

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 217**

51 Int. Cl.:

A01N 59/00	(2006.01) C12P 7/06	(2006.01)
A01N 49/00	(2006.01)	
A01N 65/00	(2009.01)	
A01N 65/08	(2009.01)	
A01N 35/06	(2006.01)	
A01N 37/02	(2006.01)	
A01N 37/04	(2006.01)	
A01N 37/10	(2006.01)	
C12N 1/00	(2006.01)	
A01N 37/36	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/027614**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14152683**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14722447 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017** **EP 2967074**

54 Título: **Mezclas sinérgicas de antimicrobianos útiles para controlar microorganismos en procesos industriales**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791168 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 646 217 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).

DESCRIPCION

Mezclas sinérgicas de antimicrobianos útiles para controlar microorganismos en procesos industriales

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a combinaciones sinérgicas de antimicrobianos y procedimientos mediante su uso para el control de microorganismos en procesos industriales, materiales o productos en los que su presencia se considera indeseable.

Antecedentes de la invención

- 10 Se sabe que la presencia de microorganismos en sistemas de agua industriales puede ser un problema significativo en los procesos industriales, causando problemas con la disminución de los rendimientos del producto, la calidad del producto y la eficiencia del proceso.

- 15 La presencia física de microbios puede causar problemas, tales como su crecimiento en biopelículas en superficies de intercambio de calor en las que provocan reducciones en la eficiencia de transferencia de calor. La capacidad de los microbios para consumir una amplia variedad de materiales puede provocar reducciones en los rendimientos, por ejemplo, cuando el microbio que consume celulosa causa pérdida de rendimiento en la industria papelera. Además, la producción de productos metabólicos por contaminación de microbios puede causar problemas, tales como su producción de productos ácidos que pueden causar problemas de calidad del producto o contribuir a problemas de corrosión.

- 20 Sin embargo, en algunas industrias se utilizan microorganismos para producir una serie de productos de fermentación, tales como etanol de calidad industrial, bebidas destiladas, cerveza, vino, productos farmacéuticos y nutracéuticos (productos alimenticios que proporcionan beneficios para la salud, tales como alimentos fortificados y suplementos dietéticos), industria panadera y productos químicos industriales. En estos casos es deseable suprimir el crecimiento de microbios no deseados y promover el crecimiento de los deseados. En este contexto, los microbios no deseados son aquellos que compiten por sustrato con o producen productos metabólicos que interfieren con el crecimiento de los microbios deseados que están produciendo el producto final deseado.

- 25 Las levaduras son microbios comúnmente utilizados en procesos de fermentación. Un tipo común de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*, la especie predominantemente utilizada en cocción y fermentación. También se usan levaduras diferentes a *Saccharomyces*, también conocidas como levaduras no convencionales, para fabricar una serie de productos comerciales.

- 30 Otros microorganismos también pueden ser útiles en la fabricación de productos de fermentación. Por ejemplo, la producción de etanol celulósico, producción de etanol a partir de biomasa celulósica, utiliza hongos y bacterias. Ejemplos de estos hongos celulolíticos incluyen *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride*. Un ejemplo de una bacteria usada en la producción de etanol celulósico es *Crostridium ljungdahlii*.

- 35 La mayor parte de la levadura utilizada en destilerías y plantas de etanol combustible se compran a fabricantes de levaduras especiales. La levadura se fabrica a través de un proceso de propagación. La propagación implica el crecimiento de una gran cantidad de levadura a partir de un cultivo de laboratorio pequeño de levadura. Durante la propagación, se suministra oxígeno, nitrógeno, azúcares, proteínas, lípidos y iones a la levadura que son necesarios o deseables para un crecimiento óptimo a través de la respiración aeróbica.

- 40 Una vez en la destilería, la levadura puede someterse a acondicionamiento. El acondicionamiento es diferente a la propagación en que no implica el cultivo de una gran cantidad de un pequeño cultivo de laboratorio. Durante el acondicionamiento, se proporcionan condiciones para rehidratar la levadura, sacándola de la hibernación y permitiendo el máximo crecimiento anaeróbico y de reproducción. El objetivo de la propagación y el acondicionamiento es suministrar un gran volumen de levadura al tanque de fermentación con alta viabilidad, alto brote y un bajo nivel de infección por otros microorganismos.

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

- 50 El proceso de fermentación comienza con la preparación de un carbohidrato fermentable. En la producción de etanol, el maíz es una posible fuente de carbohidratos fermentables. Otras fuentes de carbohidratos, incluyendo granos de cereales y materiales que contienen almidón de celulosa, tales como trigo o mijo, también podrían ser sustituidos. La biomasa celulósica, como la paja y los tallos de maíz, también podría utilizarse. La producción de etanol celulósico ha recibido recientemente atención porque utiliza la biomasa no alimentaria fácilmente disponible para formar un combustible valioso.

Los procesos de propagación, acondicionamiento y fermentación pueden llevarse a cabo utilizando procesos discontinuos o continuos. El proceso por lotes se utiliza para la producción en pequeña escala. Cada lote se

completa antes de que comience uno nuevo. El procedimiento de fermentación continua se utiliza para la producción a gran escala porque produce un suministro continuo sin reiniciar cada vez.

5 Durante el proceso de propagación, acondicionamiento o fermentación, la pasta o la mezcla de fermentación puede contaminarse con otros microorganismos, tales como bacterias deteriorantes. Estos microorganismos compiten con las especies deseadas de levadura por los azúcares fermentables y retardan la reacción bioquímica deseada dando como resultado un rendimiento de producto más bajo. También pueden producir subproductos químicos no deseados, que pueden causar el deterioro de lotes enteros de la fermentación.

10 Los productores de etanol intentan aumentar la cantidad de etanol producido a partir de un bushel de granos de cereal (aproximadamente 56 libras (25,4 kilogramos). La contaminación por bacterias disminuye la eficiencia de la levadura lo que hace difícil alcanzar o superar los niveles deseados de 2,8-2,9 galones de etanol por bushel (0,42-0,44 litros por kilogramo). La reducción de la concentración de bacterias estimulará la propagación y/o acondicionamiento de la levadura y aumentará la eficacia de la levadura permitiendo alcanzar y superar estos niveles deseados.

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

20 La contaminación bacteriana reduce el rendimiento del producto de fermentación de tres maneras principales. En primer lugar, los azúcares que podrían estar disponibles para la levadura para producir alcohol son consumidos por las bacterias y desviados de la producción de alcohol, reduciendo el rendimiento. En segundo lugar, los productos finales del metabolismo bacteriano, tales como ácido láctico y ácido acético, inhiben el crecimiento de la levadura y la fermentación/respiración de la levadura, que da lugar a la producción menos eficiente de la levadura. Finalmente, las bacterias compiten con la levadura por nutrientes que no sean el azúcar.

25 Después de que el sistema o recipiente de fermentación se haya contaminado con bacterias, las bacterias pueden crecer mucho más rápidamente que la levadura deseada. Las bacterias compiten con la levadura por los azúcares fermentables y retardan la reacción bioquímica deseada dando como resultado un menor rendimiento del producto. Las bacterias también producen subproductos químicos no deseados, que pueden causar el deterioro de lotes enteros de la fermentación. Eliminar estas bacterias permite que la levadura deseada prospere, lo que resulta en una mayor eficiencia de la producción.

30 Tan poco como una disminución de un por ciento en el rendimiento de etanol es altamente significativo para la industria de etanol combustible. En instalaciones más grandes, tal disminución en la eficiencia reducirá los ingresos de 1 millón a 3 millones de dólares por año.

35 Algunos procedimientos de reducción de bacterias durante la propagación, el acondicionamiento y la fermentación aprovechan la mayor tolerancia a la temperatura y al pH de la levadura sobre otros microorganismos. Esto se hace aplicando calor o bajando el pH de la solución de levadura. Sin embargo, estos procesos no son totalmente eficaces para retardar el crecimiento bacteriano. Además, la levadura deseable, aunque sobreviva, se estresa y no es tan vigorosa o sana y no funciona tan bien.

