

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 456**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/02** (2006.01)  
**A01N 37/10** (2006.01)  
**A01N 37/36** (2006.01)  
**A01N 59/00** (2006.01)  
**A01P 1/00** (2006.01)  
**A61L 2/18** (2006.01)  
**C02F 1/76** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027488**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14152572**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14719580 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2967042**

54 Título: **El uso de mezclas sinérgicas de antimicrobianos para controlar microorganismos en procesos industriales**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361790095 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 660 456 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

El uso de mezclas sinérgicas de antimicrobianos para controlar microorganismos en procesos industriales

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere al uso de combinaciones sinérgicas de antimicrobianos y a métodos de su uso para el control de microorganismos indeseables en sistemas de biorrefinado acuoso o de fermentación industrial.

**Antecedentes de la invención**

10 Se sabe que la presencia de microorganismos en los sistemas de agua industrial puede ser un problema importante en los procesos industriales, causando problemas con la disminución de los rendimientos del producto, la calidad del producto y la eficiencia del proceso. La presencia física de microbios puede causar problemas, tales como su crecimiento en biopelículas en superficies de intercambio de calor donde causan reducciones en la eficiencia de transferencia de calor. La capacidad de los microbios para consumir una amplia variedad de materiales puede causar reducciones en los rendimientos, por ejemplo, los microbios que consumen celulosa causan pérdida de rendimiento en la industria de fabricación de papel. Además, la producción de productos metabólicos por microbios contaminantes puede causar problemas, tales como la producción de productos ácidos que pueden causar problemas de calidad del producto o contribuir a problemas de corrosión.

15 Sin embargo, en algunas industrias, los microorganismos se utilizan para producir varios productos de fermentación, tales como etanol de grado industrial, destilados, cerveza, vino, productos farmacéuticos y nutracéuticos (productos alimenticios que proporcionan beneficios para la salud, tales como alimentos fortificados y suplementos dietéticos), industria de la panadería 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 el sustrato con o producen productos metabólicos que interfieren con el crecimiento de los microbios deseados que están produciendo el producto final deseado.

20 Las levaduras son microbios comúnmente utilizados en los procesos de fermentación. Un tipo común de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*, la especie predominantemente utilizada en panadería y fermentación. Las levaduras que no son *Saccharomyces*, también conocidas como levaduras no convencionales, se usan también para fabricar una serie de productos comerciales.

25 Otros microorganismos también pueden ser útiles en la fabricación de productos de fermentación. Por ejemplo, la producción de etanol celulósico, la 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 utilizada en la producción de etanol celulósico es *Clostridium ljungdahlii*.

30 La mayoría de las levaduras utilizadas en las destilerías y las 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 cultivar una gran cantidad de levadura a partir de un pequeño cultivo de laboratorio de levadura. Durante la propagación, la levadura se proporciona con oxígeno, nitrógeno, azúcares, proteínas, lípidos e iones que son necesarios o deseables para un crecimiento óptimo a través de la respiración aeróbica.

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

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

45 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. También se pueden usar otras fuentes de carbohidratos que incluyen granos de cereal y materiales que contienen celulosa-almidón, tales como trigo o milo. También se puede usar biomasa celulósica tal como paja y tallos de maíz. La producción de etanol celulósico ha recibido recientemente atención porque utiliza biomasa no alimentaria fácilmente disponible para formar un combustible valioso.

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

5 Durante la propagación, el acondicionamiento o el proceso de fermentación, la pasta o la mezcla de fermentación se pueden contaminar con otros microorganismos, tales como las bacterias de descomposición. Estos microorganismos compiten con las especies deseadas de levadura por azúcares fermentables y retardan la reacción bioquímica deseada, lo que resulta en un menor rendimiento del producto. También pueden producir subproductos químicos no deseados, que pueden causar la descomposición de lotes enteros de fermentación.

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

15 Durante cualquiera de estos tres procesos, la levadura se puede contaminar con levaduras indeseables, bacterias u otros microorganismos indeseables. Esto puede ocurrir en uno de los muchos recipientes utilizados en la propagación, el acondicionamiento o la fermentación. Esto incluye, pero no se limita a ellos, 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 formas principales. Primero, los azúcares que podrían estar disponibles para que la levadura produzca 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 el ácido láctico y el ácido acético, inhiben el crecimiento de la levadura y la fermentación/respiración de la levadura, lo que resulta en una producción de levadura menos eficiente. Finalmente, las bacterias compiten con la levadura por otros nutrientes además del azúcar.

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

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

35 Algunos métodos para reducir las bacterias durante la propagación, el acondicionamiento y la fermentación aprovechan la mayor temperatura y la tolerancia al pH de la levadura en comparación con otros microorganismos. Esto se hace aplicando calor o disminuyendo el pH de la solución de levadura. Sin embargo, estos procesos no son completamente efectivos en retardar el crecimiento bacteriano. Además, la levadura deseable, aunque sobrevive, está estresada y no es tan vigorosa ni saludable, y tampoco rinde tan bien.

40 La tendencia predominante en la industria del etanol es reducir el pH de la pasta (material de alimentación) a menos de 4,5 al inicio de la fermentación. Bajar el pH de la pasta reduce la población de algunas especies de bacterias. Sin embargo, es mucho menos eficaz para reducir las bacterias problemáticas, como las bacterias productoras de ácido láctico o las bacterias productoras de ácido acético. También reduce significativamente el rendimiento de etanol al estresar la levadura utilizada para la producción de etanol.

