

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 385**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06	(2006.01)	C12N 1/22	(2006.01)
C12R 1/865	(2006.01)		
A01N 35/06	(2006.01)		
A01N 49/00	(2006.01)		
A01N 65/08	(2009.01)		
A01N 37/16	(2006.01)		
A01N 37/10	(2006.01)		
A01N 37/02	(2006.01)		
A01P 1/00	(2006.01)		
C12N 1/18	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/028129**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014** **WO14143938**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14719583 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 2971017**

54 Título: **Método para el tratamiento de microorganismos durante la propagación, el acondicionamiento y la fermentación empleando extractos de ácidos del lúpulo y ácido orgánico**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201313833522

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CHAPMAN, JOHN S. y
CONSALO, CORINNE E.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 683 385 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

Método para el tratamiento de microorganismos durante la propagación, el acondicionamiento y la fermentación empleando extractos de ácidos del lúpulo y ácido orgánico

Campo de la invención

- 5 La presente tecnología se refiere en general al control microbiano en procesos de fermentación. En particular, la presente tecnología implica un método para reducir o controlar la concentración de microorganismos indeseables.

Antecedentes de la invención

- 10 Se emplean microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias, para producir una serie de productos de fermentación, tales como etanol de calidad industrial, bebidas espirituosas destiladas, cerveza, vino, productos farmacéuticos y nutracéuticos (productos alimentarios que proporcionan beneficios para la salud, tales como alimentos reforzados y suplementos dietéticos), productos químicos de la industria panadera e industriales.

- 15 De modo habitual se emplean levaduras en los procesos de fermentación. Un tipo habitual de levadura es *Saccharomyces cerevisiae*, la especie que se emplea predominantemente en la fabricación de pan y la fermentación. Igualmente se emplean levaduras que no son *Saccharomyces*, también conocidas como levaduras no convencionales, para fabricar una serie de productos comerciales.

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, emplea hongos y bacterias. Los ejemplos de estos hongos celulolíticos incluyen *Trichoderma reesei* y *Tichoderma viride*. Un ejemplo de una bacteria usada en la producción de etanol celulósico es *Clostridium ljungdahlii*.

- 20 La mayor parte de las levaduras empleadas en las destilerías y en las fábricas de etanol para combustible se adquieren de fabricantes de levaduras especializadas. La levadura se fabrica mediante un proceso de propagación. La propagación implica cultivar una gran cantidad de levaduras a partir de un pequeño cultivo de laboratorio de levadura. Durante la propagación, a las levaduras se les suministra oxígeno, nitrógeno, azúcares, proteínas, lípidos e iones que son necesarios o deseables para el crecimiento óptimo a través de la respiración aerobia.

- 25 Una vez en la destilería, la levadura puede someterse a un acondicionamiento. El acondicionamiento se diferencia de la propagación porque no implica cultivar una gran cantidad de levaduras a partir de un pequeño cultivo de laboratorio. Durante el acondicionamiento se proporcionan las condiciones para rehidratar la levadura, sacarla de la hibernación y dejar que se produzca el máximo crecimiento y reproducción. El objetivo de la propagación y el acondicionamiento es conseguir un gran volumen de levaduras para el tanque de fermentación que tengan una elevada viabilidad, una alta tasa de gemación y un bajo nivel de infección por otros microorganismos.

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

- 35 El proceso de fermentación comienza con la preparación de un carbohidrato fermentable. En la producción de etanol, el maíz es una posible fuente de carbohidrato fermentable. También puede sustituirse por otras fuentes de carbohidratos, que incluyen cereales de grano y materiales que contienen celulosa-almidón, tales como trigo o sorgo. También puede emplearse una biomasa celulósica, tal como paja y tallos de maíz. En fechas recientes, la producción de etanol celulósico ha recibido bastante atención porque emplea una biomasa no alimentaria fácilmente disponible para formar un combustible valioso.

- 40 Los procesos de propagación, acondicionamiento y fermentación pueden realizarse empleando métodos discontinuos o continuos. El proceso discontinuo se emplea para la producción a pequeña escala. Cada lote se completa antes de empezar con otro nuevo. El método de fermentación continuo se emplea para la producción a gran escala porque produce un suministro continuo sin tener que volver a empezar cada vez. Puede utilizarse una mezcla de ácidos del lúpulo y un ácido orgánico en los métodos discontinuos o continuos.

- 45 Durante el proceso de propagación, acondicionamiento o fermentación, la pulpa o la mezcla de fermentación puede contaminarse con otros microorganismos, tales como bacterias de descomposición. Estos microorganismos compiten con la especie deseada de levadura por los azúcares fermentables y retrasan la reacción bioquímica deseada, con lo que se produce un rendimiento menor del producto. También pueden producir subproductos químicos no deseados que pueden provocar la descomposición de lotes enteros de fermentación.

- 50 Los productores de etanol intentan aumentar la cantidad de etanol producido a partir de un celemin de granos de cereales (aproximadamente 56 libras (25,4 kilogramos)). La contaminación con microorganismos disminuye la eficacia de la levadura haciendo que sea difícil lograr o superar los niveles deseados de 2,8-2,9 galones de etanol por celemin (0,42-0,44 litros por kilogramo). La reducción de la concentración de microorganismos estimulará la propagación y/o el acondicionamiento de las levaduras y aumentará la eficacia de las levaduras, haciendo que se

posible lograr y superar estos niveles deseados.