40 La tendencia predominante en la industria del etanol es reducir el pH del puré (materia prima) a menos de 4,5 al comienzo de la fermentación. Bajar el pH del puré 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 o bacterias productoras de ácido acético. También reduce significativamente el rendimiento de etanol haciendo hincapié en la levadura utilizada para la producción de etanol.

45 Otro enfoque implica lavar la levadura con ácido fosfórico. Este procedimiento no mata eficazmente a las bacterias. También puede estresar la levadura utilizada para la producción de etanol, reduciendo así su eficiencia.

Otro procedimiento más es usar calor o productos químicos duros para esterilizar el equipo de proceso entre lotes. Es ineficaz para matar bacterias dentro de la mezcla de levadura durante la producción.

50 Otro enfoque implica la aplicación de dióxido de cloro, un antimicrobiano oxidativo, generalmente a la materia prima o aguas recicladas utilizadas en la fermentación. El dióxido de cloro se genera a menudo *in situ*. Muy a menudo se utilizan altos niveles para superar los efectos negativos de altas cargas orgánicas típicamente observadas con antimicrobianos oxidativos. El dióxido de cloro puede aplicarse en múltiples ubicaciones en el proceso, pero se evitan altos niveles en el tanque de fermentación, ya que altos niveles también pueden inhibir la levadura. Los grandes volúmenes de los sistemas a tratar y las capacidades limitadas de los actuales sistemas generadores de dióxido de cloro a menudo limitan los sistemas de fermentación que pueden ser tratados con este enfoque o requieren el despliegue de múltiples generadores.

55 En otro procedimiento adicional, se añaden antibióticos a la propagación de levadura, lote de acondicionamiento o

de fermentación para neutralizar bacterias. Las industrias de fermentación típicamente aplican 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 los 6 mg/L. Sin embargo, existen problemas con el uso de antibióticos en el acondicionamiento, propagación y fermentación. Los antibióticos son costosos y pueden aumentar considerablemente los costos de producción a gran escala. Además, los antibióticos no son eficaces contra todas las cepas de bacterias, tales como cepas de bacterias resistentes a los antibióticos. El uso excesivo de antibióticos puede conducir a la creación de variantes adicionales de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos.

En la actualidad, casi todas las plantas de biorrefino de EE.UU. utilizan un agente antimicrobiano y muchos de ellos usan antibióticos tales como Virginiamicina. Un producto importante de la biorrefinación del maíz es el secado de los granos de destilería para su uso como alimento para animales, y el mercado de granos de piensos libres de antibióticos está creciendo. El grano de destilería es el residuo del grano del proceso de la fermentación. Los residuos de antibióticos y el establecimiento de cepas resistentes a los antibióticos es un problema mundial. Estas preocupaciones pueden conducir a futuras medidas regulatorias contra el uso de antibióticos. Se espera que la FDA pronto emitirá reglamentos que reduzcan o eliminen el uso de antibióticos en la alimentación animal. Canadá tiene preocupaciones similares con respecto a los antibióticos en granos de destilería y la mayor parte de su producción se exporta. Europa ya ha prohibido el uso de antibióticos en plantas de etanol donde los granos de destilería se producen para la alimentación animal. En Brasil, la operación libre de antibióticos es obligatoria en las plantas que producen extracto de levadura para la exportación. Las ventas de granos de destilería representan hasta un 20 % de los ingresos de una planta de etanol. La concentración de antibióticos en el subproducto puede variar del 1 al 3 % en peso, negando así esta importante fuente de ingresos.

Además, hay otros aspectos a considerar cuando se usan antibióticos. Las mezclas de antibióticos deben ser frecuentemente equilibradas y modificadas para evitar usos únicos que conduzcan a cepas resistentes a los antibióticos. A veces, la cantidad efectiva de antibiótico no puede añadirse 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 sobredosis o el uso excesivo de antibióticos pueden estresar la levadura e impactar o provocar el incumplimiento normativo.

Las industrias que emplean fermentación para bebidas históricamente han aplicado ácido de lúpulo a la propagación y fermentación para controlar microbios no deseados que compiten con la levadura por nutrientes. Con la reciente expansión del etanol combustible, los ácidos de lúpulo se han utilizado en un grado menor para tratar los microbios no deseados Gram positivos. La competencia entre las levaduras y los microbios no deseados produce la pérdida de etanol combustible ya que los microbios no deseados, principalmente *Lactobacillus* y *Acetobacter*, reducen la eficiencia de la fermentación. En las bebidas, los microbios competidores no sólo reducen la eficiencia, sino que pueden alterar la estética y el sabor del producto final.

El ácido orgánico tiene muchas aplicaciones, incluyendo ser utilizado como acidificantes, reguladores, antioxidantes, quelantes, sinergistas, suplementos dietéticos, agentes saborizantes, conservantes y antimicrobianos. El modo de acción del ácido orgánico es que los ácidos no disociados penetren en la pared celular bacteriana a través de difusión pasiva y alteren la fisiología normal de la célula de dos maneras: Los ácidos se disocian y por lo tanto disminuyen el pH interno, que es normalmente cercano al neutro, perjudicando la función de las bacterias. La parte aniónica del ácido que no puede dejar la célula en su forma disociada se acumula dentro, interrumpiendo las funciones metabólicas y aumentando la presión osmótica. Un inconveniente del uso de ácidos orgánicos son los niveles y volúmenes relativamente altos requeridos cuando se usan por sí mismos.

Dado que pequeñas disminuciones en el rendimiento de etanol son altamente significativas para la industria del etanol combustible, los productores de etanol están constantemente buscando maneras de aumentar la eficiencia. El control de los microbios es muy importante para muchas otras industrias y la estrategia predominante es el tratamiento con antimicrobianos. Los antimicrobianos se utilizan para eliminar, reducir o bien controlar el número de microbios en sistemas acuosos. Sin embargo, el uso de la mayoría de los antimicrobianos añadirá costos a las operaciones y a los productos y por lo tanto se buscarán maneras más efectivas de lograr el control microbiano. Además, muchos antimicrobianos tienen deficiencias en su espectro de acción antimicrobiana o limitaciones operacionales en su modo de aplicación, tales como la falta de estabilidad a la temperatura o la susceptibilidad a la inactivación por factores ambientales o químicos. Además, en el caso de instalaciones que utilizan dióxido de cloro u otros en antimicrobianos generados *in situ*, las limitaciones en el volumen de antimicrobianos que pueden producirse pueden ser significativas.

Por lo tanto, pueden utilizarse combinaciones de antimicrobianos y, en particular, se prefieren combinaciones sinérgicas de antimicrobianos. Las combinaciones sinérgicas de antimicrobianos pueden proporcionar un efecto antimicrobiano mayor que la suma de los antimicrobianos individuales y por lo tanto pueden proporcionar un rendimiento de coste mejorado con respecto a las combinaciones que son meramente aditivas en términos de eficacia antimicrobiana. Además, las combinaciones sinérgicas de antimicrobianos en las que uno es un antimicrobiano generado *in situ* pueden reducir el volumen requerido de antimicrobiano y por lo tanto aumentar el tamaño máximo del sistema que se puede tratar.

El documento WO 2011/088334 A1 describe un procedimiento para reducir la concentración indeseable de

microorganismos en una corriente de fluido acuosa que comprende una etapa de introducir en la corriente de fluido acuosa una solución de clorito de sodio estabilizada y un extracto de ácido de lúpulo. El documento WO 01/06877 A1 describe una composición antibacteriana de materia que comprende ácido de lúpulo y uno o más tensoactivos, agentes quelantes, antioxidantes y/o ácidos orgánicos.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que representa las concentraciones bacterianas en los puntos de tiempo después de la adición de antimicrobiano y al final de la fermentación (64 horas).

La Figura 2 es un gráfico que representa el rendimiento medio de etanol para tratamientos expresado en gramos de etanol por gramos de maíz seco.