Otro enfoque implica lavar la levadura con ácido fosfórico. Este método no mata las bacterias de manera efectiva. También puede estresar la levadura utilizada para la producción de etanol, lo que reduce su eficacia.

45 Otro método más es usar calor o productos químicos agresivos para esterilizar el equipo de proceso entre lotes. No es efectivo para matar bacterias dentro de la mezcla de levadura durante la producción.

50 En otro método más, los antibióticos se añaden al lote de la propagación, acondicionamiento o fermentación de la levadura para neutralizar las bacterias. Actualmente, casi todas las plantas de biorrefinado de EE.UU. utilizan un agente antimicrobiano y muchas de ellas usan antibióticos tales como la Virginiamicina. Un producto importante del biorrefinado del maíz son los granos secos de destilería para su uso como alimento para animales, y el mercado de granos de alimentación libres de antibióticos está creciendo. Se espera que la FDA pronto formule regulaciones que reduzcan o eliminen el uso de antibióticos en la alimentación animal. Canadá tiene preocupaciones similares con respecto a los antibióticos en los granos de destilería y la mayoría de su producción se exporta. Europa ya ha prohibido el uso de antibióticos en plantas de etanol donde se producen granos de destilería para la alimentación animal. En Brasil, operar sin antibióticos es obligatorio en las plantas que producen extracto de levadura para la exportación. Las ventas de los granos de destilería representan hasta un 20% de las ganancias de una planta de etanol. La concentración de antibiótico en el subproducto puede variar de 1-3% en peso, lo que anula esta importante fuente de ingresos.

Además, hay otros problemas a considerar cuando se usan antibióticos. Las mezclas de antibióticos se deben equilibrar y cambiar con frecuencia para evitar usos únicos que conduzcan a cepas resistentes a los antibióticos. En ocasiones, la cantidad efectiva de antibiótico no se puede añadir 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 *Weisella confusa*, una cepa de bacterias problemática emergente. La sobredosis o el uso excesivo de antibióticos puede estresar la levadura y tener impacto sobre la eficacia o causar un incumplimiento regulatorio.

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

Otra alternativa al uso de antibióticos para controlar las bacterias no deseadas en los procesos de fermentación es la aplicación de dióxido de cloro. El dióxido de cloro es un antimicrobiano oxidante, a menudo generado in situ, que se puede aplicar a varios sitios de dosificación en el proceso de fermentación. Los grandes volúmenes de los sistemas a tratar y las capacidades limitadas de los sistemas actuales de generación de dióxido de cloro a menudo limitan los sistemas de fermentación que se pueden tratar con este enfoque o requieren el despliegue de múltiples generadores.

Debido a que pequeñas disminuciones en el rendimiento de etanol son altamente significativas para la industria de etanol combustible, los productores de etanol están constantemente buscando formas de aumentar la eficacia. Los antimicrobianos se usan para eliminar, reducir o controlar la cantidad de microbios en los sistemas acuosos. Sin embargo, el uso de antimicrobianos siempre añadirá un coste a las operaciones y productos y, por lo tanto, se buscan formas más eficaces para lograr el control microbiano. Además, algunos antimicrobianos pueden presentar deficiencias en su espectro de acción antimicrobiana o limitaciones operacionales en su forma de aplicación, tales como la falta de estabilidad de 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 antimicrobianos generados in situ, las limitaciones en el volumen de antimicrobianos que se pueden producir pueden ser importantes.

Por lo tanto, se pueden usar 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 costes mejorado sobre aquellas combinaciones que son meramente aditivas en términos de eficacia antimicrobiana. Además, las combinaciones sinérgicas de antimicrobianos en los que uno es un antimicrobiano generado in situ pueden reducir el volumen requerido de antimicrobiano y así aumentar el tamaño máximo del sistema que se puede tratar.

Una posible alternativa al uso de antibióticos es la aplicación de ácidos orgánicos antimicrobianos, que se utilizan como conservantes de alimentos, anulando así las preocupaciones sobre su presencia en los granos de destilería. Los ácidos orgánicos tienen muchas aplicaciones, que incluyen su uso como acidificantes, tampones, antioxidantes, quelantes, aditivos sinérgicos, suplementos dietéticos, aromatizantes, conservantes y antimicrobianos. Los ácidos orgánicos se han usado como conservantes debido a su efecto sobre las bacterias. Un posible inconveniente de este enfoque son los niveles y los volúmenes relativamente altos requeridos cuando son utilizados por ellos mismos.

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 costes mejorado sobre aquellas combinaciones que son meramente aditivas en términos de eficacia antimicrobiana. H. Kim et al., Food Microbiology 25 (2008) 964-969 describe la producción y la estabilidad del dióxido de cloro en soluciones de ácido orgánico afectadas por el pH, el tipo de ácido y la concentración de clorito de sodio, y su eficacia en la activación de las esporas de *Bacillus cereus*.

El documento WO 2007/149450 A2 se refiere a un proceso de fermentación para la producción de etanol a partir de fuentes naturales, que comprende la introducción de un azúcar fermentable, un inoculante y un dióxido de cloro estabilizado en un sistema de fermentación.

El documento US 2002/0053657 A1 describe una solución para generar dióxido de cloro, comprendiendo dicha solución un clorito, un donador de clorito, un álcali y agua.

El documento US 6,071,483 describe un recipiente de reactor y un proceso asociado para preparar una solución de dióxido de cloro de dosificación controlada.

El documento US 2004/0231977 A1 describe composiciones y métodos para aumentar la estabilidad y/o eficacia del dióxido de cloro, particularmente el dióxido de cloro generado por electrólisis de clorito.