Durante cualquiera de estos tres procesos, las levaduras pueden contaminarse con levaduras no deseadas, bacterias u otros microorganismos indeseables. Esto puede ocurrir en uno de los muchos recipientes empleados en la propagación, el acondicionamiento o la fermentación. Estos incluyen, pero no se limitan a tanques de propagación, tanques de acondicionamiento, tanques de iniciación, tanques de fermentación y tuberías, e intercambiadores de calor entre estas unidades.

La contaminación bacteriana o microbiana reduce el rendimiento del producto de fermentación de tres formas principales. En primer lugar, los azúcares que podrían estar disponibles para que las levaduras produzcan alcohol son consumidos por las bacterias u otros microorganismos indeseables y son desviados de la producción de alcohol, con lo que se reduce el rendimiento. En segundo lugar, los productos finales del metabolismo bacteriano, tales como ácido láctico y ácido acético, inhiben el crecimiento de las levaduras y la fermentación/respiración de las levaduras, lo cual provoca una producción menos eficaz de levaduras. Por último, las bacterias u otros microorganismos indeseables compiten con las levaduras por nutrientes distintos de los azúcares.

Después de que el sistema o recipiente de fermentación se ha contaminado con bacterias u otros microorganismos indeseables, estas bacterias u otros microorganismos pueden crecer con mucha más rapidez que la levadura deseada. Las bacterias u otros microorganismos compiten con la levadura por los azúcares fermentables y retrasan la reacción bioquímica deseada, con lo que se producen un rendimiento menor del producto. Las bacterias también producen subproductos químicos no deseados, que pueden provocar la descomposición de lotes enteros de fermentación. La eliminación de estas bacterias u otros microorganismos indeseables permite que las levaduras deseadas crezcan, lo cual provoca una mayor eficacia de producción.

Una disminución de tan solo 1% en el rendimiento del etanol es muy significativa en la industria del etanol para combustible. En las instalaciones más grandes, esta disminución en la eficacia reducirá las ganancias de un millón a tres millones de dólares anuales.

Algunos métodos para reducir las bacterias u otros microorganismos indeseables durante la propagación, el acondicionamiento y la fermentación aprovechan la mayor tolerancia frente a la temperatura y el pH de las levaduras frente a otros microorganismos. Esto se realiza aplicando calor o disminuyendo el pH de la disolución de levaduras. Sin embargo, estos procesos no son totalmente eficaces para retrasar el crecimiento bacteriano. Además, los microorganismos de levadura deseados, aunque sobreviven, resultan estresados y no son tan vigorosos ni sanos. Así, las levaduras no actúan tan bien.

La tendencia predominante en la industria del etanol es reducir el pH de la pulpa (materia prima) a menos de 4,5 al inicio de la fermentación. La disminución del pH de la pulpa reduce la población de algunas especies de bacterias. Sin embargo, es mucho menos eficaz para reducir las bacterias problemáticas, tales como las bacterias que producen ácido láctico. También reduce significativamente el rendimiento del etanol porque las levaduras empleadas para la producción de etanol se estresan.

Otra estrategia implica lavar las levaduras con ácido fosfórico. Este método no mata las bacterias y otros microorganismos con eficacia. También puede estresar a las levaduras empleadas para la producción de etanol, disminuyendo con ello su eficacia.

Otro método consiste en utilizar calor o productos químicos agresivos para esterilizar el equipo del proceso entre lotes. No es eficaz para matar a las bacterias y otros microorganismos dentro de la mezcla de levaduras durante la producción.

En otro método se añaden antibióticos al lote de propagación, acondicionamiento o fermentación de las levaduras para neutralizar a las bacterias. Las industrias de la fermentación generalmente aplican antibióticos a los procesos de acondicionamiento, propagación y fermentación. Las tasas de dosificación de antibióticos varían entre 0,1 a 3,0 mg/l y, en general, no son mayores que 6 mg/l. Sin embargo, existen problemas con la utilización de antibióticos en el acondicionamiento, la propagación y la fermentación. Los antibióticos son caros y pueden aumentar mucho los costes de la producción a gran escala. Además, los antibióticos no son eficaces contra todas las cepas de bacterias, tales como cepas de bacterias resistentes a antibióticos. El abuso de antibióticos puede conducir a la creación de otros variantes de cepas de bacterias resistentes a antibióticos.

Los restos de antibióticos y el establecimiento de cepas resistentes a antibióticos es un problema global. Estos problemas pueden conducir a una futura acción legislativa contra el uso de antibióticos. Un área preocupante son los granos de destilación que se emplean como pienso animal. Los granos de destilación son el residuo de los granos del proceso de fermentación. Los países europeos no permiten que los subproductos de una fábrica de etanol se comercialicen como pienso animal si se emplean antibióticos en las instalaciones. La venta de los granos de destilación supone hasta 20% de los ingresos de las fábricas de etanol. La concentración de antibióticos en el subproducto puede variar del 1-3% en peso, de modo que se anula esta importante fuente de ingresos.

Además, existen otros problemas a considerar cuando se emplean antibióticos. Las mezclas de antibióticos con frecuencia deben equilibrarse y cambiarse para evitar usos individuales que conduzcan a la aparición de cepas

resistentes a antibióticos. A veces la cantidad eficaz de un 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 son necesarios más de 25 mg/l para inhibir el crecimiento de *Weisella confusa*, una cepa problemática de bacterias emergente. La sobredosis o el abuso de antibióticos puede estresar a las levaduras y afectar a la eficacia o provocar la no observancia de la legislación.

