo en un grado minoritario para tratar microbios no deseados, Gram-positivos. La competición entre levaduras y microbios no deseados da como resultado una pérdida de rendimiento de etanol para combustible ya que los microbios no deseados, principalmente *Lactobacillus* y *Acetobacter*, reducen la eficacia de la fermentación. En bebidas, los microbios competidores no sólo reducen la eficacia sino que pueden alterar la estética y el sabor del producto final.

Los ácidos orgánicos tienen muchas aplicaciones, incluyendo su uso como acidificantes, tampones, antioxidantes, quelantes, sinergistas, complementos dietéticos, agentes aromatizantes, conservantes y antimicrobianos. Se han usado ácidos orgánicos como conservantes debido a su efecto sobre las bacterias. El modo de acción del ácido orgánico es que los ácidos no disociados penetran en la pared celular bacteriana por medio de difusión pasiva y alteran la fisiología normal de la célula de dos modos: los ácidos se disocian y por tanto disminuyen el pH interno, que normalmente está próximo al pH neutro, afectando a la función de las bacterias. La parte aniónica del ácido que es incapaz de salir de la célula en su forma disociada se acumula dentro de la misma, alterando las funciones metabólicas y aumentando la presión osmótica.

Saithong P *et al.* (Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(3), 216-219) describen el uso de acetato para la prevención de la contaminación bacteriana durante la producción de bioetanol a partir de melazas. El documento CN 101449740 A da a conocer la fermentación de residuos de frutas o pulpa de remolacha con *Lactobacillus acidophilus* que comprende añadir ácido propiónico en combinación con ácido benzoico, ácido sórbico o ácido cítrico para la inhibición de microorganismos no deseados. El documento CN 1 414 092 A da a conocer un medio de fermentación acuoso que comprende propionato de sodio y citrato de hierro (véase la reivindicación 9). Claudia Cristina A. Do A. Santos *et al.* (Journal of the Institute of Brewing, 2013, 119(4), 280-287) describen la fermentación de zumo de naranja que contiene ácido cítrico y ácido propiónico con *Saccharomyces cerevisiae*. ENERGAIID® disolución oral para el tratamiento de diarrea por *E. Coli* que contiene citrato de sodio 4865 ppm, acetato de sodio y propionato de sodio 955 ppm. El aditivo para pienso antimicrobiano NOVIBAC®CF 60 contiene formiato, propionato y ácido cítrico. El documento US 2011/027387 A1 da a conocer un aditivo antibacteriano para agua potable que contiene ácido cítrico y ácido propiónico.

Puesto que pequeñas disminuciones en el rendimiento de etanol son altamente significativas para la industria del etanol para combustible, los productores de etanol están buscando constantemente modos para aumentar la eficacia. Se usan antimicrobianos para eliminar, reducir o controlar de otro modo el número de microbios en los sistemas acuosos. Sin embargo, el uso de antimicrobianos añadirá siempre un coste a las operaciones y los productos. Además, algunos antimicrobianos pueden tener deficiencias en su espectro de acción antimicrobiana o limitaciones operativas en su manera de aplicación, tales como falta de estabilidad a la temperatura o susceptibilidad a la inactivación por factores medioambientales o químicos.

Se sabe que la presencia de microorganismos en sistemas de agua industriales es un problema significativo en procesos industriales, provocando problemas con la calidad de producto y los rendimientos de producto disminuidos. Un ejemplo específico de esto es en el biorrefinado de maíz para dar etanol, en donde se introducen bacterias del ácido láctico en el proceso por medio de las reservas de maíz. Durante la fermentación, estas bacterias compiten con la levadura productora de etanol por el sustrato y los nutrientes, lo que disminuye el rendimiento de etanol. Actualmente, casi todas las plantas de biorrefinado estadounidenses utilizan un agente antimicrobiano y muchas de ellas usan antibióticos tales como virginiamicina. Un producto importante del biorrefinado de maíz son granos de destilería secados para su uso como pienso para animales, y el mercado de granos para pienso libres de antibióticos está creciendo. Se espera que la FDA formalice pronto regulaciones que reduzcan o eliminen el uso de antibióticos en pienso para animales. Canadá tiene preocupaciones similares con respecto a los antibióticos en granos de destilería y la mayor parte de su producción se exporta. Europa ha prohibido ya el uso de antibióticos en plantas de etanol en donde se producen granos de destilería para pienso para animales. En Brasil, el funcionamiento libre de antibióticos es obligatorio en plantas que producen extracto de levaduras para la exportación.