El documento US 5,165,910 describe un método de fabricación compacto de un dióxido de cloro estabilizado acuoso que es útil como desinfectante o desodorante. El método comprende añadir a una solución acuosa de cloruro de metal alcalino una solución acuosa de hipoclorito de metal alcalino, mientras que antes y después de la adición de la solución de hipoclorito se usa un ácido orgánico tal como ácido cítrico o un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico para ajustar el ph a 7-9 o 2-5,6, respectivamente.

**Breve descripción de las figuras**

La figura 1 representa el recuento de bacterias a lo largo del tiempo después de la adición de antimicrobianos

**Descripción de la invención**

Para los propósitos de esta 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 que estas composiciones son eficaces son las bacterias. Los ejemplos de bacterias indeseables incluyen, pero no se limitan a, bacterias de ácido láctico, bacterias de ácido acético y bacterias que contaminan los procesos de fermentación de etanol. También se entiende que los microbios dentro de sistemas acuosos pueden localizarse o suspenderse dentro del fluido (por ejemplo, planctónico) o localizarse en una superficie en contacto con el sistema acuoso (por ejemplo, biopelículas). Las palabras y frases "control", "control microbiano", "control" y "eficacia antimicrobiana" se deben interpretar para incluir dentro de su significado, sin limitarse a ello, la inhibición del crecimiento de microbios, la destrucción de microbios, la desinfección, la conservación, la sanitización, o la prevención del rebrote de microbios.

Como se usa en la presente memoria, las ppm se miden como masa por volumen o 1 ppm es igual a 1 mg (activo) por litro.

Como se usa en la presente memoria, el término "ácido orgánico" también se refiere a su sal.

La presente invención proporciona el uso de una combinación sinérgica de: (a) dióxido de cloro y (b) al menos un ácido orgánico que es ácido cítrico o su sal para controlar la concentración de microorganismos indeseables en un sistema acuoso que es un sistema de biorrefinado o un sistema de fermentación industrial, en el que la relación de dióxido de cloro a ácido orgánico es de 1:1 a 1:15.000; y en donde el dióxido de cloro está a una concentración de 1 a 15 ppm en el sistema acuoso. La presente invención proporciona una reducción significativa del número de bacterias contaminantes en dichos sistemas acuosos donde la presencia de la bacteria se considera indeseable.

Las combinaciones antimicrobianas se usan especialmente para controlar microorganismos en sistemas acuosos en la industria de biorrefinado que produce etanol u otros productos químicos. Las combinaciones incluyen ácido cítrico o su sal.

Se ha descubierto que el uso de las combinaciones de dióxido de cloro y al menos un ácido orgánico que es ácido cítrico proporciona control microbiano sinérgico en sistemas acuosos que son sistemas de biorrefinado o sistemas de fermentación industrial. Por lo tanto, la combinación de componentes da como resultado una eficacia antimicrobiana mejorada más allá de la que se esperaría en base a la suma de sus eficacias antimicrobianas individuales. Esta sinergia observada inesperadamente permite que se utilicen cantidades reducidas de los antimicrobianos para lograr un control microbiano aceptable en procesos industriales tales como la biorrefinería.

El dióxido de cloro usado se puede generar in situ a través de una transformación química de clorito o clorato u otro sustrato, mediante generación electroquímica, o se puede proporcionar mediante formulaciones estabilizadas de dióxido de cloro. Los ácidos orgánicos utilizados en la combinación incluyen ácido cítrico. Las sales de ácido cítrico también son útiles.

En casos en que el antimicrobiano se produce *in situ* tal como dióxido de cloro, la reducción en la cantidad de antimicrobiano requerida permite que las combinaciones se usen en sistemas cuyos requisitos de volumen de otro modo serían demasiado grandes para ser tratados solo con dióxido de cloro.

Los componentes de la composición se pueden formular como una única mezcla y añadirse al sistema a tratar. También se pueden mezclar después de la generación in situ del dióxido de cloro y añadirlo al sistema, o se pueden añadir secuencialmente o en diferentes lugares en el proceso. Una persona con experiencia normal en la técnica puede determinar fácilmente el método apropiado de adición para cada sistema a tratar.

Una realización no limitante del método actual para reducir la concentración de microorganismos indeseables en un sistema acuoso que es un sistema de biorrefinado o un sistema de fermentación industrial comprende:

(a) introducir dióxido de cloro en el sistema a tratar

(b) introducir un ácido orgánico, en el que el ácido orgánico es ácido cítrico o su sal, en el sistema a tratar,

donde el dióxido de cloro está en una concentración de 1 ppm a 15 ppm en el sistema acuoso para ser tratado y la relación de dióxido de cloro a ácido orgánico es de 1: 1 a 1: 15.000.

Los ejemplos adecuados de ácidos orgánicos adicionales útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido benzoico, ácido propiónico, ácido tartárico, ácido acético, ácido bencenosulfónico, ácido oxálico, ácido málico, ácido salicílico, ácido láctico, ácido glucónico, ácido hidroxiacético y su sales. Para los fines de esta invención, el ácido orgánico no es un ácido de lúpulo.

- 5 Los sistemas acuosos en los que se utilizan las composiciones son procesos de biorrefinado y fermentaciones industriales, aguas de biorrefinado y sistemas que los utilizan.

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 donde el pH del sistema es menor o igual que al menos uno de los valores del pKa del ácido o su sal.