10 Descripción de la invención

Para los fines de la presente memoria descriptiva, el significado de "microorganismos" y "microbios" incluye, pero no se limita a, bacterias, hongos, algas, protozoos y virus. Los microbios preferidos contra los cuales estas composiciones son eficaces son bacterias, e incluso más preferidas son las bacterias ácido lácticas, las bacterias ácido acéticas y las bacterias que compiten por nutrientes con levadura en procesos de fermentación. Los microbios pueden ser aeróbicos, anaeróbicos o facultativos con respecto al uso de oxígeno. También se entiende que los microbios dentro del agua o sistemas acuosos pueden estar localizados 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", "que controlan" y "eficacia antimicrobiana" deben interpretarse ampliamente para incluir dentro de su significado, sin limitarse a, inhibir el crecimiento de microbios, matar microbios, desinfección, saneamiento, o prevenir el nuevo crecimiento de microbios.

Como se usa en la presente memoria, una ppm se mide como masa por volumen, o 1 ppm es igual a 1 mg (activo) por litro. La dosificación se define como la concentración del componente en el sistema que se está tratando.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido orgánico" se refiere también a su sal.

El propósito de la presente invención es lograr una reducción significativa del número de bacterias contaminantes en procesos industriales, materiales o productos en los que su presencia se considera indeseable.

La invención proporciona una combinación antimicrobiana sinérgica que comprende tres partes y procedimientos de uso de la combinación antimicrobiana sinérgica en el control de microorganismos, según se define adicionalmente en las reivindicaciones. La composición comprende dióxido de cloro junto con ácidos de lúpulo y un ácido orgánico. Los ácidos orgánicos preferidos incluyen ácido cítrico, ácido propiónico y ácido benzoico o sus sales. Los ácidos mencionados se refieren a sí mismos o a sus sales.

Se ha descubierto que estas combinaciones son sinérgicas en agua o sistemas acuosos cuando se usan para el control microbiano y son también eficaces en matrices tales como las encontradas en el biorrefinado cuando los sólidos de maíz pueden estar presentes en niveles altos. De este modo, los materiales antimicrobianos combinados dan como resultado una eficacia antimicrobiana mejorada más allá de lo que se esperaría basándose en la suma de sus eficacias antimicrobianas individuales. Esta sinergia inesperadamente observada permite cantidades reducidas de los antimicrobianos que se utilizarán para conseguir un control microbiano aceptable en procesos industriales en los que está presente agua.

La presente invención proporciona combinaciones antimicrobianas sinérgicas que comprenden dióxido de cloro, ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico y procedimientos de utilización de las combinaciones de dióxido de cloro, ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico. Los ácidos orgánicos preferidos incluyen ácido cítrico, ácido propiónico y ácido benzoico o sus sales. El ácido orgánico más preferido es ácido cítrico. Los ácidos orgánicos pueden usarse en su forma ácida o en su forma de sal. Estas combinaciones son útiles para controlar microorganismos en sistemas y productos acuosos. La presente invención da como resultado una reducción significativa del número de bacterias contaminantes en procesos industriales, materiales o productos donde su presencia se considera indeseable.

Se ha descubierto que el uso de la combinación de dióxido de cloro, al menos un extracto de ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico proporciona un control microbiano sinérgico en sistemas acuosos. De este modo, la combinación de componentes da como resultado una eficacia antimicrobiana mejorada más allá de lo que se esperaría basándose en la suma de sus eficacias antimicrobianas individuales. Esta sinergia inesperadamente observada permite cantidades reducidas de los antimicrobianos que se utilizarán para conseguir un control microbiano aceptable en procesos industriales, tales como biorrefinación, o materiales cuando se desee. En los casos en que se produce un antimicrobiano *in situ* tal como dióxido de cloro, la reducción de la cantidad de antimicrobiano requerida permite que las combinaciones se utilicen en sistemas cuyos requerimientos de volumen serían demasiado grandes para ser tratados con dióxido de cloro solo.

Los componentes de la composición pueden formularse como una mezcla única y añadirse al sistema a tratar.

También se pueden mezclar después de la generación *in situ* del dióxido de cloro y añadirse al sistema, o se pueden añadir secuencialmente o en diferentes lugares en el proceso. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente el procedimiento apropiado de adición para cada sistema a tratar.

5 Una realización no limitativa del procedimiento actual para reducir la concentración indeseable de microorganismos en un sistema acuoso comprende:

- (a) introducir dióxido de cloro en el sistema a tratar,
- (b) introducir ácidos de lúpulo en el sistema a tratar, y
- (c) introducir al menos un ácido orgánico en el sistema a tratar

10 en la que el dióxido de cloro está en una concentración de al menos 1 ppm en el sistema acuoso a tratar y la concentración de ácido de lúpulo es de al menos 0,5 ppm en el sistema acuoso a tratar. Los ácidos orgánicos preferibles incluyen ácido cítrico, ácido propiónico y ácido benzoico o sus sales, lo más preferido es ácido cítrico o su sal.

La composición acuosa de la presente invención comprende específicamente:

- 15 a) dióxido de cloro,
- b) ácidos de lúpulo y
- c) al menos un ácido orgánico o sus sales,

20 en la que la concentración de dióxido de cloro es de al menos 1 ppm, preferiblemente de al menos 5 ppm, más preferiblemente de al menos 15 ppm, en donde la concentración de ácido de lúpulo es de al menos 0,5 ppm, preferiblemente al menos 1 ppm, y en la que la concentración de al menos un ácido orgánico es al menos 50 ppm, preferiblemente al menos 75 ppm, más preferiblemente al menos 100 ppm.

El dióxido de cloro utilizado puede ser generado *in situ* a través de una transformación química de clorito o clorato u otro sustrato, por generación electroquímica, o puede proporcionarse por formulaciones estabilizadas de dióxido de cloro.

25 Ejemplos no limitativos de ácidos de lúpulo que se pueden usar en la invención incluyen compuestos de ácido beta, ácidos alfa, ácidos alfa isomerizados, ácidos alfa isomerizados rho, ácidos alfa tetraisomerizados, ácidos alfa hexaisomerizados y de hoja de lúpulo.

30 El ácido cítrico es el ácido preferido útil en la invención, pero se puede esperar razonablemente que otros ácidos orgánicos con un mecanismo antimicrobiano similar serían útiles en la presente invención. También se incluyen las sales de estos ácidos. Ejemplos no limitantes adecuados de ácidos orgánicos útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a ácido cítrico, ácido benzoico, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido acético, ácido bencenosulfónico, ácido oxálico, ácido málico, ácido salicílico, ácido láctico, ácido glucónico, ácido hidroxiaacético y sus sales. Para los fines de esta invención, el ácido orgánico no es un ácido de lúpulo. Los ácidos orgánicos preferidos incluyen ácido cítrico, ácido propiónico y ácido benzoico o sus sales.

35 El dióxido de cloro puede utilizarse en cantidades de 1 ppm a 100 ppm en el sistema a tratar. El dióxido de cloro podría utilizarse en una cantidad de 1 ppm a 75 ppm en el sistema acuoso a tratar o de 1 ppm a 50 ppm, o de 1 ppm a 15 ppm, o de 3 ppm a 50 ppm, o de 3 ppm a 15 ppm, o de 5 ppm a 20 ppm, o de 5 ppm a 15 ppm. Por lo general, se utilizan al menos 1 ppm o al menos 5 ppm o al menos 7 ppm del dióxido de cloro. La relación del dióxido de cloro con respecto a al menos un ácido orgánico puede ser de 1:1 a 1:15.000, o de 1:1 a 1:10.000, o relaciones de 1:1 a 1:2.000, o relaciones de 1:1 a 1:1.000, o relaciones de 1:4 a 1:10.000, o relaciones de 1:4 a 1:2.000, o relaciones de 1:4 a 1:1.000, o de 1:20 a 1:100. Las relaciones se basan en ppm de material en el sistema acuoso que se está tratando. Se utilizan dosificaciones de ácidos de lúpulo de al menos 0,5 ppm o al menos 1 ppm o al menos 3 ppm o al menos 5 ppm. Las dosificaciones de ácido de lúpulo pueden ser de al menos 0,5 ppm e iguales o inferiores a 15 ppm o entre 2 ppm e iguales o inferiores a 15 ppm o puede usarse una dosificación de 3 ppm y 10 ppm o entre 5 ppm e iguales o inferiores a 15 ppm o entre 5 ppm y 10 ppm en la invención. La relación de dióxido de cloro con respecto a ácidos de lúpulo puede ser de 100:1 a 1:10, o de 100:1 a 1:5, o de 75:1 a 1:5, o de 75:1 a 1:2, o de 5:1 a 1:5, o 2:1 a 1:2.