Las industrias que emplean la fermentación para bebidas han aplicado históricamente los ácidos del lúpulo en la propagación y la fermentación para controlar a los microbios no deseados que compiten con la levadura por los nutrientes. Con la reciente expansión del etanol para combustible, los ácidos del lúpulo se han utilizado a pequeño nivel para solucionar el problema de los microbios no deseados. El documento WO 2004/072291 A2, RÜCKLE (International Sugar Journal, 2006, 108(1287), 139-147) y ARUNACHALAM MUTHAIYAN (Progress in Energy and Combustion Science, 2011, vol. 37, n.º 3, 351-370) describen método para controlar especies de *Lactobacillus* en procesos de fermentación empleando ácidos del lúpulo. Los documentos SU 1463747 A1 y AU 2012201464 A1 describe procesos de fermentación que emplean levaduras en presencia de lúpulo y ácido cítrico. El documento US 6326185 B1 describe un método para reducir el número de bacterias productoras de ácido láctico en levaduras empleando al menos 40 ppm de ácidos del lúpulo y ácido cítrico hasta alcanzar un pH 2,0-2,6.

La competición entre las levaduras y los microbios no deseados produce una pérdida de rendimiento del etanol para combustible, puesto que los microbios no deseados, principalmente *Lactobacillus* y *Acetobacter*, reducen la eficacia de la fermentación. En la producción de bebidas, los microbios competitivos no solo reducen la eficacia, sino que también pueden alterar la estética y el sabor del producto final.

Los ácidos orgánicos tienen muchas aplicaciones, que incluyen sus usos como acidificantes, tampones, antioxidantes, quelantes, sinérgicos, suplementos dietéticos, agentes aromatizantes, conservantes y antimicrobianos. Los ácidos orgánicos se han empleado como conservantes debido a su efecto sobre las bacterias. El modo de acción del ácido orgánico consiste en que los ácidos no disociados penetran a través de la pared celular bacteriana mediante difusión pasiva y alteran la fisiología normal de la célula de dos formas. Los ácidos se disocian y, así, disminuyen el pH interno, que normalmente es cercano a la neutralidad, lo cual dificulta la función de la bacteria. La parte aniónica del ácido, que no puede salir de la célula en su forma disociada, se acumula en el interior, alterando las funciones metabólicas y aumentando la presión osmótica. Sin embargo, el documento US 2004/033289 A1, Arto Visti (Food Research International, 2003, 36(6), 597-602) y A. ULLAH (Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(23), 8377-8387) indican que el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido sórbico y el ácido benzoico inhiben el crecimiento de levaduras.

Puesto que una pequeña disminución en el rendimiento del etanol es muy importante para la industria del etanol para combustible, los productores de etanol constantemente están buscando formas de aumentar la eficacia. Se emplean antimicrobianos para eliminar, reducir o controlar de otro modo el número de microbios en los sistemas acuosos. Sin embargo, el uso de antimicrobianos siempre añadirá un coste a las operaciones y los productos y, por tanto, se buscan formas más eficaces para lograr el control microbiano. Además, algunos antimicrobianos pueden presentar deficiencias en su espectro de acción antimicrobiana o tienen limitaciones operativas en su forma de aplicación, tales como falta de estabilidad térmica o susceptibilidad a la inactivación por factores ambientales o químicos.

Breve descripción de la figuras

La figura 1 es una gráfica que muestra las concentraciones bacterianas en momentos del tiempo después de la adición de antimicrobianos y al final de la fermentación (64 horas).

La figura 2 es una gráfica que muestra el rendimiento promedio de etanol según el tratamiento, expresado como gramos de etanol por gramos de maíz seco.

La figura 3 es una gráfica que muestra el control del ácido acético en diversas fermentaciones en un ensayo en planta.

La figura 4 es una gráfica que muestra el control del ácido láctico en diversas fermentaciones en un ensayo en planta.

La figura 5 es una gráfica que muestra el control del glicerol en diversas fermentaciones en un ensayo en planta.

Descripción de la invención

Mediante la combinación de un ácido orgánico y ácidos del lúpulo en el acondicionamiento, la propagación y la fermentación, se ha determinado que no solo los ácidos del lúpulo son compatibles con el ácido orgánico, sino que son sinérgicos cuando se aplican ambas tecnologías simultáneamente. La combinación de estos productos proporciona un tratamiento antimicrobiano poderoso sin antibióticos. La invención puede emplearse para reducir la concentración de microorganismos indeseables, para estimular la propagación de microorganismos deseables y para aumentar la eficacia de los microorganismos deseables en un sistema acuoso.

Tal como se emplea en la presente, los ppm se miden 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 emplea en la presente, la expresión "ácido orgánico" también se refiere a su sal. Por ejemplo, cuando se emplea la expresión ácido cítrico, esta incluye la forma de sal del ácido cítrico. Cualquier referencia a un ácido orgánico incluye la referencia a su sal.

Las expresiones "ácidos del lúpulo" y "extracto de ácidos del lúpulo" se emplean de modo intercambiable.

En un aspecto de la invención, definido en la reivindicación 1, se describe un método para controlar la concentración de microorganismos indeseables en un sistema acuoso empleado en un proceso de fermentación. El método comprende las etapas de:

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

(b) introducir al menos una levadura en dicho sistema;

(c) introducir un extracto de ácidos del lúpulo en dicho sistema; y

(d) introducir al menos un ácido orgánico, o una de sus sales en dicho sistema,

en el que el microorganismo indeseable es una bacteria productora de ácido láctico y el ácido orgánico es ácido cítrico.