- 10 Los componentes de la composición se pueden añadir al sistema acuoso para tratarlos secuencialmente o combinarlos y luego añadirlos al sistema a tratar. Los ácidos orgánicos se pueden añadir a los sistemas laterales acuosos con otros aditivos tales como, pero no necesariamente restringidos a, tensioactivos, compuestos de control de incrustaciones y corrosión, polímeros iónicos o no iónicos, agentes de control de pH y otros aditivos utilizados para alterar o modificar la química del sistema acuoso.

- 15 El dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) se añade a los sistemas a tratar en las relaciones de dióxido de cloro al ácido orgánico de 1:1 a 1:15.000, en particular de 1:1 a 1:10.000 o de 1:1 a 1:2.000 o de 1:1 a 1:1.000 o de 1:4 a 1:15.000 o de 1:4 a 1:10.000 o de 1:4 a 1:2.000 o de 1:4 a 1:1.000 o de 1:20 a 1:100.

- 20 Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente la concentración de la composición requerida para lograr un control microbiano aceptable, y que la concentración depende de la matriz. El dióxido de cloro se usa en cantidades de 1 ppm a 15 ppm en el sistema acuoso a tratar, en particular de 3 ppm a 15 ppm o de 3 a 9 ppm. En general, se usa al menos 3 ppm o al menos 5 ppm o al menos 7 ppm del dióxido de cloro en el sistema que se está tratando. La relación del dióxido de cloro al al menos un ácido orgánico es de 1:1 hasta 1:15.000 en particular de 1:1 a 1:10.000 o de 1:1 a 1:2.000 o de 1:1 a 1:1.200 o de 1:4 a 1:15.000 o de 1:4 a 1:10.000 o de 1:4 a 1:2.000 o de 1:4 a 1:1.000 o de 1:20 a 1:100.

- 25 En una realización, la relación de dióxido de cloro al ácido orgánico puede ser de 1:4 hasta 1:100 o de 1:4 a 1:50 o de 1:4 a 1:15. La cantidad de dióxido de cloro usado en el sistema acuoso a tratar es de 1 ppm a 15 ppm, en particular de 1 ppm a 10 ppm o de 3 ppm a 9 ppm.

- 30 En la presente invención, el ácido orgánico es ácido cítrico o su sal y la relación de dióxido de cloro es de 1:1 hasta 1:15.000 o de 1:1 a 1:10.000 o de 1:1 a 1:5.000 o 1:1 a 1:2.000 o de 1:1 a 1:1.000 o de 1:4 a 1:15.000 o de 1:4 a 1:2.000 o de 1:4 a 1:1.000 o de 1:20 a 1:100. El ácido cítrico podría usarse en una cantidad de 6.250 a 100 ppm o de 4.000 a 100 ppm o de 4.000 a 200 ppm en el sistema acuoso a tratar. Generalmente, se usa al menos 100 ppm o al menos 200 ppm o al menos 300 ppm de ácido cítrico en el sistema acuoso a tratar.

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

- 35 Cuando se usa en un sistema de fermentación, la combinación de dióxido de cloro y ácido cítrico o su sal se puede añadir en varios lugares del sistema de fermentación, como se puede añadir en uno o varios lugares en el proceso de fermentación, incluido el tanque(s) de suspensión, estufas, enfriadores de la masa, propagadores y tanques de fermentación. Un experto en la técnica también puede determinar otros puntos de adición.

- 40 En los sistemas de fermentación que usan el presente método, las concentraciones de bacterias y otros microorganismos indeseables se pueden reducir mientras se fomenta la propagación y/o el acondicionamiento de los microorganismos deseables. Se ha descubierto que el dióxido de cloro en combinación con al menos ácido cítrico o su sal es eficaz para reducir la concentración de bacterias indeseables y otros microorganismos indeseables al mismo tiempo que se fomenta la propagación y/o el acondicionamiento de los microorganismos deseables. La combinación de estos productos proporciona un tratamiento sinérgico, antimicrobiano sin el uso de antibióticos.

- 45 Una realización no limitante del método actual para reducir la concentración de microorganismos indeseables, promover la propagación deseable de microorganismos y aumentar la eficacia de microorganismos deseables en un sistema acuoso comprende:

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

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

- 50 (c) introducir dióxido de cloro y al menos un ácido orgánico en el sistema acuoso, donde los ácidos orgánicos incluyen al menos ácido cítrico o sus sales.

Otra realización no limitativa del método actual para reducir la concentración de microorganismos indeseables, 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,
- (b) introducir una cantidad de levadura en el sistema acuoso, y
- (c) introducir dióxido de cloro y al menos un ácido orgánico en el sistema acuoso, en donde los ácidos orgánicos incluyen al menos ácido cítrico o sus sales.

5 Las etapas del método se pueden realizar de forma secuencial o en un orden diferente. El dióxido de cloro y el ácido orgánico se pueden poner en contacto con la levadura o con el carbohidrato de fermentación o la levadura y el carbohidrato fermentable se pueden combinar y luego el dióxido de cloro y el ácido orgánico se pueden introducir en la combinación de levadura y carbohidrato. El dióxido de cloro y el ácido orgánico se pueden combinar conjuntamente y luego añadirse al sistema acuoso o se pueden añadir 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.