El control de los microbios es muy significativo para muchas industrias y la estrategia predominante es el tratamiento con antimicrobianos. Se usan antimicrobianos para eliminar, reducir o controlar de otro modo el número de microbios en sistemas acuosos. Sin embargo, el uso de la mayoría de los antimicrobianos añadirá un coste a las operaciones y los productos y por tanto se buscan modos más eficaces para lograr el control microbiano. Además, muchos antimicrobianos tienen deficiencias en su espectro de acción antimicrobiana o limitaciones operativas en su manera

de aplicación tales como falta de estabilidad térmica o susceptibilidad a la inactivación por factores medioambientales o químicos.

5 Por tanto, pueden usarse combinaciones de antimicrobianos, y en particular, se prefieren combinaciones sinérgicas de antimicrobianos. Las combinaciones sinérgicas de antimicrobianos pueden suministrar un efecto antimicrobiano mayor que la suma de los antimicrobianos individuales y por tanto pueden proporcionar un rendimiento de coste mejorado con respecto a las combinaciones que son meramente aditivas en cuanto a eficacia antimicrobiana.

10 Descripción de la invención

10 Para los fines de esta memoria descriptiva, el significado de "microorganismos" y "microbios" incluye, pero no se limita a, bacterias, hongos, algas, protozoos y virus. Microbios preferidos contra los que son eficaces las composiciones de la invención son bacterias. Los ejemplos de bacterias no deseadas incluyen, pero no se limitan a, bacterias productoras de ácido láctico, bacterias productoras de ácido acético y otras bacterias que contaminan procesos de fermentación de etanol. Se entiende también que los microbios dentro de sistemas acuosos pueden estar ubicados o suspendidos dentro del fluido (por ejemplo, planctónicos) o localizados sobre una superficie en contacto con el sistema acuoso (por ejemplo, biopelículas). Las palabras y frases "control", "control microbiano", "controlar" y "eficacia antimicrobiana" debe interpretarse que incluyen, dentro de su significado, sin limitarse a, la inhibición del crecimiento de microbios, la destrucción de microbios, desinfección, conservación, higienización o prevención de que vuelvan a crecer microbios.

Tal como se usa en el presente documento, ppm se mide como masa por volumen o 1 ppm es igual a 1 mg (activo) por litro. Dosificación se refiere a la concentración del componente en el sistema acuoso que está tratándose.

25 Tal como se usa en el presente documento el término "ácido orgánico" también se refiere a su sal.

La presente invención se refiere a un método de control de la concentración de microorganismos no deseados en un sistema acuoso empleado en un proceso de fermentación, comprendiendo el método las etapas de: (a) introducir un hidrato de carbono fermentable en una disolución acuosa; (b) introducir al menos una levadura en dicha disolución; 30 (c) introducir un primer ácido orgánico y un segundo ácido orgánico en el sistema acuoso, en el que el primer ácido orgánico es ácido cítrico o su sal, el segundo ácido orgánico es ácido propiónico o su sal, y la razón del primer ácido orgánico o su sal con respecto al segundo ácido orgánico o su sal es de desde 32:1 hasta 1:32.