Una realización de la invención comprende ácido cítrico o su sal como el ácido orgánico en combinación con dióxido de cloro y ácidos de lúpulo. Preferiblemente hay al menos 1 ppm de dióxido de cloro y al menos 1 ppm de ácido de lúpulo y al menos 50 ppm o 75 ppm o 100 ppm de ácido cítrico en el sistema que se está tratando.

50 Una realización de la invención comprende ácido propiónico o su sal como el ácido orgánico en combinación con dióxido de cloro y ácidos de lúpulo. Preferiblemente hay al menos 1 ppm de dióxido de cloro y al menos 1 ppm de ácido de lúpulo y al menos 50 ppm o 75 ppm o 100 ppm de ácido propiónico en el sistema que se está tratando.

Una realización de la invención comprende ácido benzoico o sus sales como el ácido orgánico en combinación con dióxido de cloro y ácidos de lúpulo. Preferiblemente hay al menos 1 ppm de dióxido de cloro y al menos 1 ppm de ácido de lúpulo y al menos 50 ppm o 75 ppm o 100 ppm de ácido benzoico en el sistema que se está tratando.

5 Ejemplos de agua y sistemas acuosos en los que las composiciones son útiles son biorrefinación, agua de enfriamiento, agua de caldera, agua de molino de pulpa y papel, agua de inyección de campo petrolero y de gas y agua producida, oleoductos y gasoductos y sistemas de almacenamiento, agua de lastre, aguas residuales, pasteurizadores, otras aguas industriales de proceso, fluidos para el trabajo de metales, látex, polímeros, pinturas, revestimientos, adhesivos, tintas, productos para el cuidado personal y domésticos, sistemas de ósmosis inversa, sistemas de deposición electroquímica, fluidos utilizados en extracción de minerales, lechadas minerales, el
10 procesamiento agrícola, las aguas de biorrefinación y los sistemas que las utilizan. Además, las composiciones pueden usarse en otras áreas donde se requiere contaminación microbiana del agua y de los sistemas acuosos. Tales aplicaciones incluyen el lavado de frutas y hortalizas durante el procesamiento y el tratamiento de aguas utilizadas en el procesamiento de alimentos tales como su uso en pasteurizadores de túnel.

15 Los componentes de la composición pueden combinarse y después añadirse al sistema a tratar. También se pueden añadir secuencialmente, desde un único punto de dosificación, o desde puntos de dosificación separados. Los componentes de la composición pueden añadirse al agua o al sistema acuoso por separado o mezclarse antes de la adición. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente el procedimiento apropiado de adición. La composición puede añadirse al agua o al sistema acuoso con otros aditivos tales como, pero no necesariamente restringidos a, tensoactivos, compuestos de control de incrustaciones y de la corrosión, polímeros iónicos o no
20 iónicos, agentes de control del pH y otros aditivos usados para alterar o modificar la química del agua o del sistema acuoso. Además, las composiciones se pueden usar en agua y sistemas acuosos que contienen agentes antimicrobianos distintos de los enumerados en la presente memoria como sinérgicos

25 El pH del sistema acuoso a tratar es generalmente de 3 a 11, o de 3 a 7, o de 4 a 9, o de 4 a 8, o de 4 a 6,5, o de 4,5 a 6. En general, los ácidos orgánicos funcionan mejor en sistemas en los que el pH del sistema es menor que al menos uno de los valores de pKa del ácido o de su sal.

En algunas realizaciones no limitantes, la solución acuosa sinérgica está compuesta de dióxido de cloro y extractos de ácido de lúpulo y ácido cítrico o su sal donde el ácido de lúpulo con respecto al ácido orgánico está en relaciones de 1:10 a 1:6.500 o 1:25 a 1:6.400, o 1:25 a 1:1.600, o de 1:25 a 1:500 o de 1:25 a 1:100

30 En algunas realizaciones no limitantes, la solución acuosa sinérgica está compuesta de dióxido de cloro y extractos de ácido de lúpulo y ácido propiónico o su sal donde el ácido de lúpulo a ácido orgánico está en relaciones de 1:12,5 a 1:800, preferiblemente 1:12,5 a 1:400, preferiblemente de 1:12,5 a 1:50 o 1:10 a 1:6.500, o 1:25 a 1: 6.400, o 1:25 a 1:1.600, o de 1:25 a 1:500.

35 En una realización la solución acuosa sinérgica está compuesta de dióxido de cloro y extractos de ácido de lúpulo y el ácido orgánico es ácido cítrico o su sal. El ácido cítrico podría usarse en una cantidad de 1.000 ppm hasta 50 ppm o desde 800 hasta 75 ppm o desde 600 hasta 100 ppm en el sistema acuoso a tratar. Generalmente se usan al menos 50 ppm o al menos 75 ppm o al menos 100 ppm de ácido cítrico en el sistema acuoso a tratar. La cantidad de dióxido de cloro utilizada en el sistema acuoso a tratar es de 1 ppm a 50 ppm, o de 1 ppm a 15 ppm o de 1 ppm a 10 ppm o de 5 ppm a 10 ppm y la composición más preferida tiene 5 a 10 ppm de dióxido de cloro o de 3 a 9 ppm de dióxido de cloro.

40 La invención proporciona combinaciones antimicrobianas sinérgicas y procedimientos para usarlas en el control de microorganismos, por ejemplo, en fermentaciones industriales que producen etanol u otros productos químicos.

45 Cuando se usa en un sistema de fermentación, la combinación de dióxido de cloro y extracto de ácido de lúpulo y ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, se pueden añadir en varios lugares en el sistema de fermentación, incluyendo el tanque o los tanques de sedimentación, cocinas, enfriadores de mezcla, propagadores y tanques de fermentación. Un experto en la técnica también puede determinar otros puntos de adición.

50 En sistemas de fermentación que utilizan el presente procedimiento, se pueden reducir las concentraciones de bacterias y otros microorganismos indeseables mientras se fomenta la propagación y/o el acondicionamiento de microorganismos deseables. Se ha descubierto que el dióxido de cloro en combinación con al menos un extracto de ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, es eficaz para reducir la concentración de bacterias indeseables y otros microorganismos indeseables, al mismo tiempo que estimula la propagación y/o acondicionamiento de microorganismos deseables. La combinación de estos productos proporciona un tratamiento antimicrobiano sinérgico sin el uso de antibióticos.

55 Una realización no limitativa del procedimiento actual para reducir la concentración indeseable de microorganismos, promover la propagación deseable de microorganismos y aumentar la eficiencia deseable de microorganismos en un sistema acuoso comprende:

(a) introducir un carbohidrato fermentable en un sistema acuoso,

(b) introducir al sistema acuoso al menos una levadura o microorganismo deseable, y

(c) introducir dióxido de cloro y al menos un extracto de ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico en el sistema acuoso.

5 El dióxido de cloro y el extracto de ácido de lúpulo y el ácido orgánico pueden introducirse en el sistema acuoso como una mezcla o individualmente, o cualquier dos de ellos como una mezcla y el tercero individualmente. Preferiblemente, el ácido orgánico es ácido cítrico.