La reducción del subproducto residual de antibiótico en un proceso de fermentación puede lograrse empleando los métodos de la invención descritos en la presente. Cuando se emplean los métodos de la invención, puede emplearse menos antibiótico o no emplearse antibiótico en el proceso de fermentación, con lo que se producen menos subproductos.

El presente método para reducir la concentración de microorganismos indeseables, para estimular la propagación de microorganismos deseables y para aumentar la eficacia de los microorganismos deseables en un sistema acuoso comprende (a) introducir un carbohidrato fermentable en un sistema acuoso, (b) introducir al menos una levadura en el sistema acuoso, y (c) poner en contacto un extracto de ácidos del lúpulo y un ácido orgánico con el carbohidrato fermentable y/o la levadura. El ácido orgánico es ácido cítrico.

Estas etapas de la invención pueden realizarse de modo secuencial o en un orden diferente. Los ácidos del lúpulo y el ácido orgánico pueden ponerse en contacto con la levadura o con el carbohidrato de fermentación, o la levadura y el carbohidrato fermentable pueden combinarse y después los ácidos del lúpulo y el ácido orgánico pueden introducirse en la combinación de levadura y carbohidrato. El extracto de ácidos del lúpulo y dicho al menos un ácido orgánico pueden mezclarse y después añadirse 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.

Otra realización no limitante del presente método para reducir la concentración de microorganismos indeseables, para estimular la propagación de microorganismos deseables y para aumentar la eficacia de los microorganismos deseables en un sistema acuoso comprende (a) introducir una cantidad de un carbohidrato fermentable en un sistema acuoso, (b) introducir una cantidad de una levadura en el sistema acuoso, y (c) poner en contacto un extracto de ácidos del lúpulo y al menos ácido cítrico con el carbohidrato fermentable y/o la levadura. Estas etapas pueden realizarse de modo secuencial o en un orden diferente. El extracto de ácidos del lúpulo y dicho al menos ácido cítrico pueden mezclarse y después añadirse al sistema acuoso, o pueden añadirse por separado al sistema acuoso.

En el anterior método, los microorganismos "indeseables" que se quieren reducir son los que compiten por los nutrientes con los microorganismos deseables que estimulan los procesos de fermentación deseados, y estos son bacterias productoras de ácido láctico ("lactic acid producing bacteria", LAB), de las cuales *Lactobacillus* es un notable representante. A este respecto, el extracto de ácidos del lúpulo y el ácido orgánico empleados en el presente método no afectan de modo perjudicial al crecimiento y la viabilidad de los microorganismos estimulantes de la fermentación deseables, pero sí eliminan o suprimen el crecimiento de microorganismos indeseables que interfieren con el proceso de fermentación. Además, la eliminación o la supresión de los microorganismos indeseables tiene un efecto favorable sobre el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos deseables.

El pH del sistema acuoso que se va a tratar es, en general, 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 actúan mejor en sistemas en los que el pH del sistema es menor que al menos uno de los valores de pKa del ácido o su sal.

El ácido orgánico empleado en la presente invención es el ácido cítrico y sus sales. Para los fines de esta invención, el ácido orgánico no es un ácido del lúpulo.

Los ejemplos no limitantes de ácidos del lúpulo que pueden emplearse en la invención incluyen compuestos de beta-

ácidos, alfa-ácidos, alfa-ácidos isomerizados, alfa-ácidos rho-isomerizados, alfa-ácidos tetra-isomerizados, alfa-ácidos hexa-isomerizados y hojas de lúpulo. En la invención pueden emplearse unas dosificaciones del extracto de ácidos del lúpulo en el sistema acuoso que se está tratando de al menos 0,5 ppm y menos de 120 ppm, o entre 1 ppm y 100 ppm, o entre 2 y 70 ppm, o entre 5 y 50 ppm, o entre 5 y 45 ppm. En la invención pueden emplearse unas dosificaciones del extracto de ácidos del lúpulo de al menos 0,5 ppm, o entre 2 y 15 ppm, o entre 5 y 15 ppm, o entre 5 y 10 ppm.

En algunas realizaciones no limitantes, la disolución sinérgica está formada por extractos de ácidos del lúpulo y ácido cítrico o su sal en unas proporciones de 1:10 a 1:6500, o de 1:15 a 1:6400, de 1:20 a 1:6400, o de 1:20 a 1:1600, o de 1:25 a 1:500, o de 1:25 a 1:100, o de 1:10 a 1:200.

Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico pueden añadirse en una única localización o en múltiples localizaciones en el proceso de fermentación, que incluyen el tanque o tanques de suspensión, los recipientes de cocción, los enfriadores de la pulpa, los propagadores y los tanques de fermentación. Los expertos en la técnica también pueden determinar otros puntos de adición. Los ácidos del lúpulo y los ácidos orgánicos pueden añadirse a un recipiente del proceso, tal como un tanque de acondicionamiento que puede calentarse, capaz de realizar la licuación, o un recipiente de propagación de las levaduras. El recipiente del proceso también puede ser un tanque de fermentación.

En el presente método, las concentraciones de bacterias y otros microorganismos indeseables se reducen, al mismo tiempo que se estimula la propagación y/o el acondicionamiento de los microorganismos deseables.

Se ha descubierto que los extractos de ácidos del lúpulo, en combinación con al menos un ácido orgánico, son eficaces para reducir la concentración de bacterias y otros microorganismos indeseables, y simultáneamente estimulan la propagación y/o el acondicionamiento de los microorganismos deseables. La combinación de estos productos proporciona un tratamiento antimicrobiano sinérgico sin el uso de antibióticos.