La presente invención se refiere además a un método de control de la concentración de microorganismos no deseados en una disolución de fluido acuoso empleada en un proceso de fermentación, comprendiendo el método las etapas de: (a) introducir un hidrato de carbono fermentable en una disolución acuosa; (b) introducir al menos un microorganismo deseado que es capaz de fermentar hidrato de carbono en dicha disolución acuosa; (c) introducir un primer ácido orgánico y un segundo ácido orgánico en el sistema acuoso, en el que el primer ácido orgánico es ácido cítrico o su sal, el segundo ácido orgánico es ácido propiónico o su sal, y la razón del primer ácido orgánico o su sal con respecto al segundo ácido orgánico o su sal es de desde 32:1 hasta 1:32. 40

La presente invención también se refiere a un método de control del crecimiento microbiano no deseado en caldos de fermentación o sistemas o procesos de fermentación industriales, consistiendo el método en la etapa de añadir a un caldo de fermentación o sistema o proceso de fermentación industrial una composición acuosa que comprende: 45 (a) un primer ácido orgánico y (b) un segundo ácido orgánico; en el que el primer ácido orgánico es ácido cítrico o su sal; el segundo ácido orgánico es ácido propiónico o su sal; y la razón del primer ácido orgánico o su sal con respecto al segundo ácido orgánico o su sal es de desde 32:1 hasta 1:32.

El pH del sistema acuoso que va a tratarse es generalmente de desde 3 hasta 11, o desde 3 hasta 7, o desde 4 hasta 9, o desde 4 hasta 8, o desde 4 hasta 6,5, o desde 4,5 hasta 6. En general, los ácidos orgánicos funcionan de la mejor manera en sistemas en los que el pH del sistema es inferior a al menos uno de los valores de pKa del ácido o su sal.

Los componentes de la composición pueden añadirse al sistema acuoso que va a tratarse secuencialmente o combinarse y luego añadirse al sistema que va a tratarse. Los ácidos orgánicos pueden añadirse a los sistemas acuosos complementarios con otros aditivos tales como, pero sin restringirse necesariamente a, tensioactivos, compuestos de control de la incrustación y corrosión, polímeros iónicos y no iónicos, agentes de control del pH y otros aditivos usados para alterar o modificar la química del sistema acuoso. Los ácidos orgánicos se añaden a los sistemas que van a tratarse en las razones del primer ácido con respecto al segundo ácido de desde 32:1 hasta 1:32, o razones de desde 32:1 hasta 1:16, o razones de desde 8:1 hasta 1:32, o razones de desde 8:1 hasta 1:16 o razones de desde 8:1 hasta 1:8. 60

El primer ácido orgánico es ácido cítrico y la razón de ácido cítrico con respecto al segundo ácido orgánico es de desde 32:1 hasta 1:32 o desde 8:1 hasta 1:32 o desde 8:1 hasta 1:16. El segundo ácido orgánico es ácido propiónico o sus sales. Puede usarse ácido cítrico en cantidades de desde 12500 ppm hasta 100 ppm en el sistema acuoso que va a tratarse. Podría usarse ácido cítrico en una cantidad de desde 6250 hasta 200 ppm o desde 4000 65

hasta 200 ppm o desde 4000 hasta 300 ppm en el sistema acuoso que va a tratarse. Generalmente se usan al menos 100 ppm, o al menos 200 ppm, o al menos 300 ppm de ácido cítrico o su sal en el sistema acuoso que va a tratarse.

5 En una realización de la invención la razón de ácido cítrico con respecto a ácido propiónico es de desde 32:1 hasta 1:16 y la cantidad del primer ácido orgánico en el sistema acuoso que va a tratarse es de desde 200 hasta 1000 ppm.

10 Los ejemplos de bacterias no deseadas para las que la invención es útil incluyen bacterias productoras de ácido láctico o bacterias productoras de ácido acético. Estas incluyen, pero no se limitan a, *Lactobacillus* y *Acetobacter*.

15 Cuando se usan en un sistema de fermentación, los ácidos pueden añadirse en diversas ubicaciones en el sistema de fermentación de manera que pueden añadirse en una única o en múltiples ubicaciones en el proceso de fermentación, incluyendo el/los tanque(s) de suspensión, hornillos, enfriadores de macerado, propagadores y tanques de fermentación. Un experto en la técnica también puede determinar otros puntos de adición.