Otra realización no limitativa del procedimiento actual para reducir la concentración indeseable de microorganismos, promover la propagación de la levadura y aumentar la eficacia de la levadura en un sistema acuoso comprende:

(a) introducir una cantidad de carbohidrato fermentable en un sistema acuoso,

10 (b) introducir una cantidad de levadura en el sistema acuoso, y

(c) introducir dióxido de cloro y al menos un extracto de ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico en el sistema acuoso.

15 El dióxido de cloro y el extracto de ácido de lúpulo y el ácido orgánico pueden introducirse en el sistema acuoso como una mezcla o individualmente, o cualquier dos de ellos como una mezcla y el tercero individualmente. Preferiblemente, el ácido orgánico es ácido cítrico.

20 Las etapas del procedimiento pueden realizarse secuencialmente o en un orden diferente. Los componentes del sistema antimicrobiano pueden ponerse en contacto con la levadura o con el carbohidrato de fermentación; o la levadura y el carbohidrato fermentable se pueden combinar y luego los componentes del sistema antimicrobiano se introducen en la combinación de levadura y carbohidratos. Los componentes del sistema antimicrobiano se pueden combinar juntos y luego se añaden al sistema acuoso o pueden añadirse por separado al sistema acuoso. El sistema acuoso puede estar en un proceso continuo o puede ser un tanque en el caso de un proceso discontinuo.

25 En el procedimiento anterior, los microorganismos "indeseables" que se pretende reducir son aquellos que compiten por los nutrientes con los microorganismos deseables que promueven los procesos de fermentación deseados. Los microorganismos no deseados o indeseables en la fermentación incluyen las bacterias productoras de ácido láctico (LAB) y las bacterias productoras de ácido acético, de las cuales *Lactobacillus* y *Acetobacter* son prominentes representantes. Cualquier microbio que compite por el sustrato fermentable, negándolo al organismo de fermentación deseado y reduciendo así los rendimientos puede considerarse indeseable. A este respecto, el dióxido de cloro, el ácido orgánico y el extracto ácido de lúpulo empleados en el presente procedimiento preferiblemente no afectan en forma nociva al crecimiento y la viabilidad de los microorganismos promotores de fermentación deseables, sino que eliminan o suprimen el crecimiento de microorganismos indeseables que interfieren con la fermentación. Además, la eliminación o supresión de microorganismos indeseables tiene un efecto favorable sobre el crecimiento y viabilidad de microorganismos deseables.

35 El dióxido de cloro junto con al menos un ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico y ácidos de lúpulo, también se pueden usar en el tratamiento del agua utilizada para lavar frutas y verduras. Aunque el dióxido de cloro se utiliza en algunos casos por sí mismo para lavar frutas y verduras, la presencia de altas cargas de materia orgánica a menudo requiere altas concentraciones de dióxido de cloro para ser eficaz. Generalmente, las frutas y hortalizas se lavan rociando o sumergiendo las frutas o verduras en una solución acuosa de los antimicrobianos, donde las concentraciones de los antimicrobianos son las descritas anteriormente. La combinación sinérgica de dióxido de cloro, al menos un ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, y ácidos de lúpulo significa que se puede lograr un mayor efecto antimicrobiano con niveles antimicrobianos reducidos. Otra aplicación de dióxido de cloro, al menos un ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, y ácidos de lúpulo, estaría en la producción de agua utilizada para preparar alimentos o bebidas procesados o en aplicaciones de higiene alimentaria como el mantenimiento de agua de lavado en pasteurizadores de túnel. Generalmente, el dióxido de cloro junto con al menos un ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, y ácidos de lúpulo, se puede utilizar para cualquier aplicación en la que la descomposición de los agentes antimicrobianos produzca sólo sal, agua y un aditivo alimentario es un resultado deseable.

45 La producción de etanol combustible por fermentación de levadura se usa como un ejemplo de donde se puede usar la presente invención. Otros productos de fermentación que podrían emplear la combinación del dióxido de cloro junto con el ácido orgánico, preferiblemente el ácido cítrico y el ácido de lúpulo, podrían incluir bebidas destiladas, cerveza, vino, productos farmacéuticos, productos intermedios farmacéuticos, productos para hornear, nutracéuticos (productos alimenticios que proporcionan beneficios para la salud, tales como alimentos fortificados y suplementos dietéticos), productos intermedios nutracéuticos, materias primas químicas industriales y enzimas. El procedimiento actual también podría utilizarse para tratar la levadura utilizada en la industria de la panadería.

55 Las levaduras *Saccharomyces* son un tipo de levadura útil, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. En la invención también se pueden utilizar levaduras no *Saccharomyces*. Las levaduras no son los únicos microorganismos beneficiosos utilizados en la fermentación. Otros microorganismos de fermentación deseables también podrían ser

utilizados y beneficiados por la invención tales como los hongos y bacterias típicamente usados en la producción de etanol celulósico. Algunos ejemplos no limitantes de microorganismos de fermentación deseables incluyen, pero no se limitan a, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, y *Clostridium ljungdahlii*.

5 Los componentes del sistema antimicrobiano (dióxido de cloro junto con el extracto ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, se pueden añadir en varios puntos en los procesos de propagación, acondicionamiento y/o fermentación. Los componentes del sistema antimicrobiano se pueden agregar a los recipientes de cocción, tanques de fermentación, tanques de propagación, tanques de acondicionamiento, tanques de arranque o durante la licuefacción. Los componentes del sistema antimicrobiano también se pueden agregar directamente a la mezcla de maíz. Los componentes del sistema antimicrobiano también pueden agregarse al sistema intercambiador de calor intermedio o intercambiadores de calor. Los componentes del sistema antimicrobiano también se pueden añadir a la tubería entre estas unidades o intercambiadores de calor.

10 Los componentes del sistema antimicrobiano se pueden añadir directamente a la mezcla de fermentación. Esto puede hacerse añadiendo los componentes del sistema antimicrobiano junto con la levadura u otro microorganismo deseable y carbohidrato fermentable, por ejemplo, durante la etapa de SSF (sacarificación y fermentación simultáneas). La dosificación es la concentración del componente en el sistema acuoso que se está tratando. Las dosificaciones de dióxido de cloro comprendidas entre 1 y 100 ppm o 1 a 75 ppm o 1 a 50 ppm y las dosificaciones de extracto de ácido de lúpulo comprendidas entre 0,5 y 20 ppm o entre 0,5 y 15 ppm o entre 1 y 10 ppm y el ácido orgánico preferiblemente ácido cítrico, puede dosificarse directamente entre 75 y 1.000 en la mezcla de fermentación.

15 El dióxido de cloro junto con el extracto de ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, también se pueden añadir a la mezcla antes del proceso de fermentación. Las dosificaciones de dióxido de cloro comprendidas entre 1 y 100 ppm o 1 a 75 ppm o 1 a 50 ppm y las dosificaciones de extracto de ácido de lúpulo comprendidas entre 0,5 y 20 ppm o entre 0,5 y 15 ppm o de 1 a 10 ppm y la dosificación de ácido orgánico de entre 75 y 1.000 pueden añadirse directamente a la mezcla de fermentación.

20 El dióxido de cloro junto con el extracto de ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico pueden añadirse también durante la propagación y/o acondicionamiento. Por ejemplo, el dióxido de cloro junto con el extracto de ácido de lúpulo y el ácido orgánico pueden añadirse a la suspensión de levadura antes de que SSF reemplace una etapa de lavado con ácido.