Se ha descubierto que la adición de una pequeña cantidad de extracto de ácidos de lúpulo, por ejemplo, aproximadamente 0,5 ppm y menos de 120 ppm (medidos en el sistema que se está tratando), o entre 1 ppm y 100 ppm, o entre 2 y 70 ppm, o entre 5 y 50 ppm, o entre 5 y 45 ppm, o de 5-10 ppm, junto con al menos el ácido cítrico produce un efecto sinérgico. En algunas realizaciones no limitantes, los ácidos del lúpulo se añaden simultáneamente con el ácido cítrico. En otras realizaciones, los ácidos del lúpulo se añaden por separado del ácido cítrico al sistema que se está tratando. La adición de los extractos de ácidos del lúpulo junto con la adición del ácido cítrico produce una mejor eficacia antimicrobiana.

Se emplea como ejemplo la producción de etanol para combustible mediante la fermentación de levaduras. Sin embargo, esto es simplemente una ilustración. Otros productos de fermentación que pueden emplear la combinación de ácidos del lúpulo y ácido cítrico pueden incluir bebidas espirituosas destiladas, cerveza, vino, productos farmacéuticos, intermedios de productos farmacéuticos, productos de panadería, nutracéuticos (productos alimentarios que proporcionan beneficios para la salud, tales como alimentos reforzados y suplementos dietéticos), intermedios de nutracéuticos, materias primas químicas industriales y enzimas. El presente método también puede utilizarse para tratar las levaduras empleadas en la industria panadera.

Las levaduras *Saccharomyces* son un tipo de levadura útil, tal como *Saccharomyces cerevisiae*. En la invención también pueden emplearse levaduras que no son *Saccharomyces*. También se divulga que puedan utilizarse otros microorganismos fermentadores deseables y que estos puedan beneficiarse de la invención, tales como los hongos y las bacterias que generalmente se emplean en la producción de etanol celulósico. Algunos ejemplos no limitantes de microorganismos fermentadores deseables incluyen, pero no se limitan a *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, y *Clostridium ljungdahlii*.

Los extractos de ácidos del lúpulo son útiles para matar bacterias, al mismo tiempo que permiten que las levaduras sobrevivan y crezcan. Las industrias de la fermentación generalmente aplican extractos de ácidos del lúpulo en la propagación y la fermentación.

Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico pueden añadirse en diversos puntos en los procesos de propagación, acondicionamiento y/o fermentación. Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico pueden añadirse a recipientes de cocción, tanques de fermentación, tanques de propagación, tanques de acondicionamiento, tanques de iniciación o durante la licuación. Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico también pueden añadirse directamente a la pulpa de maíz. Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico también pueden añadirse al sistema de intercambio de calor entre etapas o a los intercambiadores de calor. Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico también pueden añadirse a las tuberías entre estas unidades o intercambiadores de calor.

Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico pueden añadirse directamente a la mezcla de fermentación. Esto puede realizarse añadiendo los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico junto con la levadura u otros microorganismos deseables y el carbohidrato fermentable, por ejemplo, durante la etapa de SSF ("simultaneous saccharification and fermentation", sacarificación y fermentación simultáneas).

En una realización no limitante, las dosificaciones del extracto de ácidos del lúpulo de al menos 0,5 ppm y menos de 120 ppm, o entre 1 ppm y 100 ppm, o entre 2 y 70 ppm, o entre 5 y 50 ppm, o entre 5 y 45 ppm, o una dosificación

de entre 2 y 15 ppm, o una dosificación de entre 3 y 10 ppm, o una dosificación de entre 5 y 10 ppm, y unas dosificaciones del ácido orgánico de entre 100 y 2000 ppm o mayores, o de entre 200 y 1000 ppm pueden añadirse directamente a la mezcla de fermentación.

5 Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico también pueden añadirse a la pulpa antes del proceso de fermentación. Las dosificaciones del extracto de ácidos del lúpulo de al menos 0,5 ppm y menos de 120 ppm, o entre 1 ppm y 100 ppm, o entre 2 y 70 ppm, o entre 5 y 50 ppm, o entre 5 y 45 ppm, o entre 2 y 15 ppm, o entre 5 y 15 ppm, o entre 5 y 10 ppm, y unas dosificaciones del ácido cítrico de entre 100 y 2000 ppm o mayores, pueden añadirse a la pulpa antes de la fermentación.

10 Los ácidos del lúpulo y el ácido cítrico también pueden añadirse durante la propagación y/o el acondicionamiento. Por ejemplo, los extractos de ácidos del lúpulo pueden añadirse a la suspensión de levaduras reemplazando a una etapa de lavado con ácidos.

15 También se divulga que los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, puedan utilizarse para lograr mejores resultados en la producción de etanol celulósico. El etanol celulósico es un tipo de etanol que se produce a partir de celulosa, en oposición a los azúcares y almidones empleados en la producción de etanol basada en carbohidratos. La celulosa está presente en fuentes de biomasa no tradicionales, tales como pasto varilla, rastrojos de maíz y silvicultura. Este tipo de producción de etanol es particularmente atractiva debido a la enorme disponibilidad de fuentes de celulosa. El etanol celulósico, por la naturaleza de la materia prima, introduce unos niveles mayores de contaminantes y microorganismos competitivos en el proceso de fermentación. Los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, pueden utilizarse en la producción de etanol celulósico para controlar a los microorganismos indeseables.