20 En sistemas de fermentación que usan el presente método, las concentraciones de bacterias y otros microorganismos no deseados pueden reducirse al tiempo que se estimula la propagación y/o el acondicionamiento de microorganismos deseados. Se ha descubierto que el ácido cítrico o su sal en combinación con ácido propiónico o su sal es eficaz en la reducción de la concentración de bacterias no deseadas y otros microorganismos no deseados al tiempo que estimula simultáneamente la propagación y/o el acondicionamiento de microorganismos deseados. Dicha combinación proporciona un tratamiento sinérgico, antimicrobiano sin el uso de antibióticos.

25 En los métodos definidos en las reivindicaciones 1-6, las etapas pueden realizarse secuencialmente o en un orden diferente. El primer ácido orgánico y el segundo ácido orgánico pueden ponerse en contacto con la levadura o con el hidrato de carbono de fermentación; o la levadura y el hidrato de carbono fermentable pueden combinarse y luego introducirse el primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico en la combinación de levadura e hidrato de carbono. El primer ácido orgánico y el segundo ácido orgánico pueden combinarse entre sí y luego añadirse al sistema acuoso o pueden añadirse por separado al sistema acuoso. El sistema acuoso puede estar en un sistema continuo o puede estar en un tanque en el caso de un proceso discontinuo.

35 En los métodos de las reivindicaciones 1-9 los microorganismos "no deseados" que se pretenden reducir son los que compiten por los nutrientes con los microorganismos deseados que promueven los procesos de fermentación deseados. En este sentido, el primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico empleados en el presente método preferiblemente no afectan de manera perjudicial al crecimiento y la viabilidad de microorganismos deseados, que promueven la fermentación, sino que eliminan o suprimen el crecimiento de microorganismos no deseados que interfieren con el proceso de fermentación. Además, la eliminación o supresión de microorganismos no deseados tiene un efecto favorable sobre el crecimiento y la viabilidad de microorganismos deseados. La producción de etanol para combustible mediante fermentación de levaduras se usa como ejemplo de dónde puede usarse la presente invención. Otros procesos de fermentación que podrían emplear la combinación de ácido cítrico, conjuntamente con ácido propiónico podrían incluir la producción de bebidas alcohólicas destiladas, cerveza, vino, productos farmacéuticos, productos intermedios farmacéuticos, productos de panadería, nutracéuticos (productos alimenticios que proporcionan beneficios para la salud, tales como alimentos enriquecidos y complementos dietéticos), productos intermedios nutracéuticos, materias primas químicas industriales y enzimas. El presente método también podría utilizarse para tratar levadura usada en la industria panificadora.

50 La levadura no es el único microorganismo beneficioso usado en la fermentación. También podrían usarse microorganismos fermentadores deseados adicionales y resultar beneficiados por la invención tales como los hongos y las bacterias normalmente usados en la producción de etanol celulósico. Algunos ejemplos no limitativos de microorganismos fermentadores deseados incluyen, pero no se limitan a, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, y *Clostridium ljungdahlii*.

55 El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede añadirse en diversos puntos en los procesos de propagación, acondicionamiento y/o fermentación. El primer ácido orgánico, conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede añadirse a recipientes de cocción, tanques de fermentación, tanques de propagación, tanques de acondicionamiento, tanques iniciadores o durante la licuefacción. El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico también puede añadirse directamente al macerado de maíz. El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico también puede añadirse al sistema de intercambio de calor intermedio o intercambiadores de calor. El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico también puede añadirse a las tuberías entre estas unidades o intercambiadores de calor.

60 El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede añadirse directamente a la mezcla de fermentación. Esto puede realizarse añadiendo el primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico conjuntamente con la levadura u otro microorganismo deseado e hidrato de carbono fermentable, por ejemplo durante la fase de SSF (sacarificación y fermentación simultáneas). Pueden añadirse directamente las dosificaciones de primer ácido orgánico de entre 200 y 10000 ppm o 200 y 5000 ppm y las dosificaciones de segundo ácido orgánico de entre 200 y

10000 ppm o 200 y 5000 ppm a la mezcla de fermentación. La dosificación es la concentración en el sistema que está tratándose.