10 En el método, los microorganismos "indeseables" que se pretende reducir son aquellos que compiten por nutrientes con los microorganismos deseables que promueven los procesos de fermentación deseados. A este respecto, el dióxido de cloro y el ácido orgánico empleados en el presente método preferiblemente no afectan negativamente al crecimiento y la viabilidad de los microorganismos promotores de la fermentación deseados, pero eliminan o suprimen el crecimiento de microorganismos indeseables que interfieren con el proceso de fermentación. Además, la eliminación o supresión de microorganismos indeseables tiene un efecto favorable sobre el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos deseables.

15 La producción de etanol de combustible mediante 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 al menos un ácido orgánico, incluido el ácido cítrico o su sal, podrían incluir bebidas alcohólicas, cerveza, vino, productos farmacéuticos, productos intermedios farmacéuticos, productos de panadería, nutracéuticos (alimentos que proporcionan beneficios a la salud, tales como alimentos fortificados y suplementos dietéticos), intermedios nutracéuticos, materias primas químicas industriales y enzimas. El método actual también podría utilizarse para tratar la levadura utilizada en la industria de la panadería.

20 La levadura no es el único microorganismo beneficioso utilizado en la fermentación. Otros microorganismos de fermentación deseables adicionales también podrían usarse y beneficiarse con la invención, tal como los hongos y bacterias típicamente usados en la producción de etanol celulósico. Algunos ejemplos no limitantes de microorganismos fermentadores deseables incluyen, pero no se limitan a ellos, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, y *Clostridium ljungdahlii*.

25 El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede añadir en varios puntos en los procesos de propagación, acondicionamiento y/o fermentación. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede añadir a estufas, tanques de fermentación, tanques de propagación, tanques de acondicionamiento, tanques de arranque o durante la licuefacción. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico también se puede añadir directamente a la pasta de maíz. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico también se puede añadir al sistema de intercambio de calor entre etapas o intercambiadores de calor. El dióxido de cloro junto con al menos un ácido orgánico también se puede añadir a la tubería entre estas unidades o intercambiadores de calor. Al menos un ácido orgánico es ácido cítrico.

30 El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede añadir directamente a la mezcla de fermentación. Esto puede hacerse añadiendo el dióxido de cloro y al menos ácido cítrico o su sal junto con la levadura u otro microorganismo deseable y carbohidrato fermentable, por ejemplo durante la etapa de SSF (sacarificación y fermentación simultáneas). Las dosificaciones de dióxido de cloro de entre 1 y 15 ppm y las dosis de ácido orgánico de entre 1 y 15.000 o entre 1 y 2.000 ppm se pueden añadir directamente a la mezcla de fermentación.

35 El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico también se puede añadir a la pasta antes del proceso de fermentación. Las dosificaciones de dióxido de cloro de entre 1 y 15 ppm y las dosis de ácido orgánico de entre 1 y 15.000 o entre 1 y 2.000 ppm se pueden añadir a la mezcla antes de la fermentación.

40 El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico también se puede añadir durante la propagación y/o el acondicionamiento.

45 El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede usar para lograr mejores resultados en la producción de etanol celulósico. El etanol celulósico es un tipo de etanol que se produce a partir de la 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, como el pasto varilla, el rastrojo de maíz y la silvicultura. Este tipo de producción de etanol es particularmente atractiva debido a la gran disponibilidad de fuentes de celulosa. El etanol celulósico, por la propia naturaleza de la materia prima, introduce niveles más altos de contaminantes y microorganismos competidores en el proceso de fermentación. El dióxido de cloro junto con al menos un ácido orgánico se puede usar en la producción de etanol celulósico para controlar microorganismos indeseables. Las dosificaciones de dióxido de cloro de entre 1 y 15 ppm y las dosificaciones de ácido orgánico de entre 1 y 15.000 o

entre 1 a 2.000 ppm se pueden agregar directamente a la mezcla de fermentación. Al menos un ácido orgánico es ácido cítrico.

5 Hay dos procesos principales para producir 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 que utiliza una bacteria como *Clostridium ljungdahlii*. El dióxido de cloro junto con al menos un ácido orgánico se puede utilizar en cualquier proceso. Al menos un ácido orgánico es ácido cítrico.

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 de manera química o enzimática.

10 En el método de hidrólisis química, la celulosa se puede tratar con ácido diluido a alta temperatura y presión o ácido concentrado a temperatura y presión atmosférica más bajas. En el proceso de hidrólisis química, la celulosa reacciona con el ácido y el agua para formar moléculas de azúcar individuales. Estas moléculas de azúcar se neutralizan y después, la fermentación de levadura se usa para producir etanol. El dióxido de cloro junto con al menos ácido cítrico o su sal se puede usar durante la porción de fermentación de levadura de este método.

15 La hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo utilizando dos métodos. El primero se conoce como conversión microbiana directa (DMC, del inglés Direct Microbial Conversion). El método DMC utiliza un único microorganismo para convertir la biomasa celulósica en etanol. El etanol y las enzimas requeridas son producidas por el mismo microorganismo. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede usar durante las etapas de propagación/acondicionamiento o fermentación con este organismo especializado.

20 El segundo método se conoce como el método de hidrólisis enzimática. En este método, las cadenas de celulosa se descomponen utilizando enzimas celulasa. Estas enzimas están típicamente presentes en los estómagos de los rumiantes, como las vacas y las ovejas, para descomponer la celulosa que comen. El método enzimático se lleva a cabo típicamente en cuatro o cinco etapas. La celulosa está pretratada para hacer que la materia prima, como la madera o la 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 a etanol usando levadura. Finalmente, el etanol se recupera por destilación. Alternativamente, la hidrólisis y la fermentación se pueden llevar a cabo juntas utilizando bacterias especiales u hongos que cumplen ambos procesos. Cuando ambas etapas se llevan a cabo juntos, el proceso se llama hidrólisis y fermentación secuencial (SHF, del inglés Sequential Hydrolysis and Fermentation).