20 Existen dos procesos principales para producir alcohol a partir de celulosa. Un proceso es un proceso de hidrólisis que emplea hongos, como por ejemplo, *Trichoderma reesei* y/o *Trichoderma viride*. El otro es un proceso de gasificación que emplea bacterias, tales como *Clostridium ljungdahlii*. Los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, pueden utilizarse en cualquiera de los procesos.

25 En el proceso de hidrólisis, las cadenas de celulosa se descomponen en azúcares de cinco carbonos y de seis carbonos antes del proceso de fermentación. Esto se hace de modo químico o enzimático.

30 En el método de hidrólisis química, la celulosa puede tratarse con un ácido diluido a alta temperatura y presión o con ácido concentrado a menor temperatura y presión atmosférica. En el proceso de hidrólisis química, la celulosa reacciona con el ácido y agua para formar moléculas de azúcares individuales. Estas moléculas de azúcares después se neutralizan, y se emplea la fermentación con levaduras para producir etanol. Los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, pueden utilizarse durante la porción de fermentación con levaduras de este método.

35 La hidrólisis enzimática puede realizarse empleando dos métodos. El primero se conoce como conversión microbiana directa ("direct microbial conversion", DMC). El método de DMC emplea un único microorganismo para convertir la biomasa celulósica en etanol. El etanol y las enzimas necesarias son producidos por el mismo microorganismo. Los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, pueden utilizarse durante las etapas de propagación/acondicionamiento o fermentación con este organismo especializado.

40 El segundo método se conoce como método de hidrólisis enzimática, y en este método las cadenas de celulosa se descomponen empleando enzimas celulasas. Estas enzimas generalmente están presentes en el estómago de rumiantes, tales como vacas y ovejas, para descomponer la celulosa que comen. El método enzimático generalmente se realiza en cuatro o cinco etapas. La celulosa se pretrata para hacer que la materia prima, tal como madera o paja, sea más susceptible a la hidrólisis. Después se emplean las enzimas celulasas para descomponer las moléculas de celulosa en azúcares fermentables. Después de la hidrólisis, los azúcares se separan de los materiales residuales y se añaden a las levaduras. Los azúcares hidrolizados se fermentan en etanol empleando las levaduras. Por último, el etanol se recupera mediante destilación. Como alternativa, la hidrólisis y la fermentación pueden realizarse al mismo tiempo empleando bacterias u hongos especiales que lleven a cabo ambos procesos. Cuando ambas etapas se realizan al mismo tiempo, el proceso se denomina hidrólisis y fermentación secuencial ("sequential hydrolysis and fermentation", SHF).

50 Los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, puedan introducirse para conseguir la eficacia microbiológica en diversos puntos del método enzimático de hidrólisis. Los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, pueden utilizarse durante la producción, la fabricación y la fermentación de enzimas celulasas producidas por *Trichoderma* y otras cepas fúngicas. Los ácidos del lúpulo y el ácido orgánico pueden añadirse a la fase de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) celulósica. Los ácidos del lúpulo y el ácido orgánico pueden introducirse en la fase de hidrólisis y fermentación secuencial (SHF). También pueden introducirse en un momento anterior, durante o después de la fermentación por hongos celulolíticos que crean las enzimas celulasas. Como alternativa, los ácidos del lúpulo, junto con el ácido orgánico, puedan añadirse durante la fase de fermentación con levaduras, tal como se analizó anteriormente.

El proceso de gasificación no descompone la cadena de celulosa en moléculas de azúcares. En primer lugar, el carbono en la celulosa se convierte en monóxido de carbono, dióxido de carbono e hidrógeno en una reacción de

combustión parcial. Después el monóxido de carbono, el dióxido de carbono y el hidrógeno se introducen en un fermentador especial que emplea un microorganismo, tal como *Clostridium ljungdahlii*, que es capaz de consumir el monóxido de carbono, el dióxido de carbono y el hidrógeno para producir etanol y agua. Por último, el etanol se separa del agua en una etapa de destilación. Los ácidos del lúpulo y el ácido orgánico pueden emplearse como agente antimicrobiano en la etapa de fermentación que implica a microorganismo, tal como *Clostridium ljungdahlii*, que es capaz de consumir el monóxido de carbono, el dióxido de carbono y el hidrógeno para producir etanol y agua.

Por ejemplo, los ácidos del lúpulo y el ácido orgánico se añaden a un tanque y se diluyen hasta una concentración predeterminada a una proporción predeterminada. En el tanque, el extracto de ácidos del lúpulo, tal como un extracto alfa-isomerizado, y un ácido orgánico, concretamente el ácido cítrico, se disuelven en agua para formar una mezcla de ácidos del lúpulo y ácido orgánico. La concentración de la disolución del extracto de ácidos del lúpulo y la disolución del ácido orgánico en el tanque de proceso discontinuo puede variar a través de un amplio intervalo. La disolución de extracto de ácidos del lúpulo/ácido orgánico mezclada después sale del tanque de proceso discontinuo a través de un puerto de salida a una dosificación especificada para crear una disolución con la concentración deseada.

Por ejemplo, la proporción de ácidos del lúpulo al ácido orgánico es una proporción de 1:200 a 1:10. El tanque generalmente es un tanque de premezcla.

Un recipiente del proceso que contiene una disolución acuosa de microorganismos está en conexión fluida con el tanque de proceso discontinuo mediante puertos de salida del tanque de proceso discontinuo. El recipiente del proceso puede ser un recipiente de cocción, un tanque de fermentación, un tanque de acondicionamiento, un tanque de iniciación, un tanque de propagación, un recipiente de licuación y/o las tuberías o el intercambiador de calor entre estas unidades. La disolución de extractos de ácidos del lúpulo/ácido orgánico en el recipiente del proceso es capaz de estimular la propagación del microorganismo productor presente, al mismo tiempo que disminuye simultáneamente la concentración de microorganismos indeseables.