5 El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico también puede añadirse al macerado antes del proceso de fermentación. Pueden añadirse las dosificaciones de primer ácido orgánico de entre 200 y 10000 ppm o 200 y 5000 ppm y dosificaciones de ácido orgánico de entre 200 y 10000 ppm o 200 y 5000 ppm al macerado antes de la fermentación.

10 El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico también puede añadirse durante la propagación y/o el acondicionamiento. Por ejemplo el primer ácido orgánico y el segundo ácido orgánico pueden añadirse a la suspensión de levaduras reemplazando una etapa de lavado con ácido.

15 El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede usarse para lograr resultados mejorados en la producción de etanol celulósico. El etanol celulósico es un tipo de etanol que se produce a partir de celulosa, en contraposición a los azúcares y almidones usados en la producción de etanol basado en hidratos de carbono. La celulosa está presente en fuentes de biomasa no tradicionales tales como pasto varilla, rastrojo de maíz y restos forestales. Este tipo de producción de etanol es particularmente atractiva debido a la gran disponibilidad de fuentes de celulosa. El etanol celulósico, por la misma naturaleza del material de partida, introduce niveles superiores de contaminantes y microorganismos competidores en el proceso de fermentación. El primer ácido orgánico usado conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede usarse en la producción de etanol celulósico para controlar microorganismos no deseados.

25 Hay dos procesos principales de producción de alcohol a partir de celulosa. Un proceso es un proceso de hidrólisis que utiliza hongos, como por ejemplo *Trichoderma reesei* y/o *Trichoderma viride*. El otro es un proceso de gasificación usando una bacteria tal como *Clostridium ljungdahlii*. El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede utilizarse en cualquier proceso.

30 En el proceso de hidrólisis las cadenas de celulosa se descomponen en azúcares de cinco carbonos y seis carbonos antes del proceso de fermentación. Esto se realiza o bien química o bien enzimáticamente.

35 En el método de hidrólisis química la celulosa puede tratarse con ácido diluido a alta temperatura y presión o ácido concentrado a menor temperatura y presión atmosférica. En el proceso de hidrólisis química la celulosa reacciona con el ácido y agua para formar moléculas de azúcar individuales. Estas moléculas de azúcar se neutralizan entonces y se usa la fermentación de levadura para producir etanol. El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede usarse durante la parte de fermentación de levadura de este método.

40 La hidrólisis enzimática puede llevarse a cabo usando dos métodos. El primero se conoce como conversión microbiana directa (DMC). El método de DMC usa un único microorganismo para convertir la biomasa celulósica en etanol. El etanol y las enzimas requeridas se producen por el mismo microorganismo. El primer ácido orgánico conjuntamente con los segundos ácidos orgánicos puede usarse durante las etapas de propagación/acondicionamiento o fermentación con este organismo especializado.

45 El segundo método se conoce como método de hidrólisis enzimática. En este método las cadenas de celulosa se descomponen usando enzimas celulasa. Estas enzimas están presentes normalmente en los estómagos de rumiantes, tales como vacas y ovejas, para descomponer la celulosa que comen. El método enzimático se lleva a cabo normalmente en cuatro o cinco fases. La celulosa se trata previamente para preparar el material de partida, tal como madera o paja, más propenso a la hidrólisis. A continuación se usan las enzimas celulasa para romper las moléculas de celulosa en azúcares fermentables. Tras la hidrólisis, los azúcares se separan de los materiales residuales y se añaden a la levadura. Los azúcares del hidrolizado se fermentan para dar etanol usando levadura. Finalmente, se recupera el etanol mediante destilación. Alternativamente, la hidrólisis y fermentación pueden llevarse a cabo juntas usando hongos o bacterias especiales que logran ambos procesos. Cuando se llevan a cabo ambas etapas juntas, el proceso se denomina hidrólisis y fermentación secuenciales (SHF).