30 El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede introducir para la eficacia microbiológica en diversos puntos en el método enzimático de hidrólisis. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede usar en la producción, fabricación y fermentación de enzimas celulasa hechas por *Trichoderma* y otras cepas de hongos. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede agregar en la fase de sacarificación y fermentación (SSF, del inglés Simultaneous Saccharification and Fermentation) celulósica simultánea. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede 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 celulasa. Alternativamente, el dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede añadir durante la fase de fermentación de la levadura, como se ha discutido anteriormente.

40 El proceso de gasificación no rompe la cadena de celulosa en moléculas de azúcar. Primero, el carbono en la celulosa se convierte en monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno en una reacción de combustión parcial. Luego, el monóxido de carbono, el dióxido de carbono y el hidrógeno se alimentan en un fermentador especial que utiliza un microorganismo como *Clostridium 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. El dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se puede usar como un agente antimicrobiano en la etapa de fermentación que involucra microorganismos tales como *Clostridium ljungdahlii* que son capaces de consumir monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno para producir etanol y agua.

50 En una realización no limitante, se añade dióxido de cloro junto con al menos un ácido orgánico a un tanque y se diluye a una concentración predeterminada en una relación predeterminada. En el tanque, el dióxido de cloro junto con el ácido orgánico se disuelve en agua para formar dióxido de cloro junto con la mezcla de ácidos orgánicos. La concentración del dióxido de cloro junto con el ácido orgánico en el tanque discontinuo puede variar en un amplio intervalo. El dióxido de cloro junto con al menos un ácido orgánico se extrae luego del tanque discontinuo a través de una salida a una tasa de dosificación específica para crear una solución de la concentración deseada. Al menos un ácido orgánico es ácido cítrico.

## EJEMPLOS

55 Los índices de sinergia recogidos en los siguientes ejemplos utilizan la siguiente fórmula, que se recogió por primera vez en F.C. Kull, P.C. Eisman, H.D. Sylwestrowka, y R.L. Mayer, Applied Microbiology 9: 538-541, 1961:

Índice de sinergia =  $Qa/QA + Qb/QB$

donde 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 Antimicrobiano B;

5 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 Antimicrobiano A;

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

10 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 antagónicos entre sí, y un SI de menos de 1 indica que los dos antimicrobianos interactúan de forma sinérgica.

Aunque existen diversos métodos 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 Concentración Inhibitoria Mínima, o MIC, del inglés Minimal Inhibitory Concentration. Esta es la concentración más baja de una sustancia o sustancias que puede lograr la inhibición completa del crecimiento.

20 Con el fin de determinar la Concentración Inhibitoria Mínima, se construye una serie de dos diluciones del antimicrobiano haciéndose las diluciones en medios de crecimiento. Las diluciones se realizan en una microplaca de 96 pocillos, de modo que cada pocillo 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 500 ppm, el tercero 250 ppm, y así sucesivamente, con el pocillo 12 y final en la fila que no tiene antimicrobianos en absoluto y que sirve como un control de crecimiento positivo. Después de que se construye la serie de dilución, los pocillos reciben un inóculo de microbio suspendido en medio de crecimiento de modo que la concentración final de microbios en el pocillo es de  $\sim 5 \times 10^5$  ufc/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 pocillos se calificaron como positivos o negativos para el crecimiento en base a un examen visual de pocillos turbios. Un pocillo turbio indica que ha ocurrido crecimiento. La concentración más baja de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento (por ejemplo, un pocillo transparente) se denomina Concentración Inhibitoria Mínima.

30 Con el fin de determinar si la interacción entre dos antimicrobianos es aditiva, antagonista o sinérgica frente a un microbio objetivo, se emplea una modificación del método MIC conocido como el método "tablero de ajedrez" utilizando microplacas de 96 pocillos. Para construir una placa de tablero de ajedrez, el primer antimicrobiano se usa utilizando el método de dilución doble en serie utilizado para construir una placa MIC, excepto que cada una de las ocho filas es una serie de dilución idéntica que termina después de la octava columna. El segundo antimicrobiano se usa mediante la adición de volúmenes idénticos de una serie de dilución doble en ángulos rectos a la primera serie. 35 El resultado es que cada pocillo del cuadrado de 8 x 8 pocillos tiene una combinación diferente de concentraciones antimicrobianas, lo que da 64 combinaciones diferentes en total. Las columnas 9 y 10 no reciben antimicrobiano en absoluto y sirven como controles de crecimiento positivo y negativo, respectivamente. Después de construir la microplaca de tablero de ajedrez, se inocula con *Lactobacillus plantarum*, incubado a 37 ° C, y se puntúa como se describe para el método MIC.

#### 40 **Ejemplo 1: Sinergia de dióxido de cloro con ácido cítrico (Ejemplo de referencia)**

Se determinaron concentraciones inhibitorias mínimas para el dióxido de cloro y el ácido cítrico a pH 6 utilizando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como el microbio de ensayo. Las placas de sinergia del tablero de ajedrez se construyeron como se describe, los pocillos se inocularon hasta una concentración final de  $\sim 5 \times 10^5$  ufc/ml, se incubaron durante 18-24 horas, y luego se puntuaron visualmente para ver crecimiento/no 45 crecimiento. Los índices de sinergia se calcularon de acuerdo con la fórmula descrita por Kull et al. Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar dióxido de cloro 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 100 ppm a 15-60 ppm. La concentración de ácido cítrico cae de 100.000 ppm a un intervalo de 390-12.500 ppm.