25 Los sistemas antimicrobianos de la presente invención, a saber, dióxido de cloro junto con ácido de lúpulo y al menos un ácido orgánico, pueden utilizarse para conseguir mejores resultados en la producción de etanol celulósico. El etanol celulósico es un tipo de etanol que se produce a partir de celulosa, a diferencia de los azúcares y almidones utilizados en la producción de etanol a base de carbohidratos. La celulosa está presente en fuentes de biomasa no tradicionales, tales como pastizales, hojarasca y silvicultura. Este tipo de producción de etanol es particularmente atractivo debido a la gran disponibilidad de fuentes de celulosa. El etanol celulósico, por la misma naturaleza de la materia prima, introduce niveles más altos de contaminantes y microorganismos competidores en el proceso de fermentación. Los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden usar en la producción de etanol celulósico para controlar microorganismos indeseables. Las dosificaciones de dióxido de cloro comprendidas entre 1 y 100 ppm o 1 a 75 ppm o 1 a 50 ppm y las dosificaciones de extracto de ácido de lúpulo comprendidas entre 0,5 y 20 ppm o entre 0,5 y 15 ppm o de 1 a 10 ppm y la dosificación de ácido orgánico de entre 75 y 1.000 pueden ser utilizados en la producción de etanol celulósico.

30 Existen dos procesos primarios de producción de alcohol a partir de celulosa. Uno de ellos es un proceso de hidrólisis que utiliza hongos, como por ejemplo *Trichoderma reesei* y/o *Trichoderma viride*. El otro es un proceso de gasificación que utiliza bacterias tales como *Clostridium ljungdahlii*. Los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden utilizar en cualquiera de los procesos.

35 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 hace química o enzimáticamente.

40 En el procedimiento de hidrólisis química, la celulosa puede tratarse con ácido diluido a alta temperatura y presión o ácido concentrado a una temperatura y presión atmosférica más bajas. En el proceso de hidrólisis química, la celulosa reacciona con el ácido y el agua para formar moléculas individuales de azúcar. Estas moléculas de azúcar se neutralizan y la fermentación de levadura se utiliza para producir etanol. Los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden usar durante la porción de fermentación de levadura de este procedimiento.

45 La hidrólisis enzimática puede llevarse a cabo usando dos procedimientos. El primero se conoce como conversión microbiana directa (DMC). El procedimiento DMC utiliza un único microorganismo para convertir la biomasa celulósica en etanol. El etanol y las enzimas requeridas son producidas por el mismo microorganismo. Los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden usar durante las etapas de propagación/acondicionamiento o fermentación con este organismo especializado.

50 El segundo procedimiento se conoce como el procedimiento de hidrólisis enzimática. En este procedimiento las cadenas de celulosa se rompen utilizando enzimas celulasas. Estas enzimas están típicamente presentes en los

estómagos de rumiantes, tales como vacas y ovejas, para descomponer la celulosa que comen. El procedimiento enzimático se lleva a cabo típicamente en cuatro o cinco etapas. La celulosa es pretratada para hacer que la materia prima, tal como madera o paja, sea más susceptible a la hidrólisis. A continuación, las enzimas celulasa se utilizan para romper las moléculas de celulosa en azúcares fermentables. Después de la hidrólisis, los azúcares se separan de los materiales residuales y se añaden a la levadura. Los azúcares hidrolizados se fermentan hasta etanol usando levadura. Finalmente, el etanol se recupera por destilación. Alternativamente, la hidrólisis y la fermentación pueden llevarse a cabo usando ya sea bacterias u hongos especiales que llevan a cabo ambos procesos. Cuando ambas etapas se llevan a cabo conjuntamente, el proceso se llama hidrólisis secuencial y fermentación (SHF).

Los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden introducir para la eficacia microbiológica en diversos puntos en el procedimiento enzimático de hidrólisis. Los sistemas antimicrobianos de la presente invención pueden utilizarse en la producción, fabricación y fermentación de enzimas celulasas producidas por *Tiododerma* y otras cepas de hongos. En los sistemas antimicrobianos de la presente invención se puede añadir ácido en la fase de sacarificación y fermentación simultánea celulósica (SSF). Los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden introducir en la fase de hidrólisis y fermentación secuencial (SHF). También podrían introducirse en un punto antes, durante o después de la fermentación por hongos celulolíticos que crean las enzimas celulasas. Alternativamente, los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden añadir durante la fase de fermentación de la levadura, como se ha discutido anteriormente.

El proceso de gasificación no rompe la cadena de celulosa en moléculas de azúcar. En primer lugar, el carbono de la celulosa se convierte en monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno en una reacción de combustión parcial. A continuación, se alimentan el monóxido de carbono, el dióxido de carbono y el hidrógeno en un fermentador especial que utiliza un microorganismo como el *Crostridium ljungdahlii* que es capaz de consumir el monóxido de carbono, el dióxido de carbono y el hidrógeno para producir etanol y agua. Finalmente, el etanol se separa del agua en una etapa de destilación. Los sistemas antimicrobianos de la presente invención se pueden usar como un agente antimicrobiano en la etapa de fermentación que implica microorganismos tales como *Crostridium ljungdahlii* que son capaces de consumir monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno para producir etanol y agua.

En una realización no limitante, se combinan dióxido de cloro, ácidos de lúpulo y al menos un ácido orgánico en un tanque y se diluyen hasta una concentración predeterminada en una relación predeterminada. En el tanque, se disuelven en agua dióxido de cloro, ácido de lúpulo, preferiblemente como extracto alfa isomerizado, y ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico, para formar una mezcla de dióxido de cloro/ácidos de lúpulo/ácido orgánico. La concentración de la solución de dióxido de cloro, la solución de extracto de ácido de lúpulo y la solución de ácido orgánico en el tanque de proceso discontinuo pueden variar en un amplio intervalo. La solución mezclada de dióxido de cloro/extracto de ácido de lúpulo/ácido orgánico se agota a continuación desde el tanque de proceso discontinuo a través de una salida a una velocidad de dosificación especificada para crear una solución de la concentración deseada.

Ejemplos

Los índices de sinergia indicados en los siguientes ejemplos utilizan la siguiente fórmula, que es una modificación de la fórmula indicada en F.C. Kull, P.C. Eisman, H.D. Sylwestrowka, y R.L. Mayer, Applied Microbiology 9: 538-541, 1961.

$$\text{Índice de sinergia} = Qa/QA + Qb/QB + Qc/QC$$

en la que Qa es la concentración de Antimicrobiano A requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se usa en combinación con Antimicrobianos B y C;

QA es la concentración de Antimicrobiano A requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se usa solo;

Qb es la concentración de Antimicrobiano B requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se usa en combinación con Antimicrobianos A y C;

QB es la concentración de Antimicrobiano B requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se usa solo;

Qc es la concentración de Antimicrobiano C requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se usa en combinación con los Antimicrobianos A y B;

QC es la concentración de Antimicrobiano C requerida para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se usa solo.

Un índice de sinergia (SI) de 1 indica que las interacciones entre los antimicrobianos son meramente aditivas, un SI superior a uno indica que los antimicrobianos son antagónicos entre sí y un SI inferior a 1 indica que los antimicrobianos interactúan de forma sinérgica.

Aunque hay varios procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para medir los niveles de actividad antimicrobiana, en los siguientes ejemplos el punto final utilizado se conoce como la Concentración Inhibitoria Mínima o MIC. Esta es la concentración más baja de una sustancia o sustancias que pueden lograr la inhibición completa del crecimiento.

- 5 Con el fin de determinar la Concentración Inhibitoria Mínima, se construye una serie de dos diluciones del antimicrobiano con las diluciones que se hacen en medio de crecimiento. Las diluciones se hacen en una microplaca de 96 pozos de manera que cada pozo tiene un volumen final de 280 µl de medio y antimicrobiano. El primer pozo tiene, por ejemplo, una concentración de 1.000 ppm de antimicrobiano, el segundo de 500 ppm, el tercero de 250 ppm, y así sucesivamente, con el pozo 12 y final en la fila que no tiene ningún antimicrobiano y sirve como un control de crecimiento positivo. Después de que se construye la serie de dilución, los pozos reciben un inóculo del microbio suspendido en medio de crecimiento de tal manera que la concentración final de microbios en el pozo es de $\sim 5 \times 10^5$ cfu/mL. En estos ejemplos el microbio de ensayo utilizado es *Lactobacillus plantarum*. Los cultivos se incuban a una temperatura apropiada durante 18-24 horas, y los pozos se puntuaron como positivos o negativos para el crecimiento con base en un examen visual para pozos turbios. La concentración más baja de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento (por ejemplo, un pozo claro) se denomina Concentración Inhibitoria Mínima.