55 El primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico pueden introducirse para lograr la eficacia microbiológica en diversos puntos en el método enzimático de hidrólisis. El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede usarse en la producción, fabricación y fermentación de enzimas celulasa producidas por *Trichoderma* y otras cepas fúngicas. El primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico pueden añadirse en la fase de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) celulósicas. El primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico pueden introducirse en la fase de hidrólisis y fermentación secuenciales (SHF). Podrían introducirse también en un punto antes, durante o después de la fermentación por hongos celulolíticos que crean las enzimas celulasa. Alternativamente el primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico pueden añadirse durante la fase de fermentación de levadura, tal como se comentó anteriormente.

65 El proceso de gasificación no rompe la cadena de celulosa en moléculas de azúcar. En primer lugar, el carbono en la celulosa se convierte en monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno en una reacción de combustión parcial. Entonces, el monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno se suministran a un fermentador

especial que usa un microorganismo tal como *Clostridium ljungdahlii* que es capaz de consumir el monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno para producir etanol y agua. Finalmente, el etanol se separa del agua en una etapa de destilación. El primer ácido orgánico conjuntamente con el segundo ácido orgánico puede usarse como agente antimicrobiano en la etapa de fermentación que implica microorganismos tales como *Clostridium ljungdahlii* que son capaces de consumir monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno para producir etanol y agua.

En una realización no limitativa, el primer ácido orgánico y el segundo ácido orgánico se añaden a un tanque y se diluyen hasta una concentración predeterminada a una razón predeterminada. En el tanque, el primer ácido orgánico y el segundo ácido orgánico se disuelven en agua para formar una combinación de primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico. La concentración del primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico en el tanque discontinuo puede variar a lo largo de un amplio intervalo. El primer ácido orgánico y segundo ácido orgánico salen entonces del tanque discontinuo a través de una salida a una tasa de dosificación especificada para crear una disolución de la concentración deseada.

15 Ejemplos

Los índices de sinergia notificados en los siguientes ejemplos usan la siguiente fórmula, que se notificó por primera vez en F.C. Kull, P.C. Eisman, H.D. Silwestrowka, y R.L. Mayer, Letts. En Applied Microbiology 9:538-541, 1961:

$$20 \quad \text{Índice de sinergia} = Q_a/Q_A + Q_b/Q_B$$

en donde Q_a es la concentración de antimicrobiano A requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de prueba cuando se usa en combinación con el antimicrobiano B;

25 Q_A es la concentración de antimicrobiano A requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de prueba cuando se usa solo;

Q_b es la concentración de antimicrobiano B requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de prueba cuando se usa en combinación con el antimicrobiano A;

30 Q_B es la concentración de antimicrobiano B requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de prueba cuando se usa solo.

Un índice de sinergia (SI) de 1 indica que las interacciones entre los dos antimicrobianos son meramente aditivas, un SI de más de uno indica que los dos antimicrobianos son antagonistas entre sí, y un SI de menos de 1 indica que los dos antimicrobianos interactúan de una manera sinérgica.

Aunque hay diversos métodos conocidos por los expertos en la técnica para medir los niveles de actividad antimicrobiana, en los siguientes ejemplos el criterio de valoración usado se conoce como concentración inhibitoria mínima, o CIM. Ésta es la menor concentración de una sustancia o sustancias que puede lograr una inhibición completa del crecimiento.