50

Tabla 1					
Usado solo		Usado en combinación			
MIC de ClO <sub>2</sub> (QA) ppm	MIC de ácido cítrico (QB) ppm	MIC de ClO <sub>2</sub> (Qa) ppm	MIC de ácido cítrico (Qb) ppm	Relación de ClO <sub>2</sub> : Ácido Cítrico	Índice de Sinergia
100	100.000	15	12.500	1:833	0,28
100	100.000	30	6.250	1:208	0,36
100	100.000	30	3.125	1:104	0,33
100	100.000	60	1.563	1:26	0,62
100	100.000	60	782	1:13	0,61
100	100.000	60	390	1:6,5	0,60

### Ejemplo 2: sinergia de dióxido de cloro con propionato de sodio (ejemplo comparativo)

5 Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas para el dióxido de cloro y el propionato de sodio a pH 6 usando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como el microbio de ensayo. Las placas de sinergia del tablero de ajedrez se construyeron como se ha descrito, los pocillos se inocularon hasta una concentración final de  $\sim 5 \times 10^5$  ufc/ml, se incubaron durante 18-24 horas, y luego se puntuaron visualmente para ver crecimiento/no crecimiento. Los índices de sinergia se calcularon de acuerdo con la fórmula descrita por Kull et al. Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar dióxido de cloro y propionato de sodio 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 115 ppm a 25 ppm y 100 ppm. La concentración de propionato de sodio cae de 100.000 ppm a un intervalo de 390 ppm – 25.000 ppm.

Tabla 2					
Usado solo		Usado en combinación			
MIC de ClO <sub>2</sub> (QA) ppm	MIC de propionato de sodio (QB) ppm	MIC de ClO <sub>2</sub> (Qa) ppm	MIC de propionato de Sodio (Qb) ppm	Relación de ClO <sub>2</sub> : Propionato de Sodio	Índice de Sinergia
115	100.000	25	25.000	1:1.000	0,47
115	100.000	100	3.125	1:31,25	0,90
115	100.000	100	1.563	1:15,63	0,89
115	100.000	100	782	1:7,82	0,88
115	100.000	100	390	1:4	0,87

### Ejemplo 3: Sinergia de dióxido de cloro con benzoato de potasio (ácido benzoico) (Ejemplo comparativo)

15 Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas para el dióxido de cloro y el benzoato de potasio a pH 6 utilizando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como el microbio de ensayo. Las placas de sinergia del tablero de ajedrez se construyeron como se ha descrito, los pocillos se inocularon hasta una concentración final de  $\sim 5 \times 10^5$  ufc/ml, se incubaron durante 18-24 horas, y luego se puntuaron visualmente para ver

## ES 2 660 456 T3

crecimiento/no crecimiento. Los índices de sinergia se calcularon de acuerdo con la fórmula descrita por Kull et al. Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar dióxido de cloro y benzoato de potasio es mayor que el efecto de cualquier antimicrobiano solo. La cantidad de dióxido de cloro necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se reduce de 115 o 130 ppm a 0,78 ppm-100 ppm. La concentración de benzoato de potasio desciende de 100.000 ppm a un intervalo de 390 ppm a 50.000 ppm.

5

Tabla 3					
Usado solo		Usado en combinación			
MIC de ClO <sub>2</sub> (QA) ppm	MIC de benzoato de potasio (QB) ppm	MIC de ClO <sub>2</sub> (Qa) ppm	MIC benzoato de potasio (Qb) ppm	Relación de ClO <sub>2</sub> : Benzoato de Potasio	Índice de Sinergia
115	100.000	12,5	6.250	1:500	0,17
115	100.000	25	3.125	1:125	0,25
115	100.000	25	1.563	1:63	0,23
115	100.000	25	782	1:31	0,23
115	100.000	3,125	25.000	1:8000	0,28
115	100.000	12,5	12.500	1:1000	0,23
115	100.000	50	6.250	1:125	0,50
115	100.000	100	3.125	1:31,25	0,90
115	100.000	100	1.563	1:15,63	0,89
115	100.000	100	782	1:7,82	0,88
115	100.000	100	390	1:3,9	0,87
130	100.000	8	50.000	1:6.250	0,56
130	100.000	16	25.000	1:1.563	0,37
130	100.000	16	12.500	1:781	0,25
130	100.000	63,5	6.250	1:98	0,55
130	100.000	63,5	3.125	1:49	0,52
130	100.000	127	1.563	1:12,3	0,99
130	100.000	127	782	1:6,2	0,99

#### Ejemplo 4: dióxido de cloro con ácido ascórbico (ejemplo comparativo)

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas para el dióxido de cloro y el ácido ascórbico a pH 6 usando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como el microbio de ensayo. Las placas de sinergia del tablero de ajedrez se construyeron como se ha descrito, los pocillos se inocularon hasta una concentración final de  $\sim 5 \times 10^5$  ufc/ml, se incubaron durante 18-24 horas, y luego se puntuaron visualmente para ver

10

si crecimiento/no crecimiento. Los índices de sinergia se calcularon de acuerdo con la fórmula descrita por Kull et al. Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar dióxido de cloro y ácido ascórbico es antagónico. Por lo tanto, sustituir "cualquier" ácido orgánico junto con dióxido de cloro no es factible u obvio para alguien relativamente experto en la técnica.