Para la producción a menor escala de productos de fermentación, un equipo montado en una plataforma rodante es ideal. La plataforma rodante permite fabricar el equipo en otro sitio, para enviarse después a la localización deseada y allí ser instalado con facilidad. Esto permite una facilidad del transporte, y un montaje y puesta en marcha más rápidos. El tanque de proceso discontinuo, el recipiente del proceso y el equipo de conexión pueden fabricarse de un modo que emplea una plataforma rodante.

Los ácidos del lúpulo y el ácido orgánico pueden combinarse y después añadirse al sistema que se va a tratar. También pueden añadirse de modo secuencial o por separado al sistema que se va a tratar. La proporción de ácidos del lúpulo a ácido orgánico que se añade a los sistemas que se van a tratar puede ser tan alta como de 1:6000 a 1:5, o de 1:6000 a 1:10, o de 1:500 a 1:10, o de 1:200 a 1:20, o de 1:100 a 1:10, o de 1:100 a 1:20.

El ácido orgánico puede emplearse en cantidades de 12500 ppm hasta 100 ppm en la invención, de 6250 hasta 100 ppm, o de 4000 hasta 100 ppm, o de 4000 hasta 200 ppm, o de 1000 hasta 100 ppm, o de 1000 hasta 200 ppm. En general, se emplean al menos 100 ppm o al menos 200 ppm o al menos 300 ppm del ácido orgánico. Los ácidos del lúpulo pueden emplearse en cantidades de al menos 0,5 ppm y menos de 120 ppm, o entre 1 ppm y 100 ppm, o entre 2 y 70 ppm, o entre 5 y 50 ppm, o entre 5 y 45 ppm, o de 0,5 ppm a 20 ppm, o de 0,5 ppm a 15 ppm, o de 2 a 15 ppm, o de 2 a 12 ppm, o de 3 a 12 ppm, o de 3 a 10 ppm. En general, la cantidad de ácidos del lúpulo utilizada en la invención es al menos 2 ppm o al menos 3 ppm. Los componentes (ácidos del lúpulo y ácido orgánico) pueden añadirse al sistema acuoso por separado o pueden mezclarse antes de la adición. Los ácidos orgánicos pueden añadirse a los sistemas laterales acuosos con otros aditivos, tales como, pero sin limitarse a tensioactivos, compuestos para el control de incrustaciones y de la corrosión, polímeros iónicos o no iónicos, agentes de control de pH y otros aditivos empleados para alterar o modificar la química del sistema acuoso.

Los expertos en la técnica pueden determinar, empleando las indicaciones descritas en la presente, la concentración de la composición necesaria para lograr un control microbiano aceptable, y esa concentración depende de la matriz.

Cuando se emplean en un sistema de fermentación, los ácidos pueden añadirse en diversas localizaciones del sistema de fermentación, tal como pueden añadirse en una única localización o en múltiples localizaciones en el proceso de fermentación, que incluyen el tanque o tanques de suspensión, los recipientes de cocción, los enfriadores de la pulpa, los propagadores y los tanques de fermentación. Los expertos en la técnica también pueden determinar otros puntos de adición.

Ejemplos

Los índices de sinergia indicados en los siguientes ejemplos emplean la siguiente fórmula, que fue divulgada 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 = $Q_a Q_A + Q_b Q_B$

en la que Q_a es la concentración de antimicrobiano A necesaria para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se emplea en combinación con el antimicrobiano B;

Q_A es la concentración de antimicrobiano A necesaria para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se emplea por sí solo;

- 5 Q_b es la concentración de antimicrobiano B necesaria para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se emplea en combinación con el antimicrobiano A;

Q_B es la concentración de antimicrobiano B necesaria para lograr la inhibición completa del crecimiento del microbio de ensayo cuando se emplea por sí solo.

- 10 Un índice de sinergia (SI) de 1 indica que las interacciones entre los dos antimicrobianos son meramente aditivas, un SI mayor que uno indica que los dos antimicrobianos son antagonistas entre sí, y un SI menor que 1 indica que los dos antimicrobianos interactúan de modo sinérgico.

En los siguientes ejemplos, el criterio de valoración empleado para medir los niveles de actividad antimicrobiana se conoce como concentración mínima inhibidora ("Minimal Inhibitory Concentration", o MIC). Es la concentración más baja de una sustancia o sustancias que puede lograr la inhibición completa del crecimiento.

- 15 Para determinar la concentración mínima inhibidora, se construye una dilución en serie en dos veces del antimicrobiano, haciéndose las diluciones en medio de crecimiento. Las diluciones se realizan en una microplaca de 96 pocillos, de modo que cada pocillo tiene un volumen final de 280 μ l de medio y antimicrobiano. El primer pocillo tiene, por ejemplo, una concentración de 1000 ppm del antimicrobiano, el segundo de 500 ppm, el tercero de 250 ppm, etc., y el 12º y último pocillo de la fila no contiene antimicrobiano y actúa como control de crecimiento positivo.
- 20 Después de construir la dilución en serie, los pocillos reciben un inóculo del microbio suspendido en medio de crecimiento, de modo que la concentración final de microbios en el pocillo es de aproximadamente 5×10^5 cfu/ml. En estos ejemplos, el microbio de ensayo empleado es *Lactobacillus plantarum*. Los cultivos se incuban a 37 °C durante 18-24 horas, y los pocillos se puntúan como positivos o negativos para el crecimiento basándose en un examen visual para detectar pocillos turbios, siendo la turbidez un indicador del crecimiento. La concentración más baja de
- 25 antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento (por ejemplo, un pocillo transparente) se denomina concentración mínima inhibidora.