Con el fin de determinar la concentración inhibitoria mínima, se construye una dilución en serie a la mitad del antimicrobiano haciéndose las diluciones en medio de crecimiento. Se preparan las diluciones en una microplaca de 96 pocillos de manera que cada pocillo tiene un volumen final de 280 μ l de medio y antimicrobiano. El primer pocillo tiene, por ejemplo, una concentración de 1000 ppm de antimicrobiano, el segundo 500 ppm, el tercero 250 ppm, y así sucesivamente, no teniendo el pocillo 12^o y final en la fila antimicrobiano en absoluto y sirviendo como control de crecimiento positivo. Tras construirse la dilución en serie los pocillos reciben un inóculo de microbio suspendido en medio de crecimiento de manera que la concentración final de microbios en el pocillo es de $\sim 5 \times 10^5$ ufc/ml. En estos ejemplos el microbio de prueba usado es *Lactobacillus plantarum*. Se incuban los cultivos a 37 °C durante 18-24 horas, y se puntúan los pocillos como positivos o negativos para el crecimiento basándose en un examen visual para detectar pocillos turbios, siendo la turbidez un indicador de crecimiento. La menor concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento (por ejemplo, un pocillo transparente) se designa la concentración inhibitoria mínima.

Con el fin de determinar si la interacción entre dos antimicrobianos es aditiva, antagonista o sinérgica contra un microbio diana, se emplea una modificación del método de CIM conocida como el método de "damero" usando microplacas de 96 pocillos. Para construir una placa de damero se emplea el primer antimicrobiano usando el método de dilución en serie de dos veces usado para construir una placa de CIM, excepto porque cada una de las ocho filas es una dilución en serie idéntica que termina tras la octava columna. Se emplea el segundo antimicrobiano añadiendo volúmenes idénticos de una dilución en serie a la mitad en ángulos rectos con respecto a la primera serie. El resultado es que cada pocillo de la placa de 8 x 8 pocillos tiene una combinación diferente de concentraciones de antimicrobiano, produciendo 64 combinaciones diferentes en total. Las columnas 9^a y 10^a no reciben antimicrobiano en absoluto y sirven como controles de crecimiento positivo y negativo, respectivamente. Tras construirse la microplaca de damero, se inoculó con *Lactobacillus plantarum*, se incubó a 37 °C y se puntuó tal como se describió para el método de CIM.

Ejemplo 1: Sinergia de ácido cítrico con propionato de sodio

5 Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas para tanto ácido cítrico como propionato de sodio a pH 6 usando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como microbio de prueba. Se construyeron las placas de sinergia de damero tal como se describió, se inocularon los pocillos hasta una concentración final de $\sim 5 \times 10^5$ ufc/ml, se incubaron durante 18-24 horas y luego se puntuaron visualmente para determinar el crecimiento/ausencia de crecimiento. Se calcularon los índices de sinergia según la fórmula descrita por Kull *et al.*
 10 Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar ácido cítrico y propionato de sodio es mayor que el efecto de cualquier antimicrobiano solo. La cantidad de ácido cítrico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se reduce en más de un orden de magnitud, desde 100.000 ppm hasta 3.125-6.250 ppm. La concentración de propionato de sodio desciende en al menos el 50 por ciento, desde 100.000 ppm hasta un intervalo de 12.500-50.000 ppm.

Tabla 1					
Usados solos		Usados en combinación			
CIM de ácido cítrico (QA), ppm	CIM de ácido propiónico (QB), ppm	CIM de ácido cítrico (Qa), ppm	CIM de ácido propiónico (Qb), ppm	Razón de ácido cítrico:propionato de sodio	Índice de sinergia
100000	100000	6250	12500	1:2	0,19
100000	100000	3125	50000	1:16	0,53

15 Ejemplo 2: Sinergia de ácido cítrico con propionato de sodio

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas para tanto ácido cítrico como propionato de sodio a pH 5 usando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como microbio de prueba. Se usaron diferentes pH para las pruebas debido a que estos ácidos orgánicos débiles tienen diversos valores de pKa que influyen en su eficacia. A pH 5, la CIM del ácido cítrico se reduce desde 100.000 ppm (pH 6) hasta 25.000 ppm. Se construyeron placas de sinergia de damero tal como se describió, se inocularon los pocillos hasta una concentración final de $\sim 5 \times 10^5$ ufc/ml, se incubaron durante 18-24 horas y luego se puntuaron visualmente para determinar el crecimiento/ausencia de crecimiento. Se calcularon los índices de sinergia según la fórmula descrita por Kull *et al.*
 20 Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar ácido cítrico y propionato de sodio es mayor que el efecto de cualquier antimicrobiano solo. La cantidad de ácido cítrico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se reduce en el 50 % o más, desde 25.000 ppm hasta 3.125-12.500 ppm. La concentración de propionato de sodio desciende un 50 % o más, desde 100.000 ppm hasta un intervalo de 391-50.000 ppm.