- Con el fin de determinar si la interacción entre tres antimicrobianos es aditiva, antagonista o sinérgica frente a un microbio diana, se emplea una modificación del procedimiento MIC denominado procedimiento de "tablero de damas" utilizando microplacas de 96 pozos. Una placa de sinergia "tablero de damas" para dos antimicrobianos utiliza una cuadrícula bidimensional de 8 x 8 en una sola microplaca. El procedimiento de sinergia ternaria utiliza una cuadrícula tridimensional de 8 x 8 x 8 usando una pila de 8 microplacas. Para construir una placa de tablero de damas, se despliega el antimicrobiano A, a través del medio de crecimiento. El antimicrobiano se disuelve en el medio de crecimiento y se dispensa sobre las ocho placas; por lo tanto, cada placa tiene una concentración única de Antimicrobiano A. Hay un total de 8 placas que contienen cada una, una concentración diferente de antimicrobiano A. El segundo antimicrobiano (Antimicrobiano B) se despliega usando el procedimiento de dilución serial doble utilizado para construir una placa MIC, donde cada una de las ocho filas (A-H) es una serie de dilución idéntica de concentraciones decrecientes que termina después de la octava columna. El tercer antimicrobiano (Antimicrobiano C) se despliega añadiendo volúmenes idénticos de una sola concentración antimicrobiana a cada columna (1-8), con cada columna obteniendo una concentración diferente. Por lo tanto, la columna 1 recibe un volumen de medio más Antimicrobiano C a una concentración de 1.000 µM, la columna 2 recibe un volumen de medio más antimicrobiano a una concentración de 500 µM, etc. El resultado es que cada pozo de la cuadrícula de 8 x 8 pozos tiene una combinación diferente de concentraciones antimicrobianas, dando 64 combinaciones diferentes de Antimicrobiano B y C en total, manteniendo el Antimicrobiano A constante. Cada una de las ocho placas tiene cuadrículas idénticas de Antimicrobianos B y C, pero con diferentes concentraciones de Antimicrobiano A, produciendo un total de 512 combinaciones diferentes de Antimicrobianos A más B más C. Esto es efectivamente un retículo de 8 x 8 x 8. Las columnas 9ª y 10ª de cada placa no reciben antimicrobianos en absoluto, solo medios, y sirven como controles de crecimiento positivo y negativo, respectivamente. Después de construir la microplaca de tablero de damas, se inocula con *Lactobacillus plantarum*, se incuba a 37°C y se puntúa como se describe para el procedimiento MIC.

Ejemplo 1: Sinergia de dióxido de cloro con ácidos de lúpulo y ácido cítrico

- Se determinaron concentraciones inhibitorias mínimas para dióxido de cloro, ácidos de lúpulo y ácido cítrico a pH 5 usando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como el microbio de ensayo. Se construyeron placas sinérgicas ternarias como se describió, se inocularon los pozos hasta una concentración final de $\sim 5 \times 10^5$ cfu/mL, se incubaron durante 18-24 horas, y luego se puntuaron visualmente para crecimiento/no crecimiento. Los índices de sinergia se calcularon de acuerdo con la fórmula modificada descrita por Kull et al. Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar dióxido de cloro, ácidos de lúpulo y ácido cítrico es mayor que el efecto de cualquiera de los antimicrobianos solos. La cantidad de dióxido de cloro necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se reduce de 54 ppm a 2,75-40 ppm. La concentración de ácidos de lúpulo cae de 5 ppm a un intervalo de 0,625-2,5 ppm y el ácido cítrico pasa de 6.250 ppm a 78-1.250 ppm.

Tabla 1							
Usado solo			Usado en Combinación				
MIC de ClO ₂ (QA) ppm	MIC de ácido de lúpulo (QB) ppm	MIC de ácido cítrico (QC) ppm	MIC de ClO ₂ (Qa) ppm	MIC de ácido de lúpulo (Qb) ppm	MIC de ácido cítrico (Qc) ppm	Relación de ClO ₂ : Ácido de lúpulo: Ácido cítrico Relación	SI
54	5	6250	35	1,25	78	28:1:62,4	0,91
54	5	6250	35	0,625	78	56:1:124,8	0,79
54	5	6250	18,8	2,5	156	7,52:1:62,4	0,87

54	5	6250	37,5	1,25	156	30:1:124,8	0,97
54	5	6250	37,5	0,625	156	60:1:249,6	0,84
54	5	6250	20	2,5	313	8:1:125,2	0,92
54	5	6250	40	0,625	313	64:1:500,8	0,92
54	5	6250	21,25	2,5	625	8,5:1:250	0,99
54	5	6250	2,75	2,5	1250	1,1:1:500	0,75

Ejemplo 2: Datos de laboratorio de fermentación

Las evaluaciones se realizaron en el Centro Nacional de Investigación de Maíz para Etanol, utilizando dióxido de cloro, extractos de ácido de lúpulo y ácido cítrico. Las muestras ensayadas y sus concentraciones se pueden encontrar en la Figura 1 y la Tabla 2. Los ensayos se llevaron a cabo para evaluar los efectos de los antimicrobianos ternarios en la producción de etanol en la mezcla de maíz producida en condiciones similares a las utilizadas en la industria del etanol combustible. Se investigaron dos efectos específicos: (1) la capacidad de los antimicrobianos para afectar el rendimiento del etanol y la conversión del azúcar en fermentaciones contaminadas por bacterias ácido lácticas, y (2) la capacidad de los antimicrobianos para controlar las infecciones bacterianas en comparación con las fermentaciones de control libres de bacterias. Para cada tratamiento y control (inoculado y sin inocular) se prepararon tres suspensiones de 160 gramos de harina de maíz, agua y enzima (30 % p/p de sólidos secos). Las suspensiones se incubaron durante 90 minutos a 83°C, se enfriaron a 40°C, y luego se inocularon con *L. plantarum*. A continuación, las suspensiones se dosificaron con antimicrobianos. La instalación dosificó dióxido de cloro, extractos de ácido de lúpulo y ácido cítrico en matraces Erlenmeyer de 250 mL y las muestras se recogieron a los 15, 30 y 60 minutos después de la adición de antimicrobianos. Después de que se recogieron las tres muestras en instantes de tiempo determinados, se ajustó el pH de la mezcla a <5,2 mediante la adición de 300 µl de ácido sulfúrico 5 N. Todas las enzimas, nutrientes y otras modificaciones añadidas a los matraces de fermentación se prepararon de nuevo antes de su uso. Se añadió urea como una solución estéril de 0,2 g/mL hasta una concentración final de 500 ppm (p/p) con base en el contenido de nitrógeno de la urea (p/p, con base en la masa total de la mezcla). La enzima glucoamilasa (Spirizyme Excel, Novozymes) se preparó como una solución de 0,25 g/mL y se añadió a una dosis de 0,066 % (p/p, con base en el peso húmedo del maíz). Se añadió agua estéril para igualar el contenido de sólidos totales de cada tratamiento. Todos los matraces de fermentación se inocularon con una suspensión de levadura de 0,2 g/mL (*Saccharomyces cerevisiae*). Esta suspensión se incubó y se mezcló durante 30 minutos a 40°C antes de la inoculación en los matraces de fermentación. Cada matraz de fermentación se inoculó con 170 µl de la suspensión de levadura para alcanzar una concentración inicial de 1×10^7 células de levadura/mL. La masa de cada matraz se registró después de que se hicieron todas las adiciones, después se insertaron trampas de fermentación desinfectadas en cada matraz y se pesaron de nuevo. Los matraces se incubaron a 32°C con agitación a 170 rpm en una incubadora/agitadora durante un total de 64 horas. El progreso de la fermentación se controló pesando los matraces de fermentación periódicamente durante la incubación de 3 días (a 0, 17,5, 22,5, 42,5, 48 y 64 horas después de la inoculación con levadura). Las concentraciones de sustratos (glucosa, DP2, DP3 y DP4+, donde "DPx" representa oligómeros de glucosa con "x" subunidades) y productos (etanol, glicerol, ácido láctico y ácido acético) se midieron por HPLC al final de la fermentación. Las muestras se prepararon para HPLC por centrifugación para separar sólidos grandes, seguido de filtración a través de filtros de jeringa de 0,45 µm y acidificación a pH de aproximadamente 2 mediante adición de ácido sulfúrico hasta una concentración final de 0,01 N. El pH final, la concentración de sólidos secos totales y de sólidos secos disueltos, y la densidad del filtrado de cerveza se midió después de la incubación durante 64 horas. Se sembraron muestras de cada matraz para recuentos de colonias bacterianas.