5

Tabla 4						
Usado solo			Usado en combinación			
MIC de ClO <sub>2</sub> (QA) ppm	MIC de ácido Ascórbico (QB) ppm	MIC de ClO <sub>2</sub> (Qa) ppm	MIC de ácido ascórbico (Qb) ppm	Relación de ClO <sub>2</sub> : ácido ascórbico	Índice de Sinergia	
67,5	10.000	67,5	5000	1:74	1,50	
67,5	10.000	67,5	2500	1:37	1,25	
67,5	10.000	67,5	1250	1:18,5	1,13	
67,5	10.000	67,5	625	1:9,26	1,06	
67,5	10.000	135	313	1:2,32	2,03	
67,5	10.000	67,5	156,3	1:2,32	1,02	
67,5	10.000	135	78	1,73:1	2,01	
67,5	10.000	135	39	3,46:1	2,00	
67,5	10.000	135	156,3	1:1,16	2,02	
67,5	10.000	67,5	39	1,73:1	1,00	

**Ejemplo 5: Datos de laboratorio de fermentación**

Las muestras ensayadas y sus concentraciones se pueden encontrar en la Figura 1 y en la tabla 5. Se hicieron tres suspensiones de 160 gramos de harina de maíz, agua y enzima (30% p/p de sólidos secos) para cada tratamiento y control (inoculados y no inoculados). 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 antimicrobiano. A los 15, 30 y 60 minutos después del tratamiento, se tomaron muestras y se analizaron su viabilidad y azúcares. Todos los matraces de fermentación se mezclaron durante 20 minutos a 40 °C y luego se inocularon con *S. cerevisiae* y se fermentaron a 32 °C durante 62 horas. Los datos de masa se recogieron a las 0, 17,5, 22,5, 42,5, 48 y 64 horas después de la inoculación con levadura. Al finalizar el estudio, se recopilaron datos sobre masa, azúcares y productos, sólidos secos, densidad del filtrado, sólidos disueltos y recuento de bacterias.

Este ejemplo muestra que durante la fermentación, 5 ppm de dióxido de cloro combinado con 200 ppm de ácido cítrico es efectivo en la reducción de bacterias, que fue inesperadamente bajo después de ver la MIC de laboratorio y los datos de sinergia.

20 Tabla 5: Recuento de bacterias (UFC x 10<sup>6</sup>)

	15 min	30 min	60 min	62 horas
Control	1,20	1,34	10,3	0,0556
5ppm ClO <sub>2</sub> /200ppm de ácido cítrico	1,18	1,55	3,62	0,0030

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una combinación de:
- (a) dióxido de cloro, y
  - (b) al menos un ácido orgánico que es ácido cítrico o su sal
- 5 para controlar la concentración de microorganismos indeseables en un sistema acuoso que es un sistema de biorrefinado o sistema de fermentación industrial, donde la relación de dióxido de cloro a ácido orgánico es de 1:1 a 1:15.000;
- y en donde el dióxido de cloro está a una concentración de 1 a 15 ppm en el sistema acuoso.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que la relación de dióxido de cloro a ácido orgánico es de 1:1 a 1: 2.000.
3. El uso de la reivindicación 1 o 2 en el que la relación de dióxido de cloro a ácido cítrico es de 1:1 a 1: 1.000.
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dióxido de cloro está a una concentración de 5 a 10 ppm en el sistema acuoso.
- 15 5. El uso de la reivindicación 1, en el que el ácido cítrico se usa en una cantidad de al menos 200 ppm en el sistema acuoso.
6. El uso de la reivindicación 1, en el que el ácido cítrico se usa en una cantidad de al menos 300 ppm en el sistema acuoso.
7. El uso de la reivindicación 1, en el que el ácido cítrico se usa en una cantidad de 100 ppm a 6.250 ppm en el sistema acuoso.
- 20 8. El uso de la reivindicación 1 que se encuentra en un proceso de fermentación durante la etapa de propagación y/o acondicionamiento.
9. Un método para controlar la concentración de microorganismos indeseables en un sistema acuoso que es un sistema de biorrefinado o un sistema de fermentación industrial, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) introducir dióxido de cloro en un sistema acuoso y
  - (b) introducir un ácido orgánico en el sistema acuoso,
- 25 donde el ácido orgánico es ácido cítrico o su sal y en el que el dióxido de cloro tiene una tasa de dosificación de al menos 1 ppm y hasta 15 ppm en el sistema acuoso tratado y la relación de dióxido de cloro a ácido orgánico es de 1:1 a 1:15.000.
- 30 10. El método de la reivindicación 9 en el que una relación de dióxido de cloro a ácido cítrico es de 1:4 a 1:1.000, y la tasa de dosificación de dióxido de cloro es de 1 a 15 ppm de dióxido de cloro, preferiblemente de 5 a 10 ppm de dióxido de cloro.
11. El método de la reivindicación 9, en el que el ácido cítrico se usa en una cantidad de al menos 200 ppm en el sistema acuoso.
- 35 12.. El método de la reivindicación 9, en el que el ácido cítrico se usa en una cantidad de al menos 300 ppm en el sistema acuoso.
13. El método de la reivindicación 9, en el que el ácido cítrico se usa en una cantidad de 100 ppm a 6.250 ppm en el sistema acuoso.
- 14.. El método de la reivindicación 9, en el que se añade dióxido de cloro junto con ácido cítrico durante la propagación y/o el acondicionamiento.
- 40

FIG 1.