Tabla 2						
	Usados solos		Usados en combinación			
	CIM de ácido cítrico (QA), ppm	CIM de propionato de sodio (QB), ppm	CIM de ácido cítrico (Qa) ppm	CIM de propionato de sodio (QB), ppm	Razón de ácido cítrico:propionato de sodio	Índice de sinergia
2a	25000	100000	25000	391	64:1	1,00
2b	25000	100000	12500	391	32:1	0,50
2c	25000	100000	6250	25000	1:4	0,50
2d	25000	100000	3125	50000	1:16	0,63

30

REIVINDICACIONES

1. Método de control de la concentración de microorganismos no deseados en un sistema acuoso empleado en un proceso de fermentación, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) introducir un hidrato de carbono fermentable en una disolución acuosa;
- (b) introducir al menos una levadura en dicha disolución;
- 10 (c) introducir un primer ácido orgánico y un segundo ácido orgánico en el sistema acuoso,
- en el que el primer ácido orgánico es ácido cítrico o su sal, el segundo ácido orgánico es ácido propiónico o su sal, y la razón del primer ácido orgánico o su sal con respecto al segundo ácido orgánico o su sal es de desde 32:1 hasta 1:32.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el primer ácido orgánico tiene una concentración de al menos 100 ppm en el sistema acuoso que está tratándose.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el primer ácido orgánico tiene una concentración de al menos 20 100 ppm y hasta 12500 ppm en el sistema acuoso que está tratándose.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la razón de ácido cítrico con respecto a ácido propiónico es de desde 32:1 hasta 1:16 y la cantidad del primer ácido orgánico en el sistema acuoso que va a tratarse es de desde 100 hasta 12500 ppm.
- 25 5. Método de control de la concentración de microorganismos no deseados en una disolución de fluido acuoso empleada en un proceso de fermentación, comprendiendo el método las etapas de:
- 30 (a) introducir un hidrato de carbono fermentable en una disolución acuosa
- (b) introducir al menos un microorganismo deseado que es capaz de fermentar hidrato de carbono en dicha disolución acuosa;
- 35 (c) introducir un primer ácido orgánico y un segundo ácido orgánico en el sistema acuoso,
- en el que el primer ácido orgánico es ácido cítrico o su sal, el segundo ácido orgánico es ácido propiónico o su sal, y la razón del primer ácido orgánico o su sal con respecto al segundo ácido orgánico o su sal es de desde 32:1 hasta 1:32.
- 40 6. Método de control del crecimiento microbiano no deseado en caldos de fermentación o sistemas o procesos de fermentación industriales, consistiendo el método en la etapa de añadir a un caldo de fermentación o sistema o proceso de fermentación industrial una composición acuosa que comprende:
- 45 (a) un primer ácido orgánico y
- (b) un segundo ácido orgánico;
- en el que el primer ácido orgánico es ácido cítrico o su sal; el segundo ácido orgánico es ácido propiónico o su sal; y la razón del primer ácido orgánico o su sal con respecto al segundo ácido orgánico o su sal es de desde 32:1 hasta 1:32.
- 50 7. Método según la reivindicación 6, en el que el primer ácido orgánico tiene una concentración de al menos 100 ppm en el sistema acuoso.
- 55 8. Método según la reivindicación 6, en el que el primer ácido orgánico tiene una concentración de al menos 100 ppm y hasta 12500 ppm en el sistema acuoso que esta tratándose.
9. Método según la reivindicación 6, en el que la razón de ácido cítrico con respecto a ácido propiónico es de desde 32:1 hasta 1:16 y la cantidad del primer ácido orgánico en el sistema acuoso que va a tratarse es de desde 100 hasta 12500 ppm.
- 60