Tabla 2

Tiempo (horas)	Control (CFU/mL)	5 ppm de ClO ₂ /5 ppm de lúpulo/200 ppm de ácido cítrico (CFU/mL)
0,25	1.200.000	1.220.000
0,5	1.340.000	1.700.000
1	10.300.000	3.000.000
64	55.600	12.800

Este ejemplo muestra que, durante la fermentación, 5 ppm de dióxido de cloro combinadas con 5 ppm de ácidos de lúpulo combinados con 200 ppm de ácido cítrico es eficaz en la reducción de bacterias, que fue inesperadamente baja después de ver los datos de MIC y sinergia de laboratorio.

- 5 La Figura 2 y la Tabla 3 muestran los rendimientos medios de etanol del control no infectado y las tres muestras después de la fermentación. No se observaron diferencias significativas en los rendimientos promedio de etanol entre todos los tratamientos ($P = 0,769$), utilizando ANOVA. En la Figura 2 y en la Tabla 3 los datos representan el promedio de tres replicas matraces de fermentación independientes.

Tabla 3

Muestra	Rendimiento de etanol (g de etanol/g de maíz seco)
Control libre de infección	0,388
5 ppm de ClO ₂ /5 ppm de lúpulo/200 ppm ácido cítrico	0,377

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que comprende:

- a) dióxido de cloro,
- b) ácidos de lúpulo y

5 c) al menos un ácido orgánico o sus sales,

en la que la concentración de dióxido de cloro es de al menos 1 ppm, en la que la concentración de ácido de lúpulo es de al menos 0,5 ppm y en la que la concentración de al menos un ácido orgánico es de al menos 50 ppm.

10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que al menos un ácido de lúpulo se selecciona del grupo que consiste en compuestos de ácido beta, ácidos alfa, ácidos alfa isomerizados, ácidos alfa isomerizados rho, ácidos alfa tetraíomerizados, ácidos alfa hexaíomerizados y de hoja de lúpulo o combinación de los mismos.

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que al menos un ácido orgánico o su sal se seleccionan del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido propiónico, ácido benzoico, o sus sales y combinaciones de los mismos.

4. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que al menos un ácido orgánico comprende ácido cítrico o su sal.

15 5. La composición de la reivindicación 1, en la que la relación de dióxido de cloro a ácido orgánico o su sal es de 1:1 a 1:15.000, preferiblemente de 1:1 a 1:10.000, más preferiblemente de 1:1 a 1:2.000, incluso más preferiblemente de 1:1 a 1:1.000, o preferiblemente de 1:4 a 1:10.000, más preferiblemente de 1:4 a 1:2.000, incluso más preferiblemente de 1:4 a 1:1.000, incluso más preferiblemente de 1:20 a 1:100.

20 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la concentración de dióxido de cloro es de al menos 1 ppm a 50 ppm, preferiblemente de al menos 5 ppm a 10 ppm, y en la que la concentración de ácido de lúpulo es de al menos 0,5 ppm a 20 ppm, preferiblemente al menos de 5 ppm a 10 ppm, y en la que la concentración de al menos un ácido orgánico o su sal es de al menos 50 ppm a 5000 ppm, preferiblemente de al menos 100 ppm a 500 ppm.

7. Un procedimiento de control de la concentración indeseable de microorganismos en un sistema acuoso, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 25 (a) introducir dióxido de cloro en un sistema acuoso,
- (b) introducir un ácido orgánico o su sal en el sistema acuoso,
- (c) introducir un ácido de lúpulo en el sistema acuoso,

30 en el que el ácido orgánico o su sal se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido propiónico, ácido benzoico y sus sales y en el que la concentración de dióxido de cloro es de al menos 1 ppm en el sistema acuoso que se está tratando y la proporción de dióxido de cloro respecto al ácido orgánico es de 1:1 a 1:64.000.

8. Un procedimiento de control de la concentración indeseable de microorganismos en un sistema acuoso empleado en un proceso de fermentación, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 35 (a) introducir un carbohidrato fermentable en una solución acuosa;
- (b) introducir al menos una levadura en dicha solución;
- (c) introducir dióxido de cloro en un sistema acuoso,
- (d) introducir un ácido orgánico o su sal en el sistema acuoso,
- (e) introducir un ácido de lúpulo en el sistema acuoso,

en el que la concentración de dióxido de cloro es de al menos 1 ppm en el sistema acuoso que se está tratando.

40 9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que la concentración de dióxido de cloro es de al menos 10 ppm en el sistema que se está tratando.

10. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que el dióxido de cloro tiene una concentración de 1 ppm a 50 ppm en el sistema acuoso que se está tratando, preferiblemente de 5-10 ppm.

45 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que al menos un ácido orgánico o su sal comprenden ácido cítrico o su sal, y la relación de dióxido de cloro con respecto a al menos un ácido orgánico o su sal, en ppm, es de 1:1 a 1:1.000.

12. El procedimiento de la reivindicación 7 o 10, en el que al menos un ácido orgánico o su sal comprende ácido propiónico o su sal, y la relación de dióxido de cloro con respecto a al menos un ácido orgánico o su sal, en ppm, es de 1:1 a 1:1.000.
- 5 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el al menos un ácido orgánico comprende ácido cítrico o su sal.
14. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que al menos un ácido orgánico o su sal es ácido benzoico o su sal, y la relación de dióxido de cloro con respecto a ácido benzoico o su sal es de 1:1 a 1:32.000 y la concentración de dióxido de cloro en la composición es de 1-50 ppm, preferiblemente de 5-10 ppm.
- 10 15. El procedimiento de la reivindicación 11 o 12, en el que la relación de dióxido de cloro con respecto a al menos un ácido orgánico o su sal es de 1:4 a 1:1.000.

FIG. 1

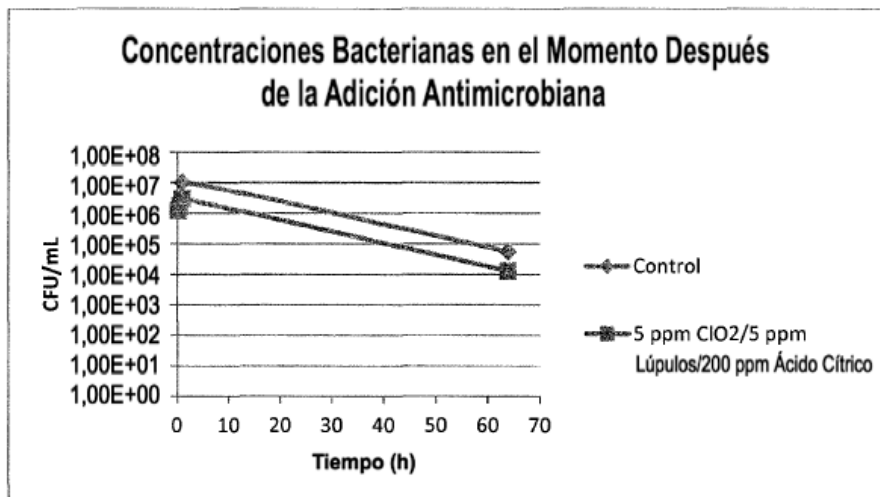


FIG. 2