- Para determinar si la interacción entre dos antimicrobianos es aditiva, antagónica o sinérgica contra un microbio diana, se emplea una modificación del método MIC, conocido como método de "tablero de ajedrez", usando microplacas de 96 pocillos. Para construir una placa de tablero de ajedrez, se disminuye el contenido en el primer
- 30 antimicrobiano empleando el método de dilución en serie en dos veces para construir una placa de MIC, excepto que cada una de las ocho filas es una dilución en serie idéntica que termina después de la octava columna. Se disminuye el contenido en el segundo antimicrobiano añadiendo volúmenes idénticos de una dilución en serie en dos veces en los ángulos derechos a la primera serie. El resultado es que cada pocillo del cuadrado de 8 x 8 pocillos tiene una combinación diferente de concentraciones de antimicrobiano, que produce 64 combinaciones diferentes en total. Las columnas 9 y 10 no reciben antimicrobiano y actúan como controles del crecimiento positivo y negativo,
- 35 respectivamente. Después de construir la microplaca de tablero de ajedrez, esta se inocula con *Lactobacillus plantarum*, se incuba a 37 °C, y se puntúa como se describió para el método MIC.

Ejemplo 1: Sinergia del ácido cítrico con los ácidos del lúpulo

- Se determinaron las concentraciones mínimas inhibidoras para el ácido cítrico y los ácidos del lúpulo a pH 6 empleando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como microbio de ensayo. Se
- 40 construyeron placas de sinergia de tablero de ajedrez como se describió, los pocillos se inocularon hasta una concentración final de aproximadamente 5×10^5 cfu/ml, se incubaron durante 18-24 horas y después se puntuaron visualmente para el crecimiento/no crecimiento. Se calcularon los índices de sinergia según la fórmula descrita por Kull *et al.* Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar el ácido cítrico y los ácidos del lúpulo es mayor que el
- 45 efecto de cualquiera de los antimicrobianos por sí solo. La cantidad de ácido cítrico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano se reduce de 100.000 ppm a 391-12.500 ppm. La concentración de los ácidos del lúpulo disminuye de 31,3 ppm a un intervalo de 1,96-15,6 ppm.

Tabla 1

Empleado por sí solo		Empleado en combinación			
MIC del ácido cítrico, (QA) ppm	MIC de los ácidos del lúpulo, (QB) ppm	MIC del ácido cítrico, (Qa) ppm	MIC de los ácidos del lúpulo, (Qb) ppm	Proporción ácido cítrico:ácidos del lúpulo	Índice de sinergia
100000	31,3	12500	1,96	6378:1	0,188
100000	31,3	6250	3,91	1598:1	0,187
100000	31,3	3125	7,81	400:1	0,281
100000	31,3	1563	7,81	200:1	0,265
100000	31,3	781	15,6	50:1	0,506
100000	31,3	391	15,6	25:1	0,502

Ejemplo 2 (no según la invención): Sinergia del ácido benzoico con los ácidos del lúpulo

- 5 Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitoras para el ácido benzoico y los ácidos del lúpulo a pH 6 empleando el protocolo descrito anteriormente con *Lactobacillus plantarum* como microbio de ensayo. Se construyeron placas de sinergia de tablero de ajedrez como se describió, los pocillos se inocularon hasta una concentración final de aproximadamente 5×10^5 cfu/ml, se incubaron durante 18-24 horas y después se puntuaron visualmente para el crecimiento/no crecimiento. Se calcularon los índices de sinergia según la fórmula descrita por Kull *et al.* Este ejemplo demuestra que el efecto de combinar el ácido benzoico y los ácidos del lúpulo es mayor que el efecto de cualquiera de los antimicrobianos por sí solo.

Tabla 2

Empleado por sí solo		Empleado en combinación			
MIC del ácido benzoico, (QA) ppm	MIC de los ácidos del lúpulo, (QB) ppm	MIC del ácido benzoico, (Qa) ppm	MIC de los ácidos del lúpulo, (Qb) ppm	Proporción ácido benzoico:ácidos del lúpulo	Índice de sinergia
100000	31,3	50000	1,96	25510:1	0,563
100000	31,3	25000	1,96	12755:1	0,313

Ejemplo 3: Datos de laboratorio de fermentación

- 15 Se realizaron evaluaciones en the National Corn-to-Ethanol Research Center, empleando extractos de ácidos del lúpulo y ácido cítrico. Las muestras ensayadas y sus concentraciones pueden encontrarse en la figura 1 y la tabla 3. Los ensayos se realizaron para evaluar los efectos de antimicrobianos binarios sobre la producción de etanol en pulpa de maíz producida bajo condiciones que son similares a las que se emplean en la industria del etanol para combustible. Se investigaron dos efectos específicos: (1) la capacidad de los antimicrobianos para afectar al rendimiento del etanol y la conversión de azúcares en fermentaciones que están contaminadas por bacterias de ácido láctico, y (2) la capacidad de los antimicrobianos para controlar infecciones bacterianas comparado con fermentaciones sin bacterias control. Se prepararon tres suspensiones de 160 gramos de harina de maíz, agua y enzima (al 30% en p/p de sólidos secos) para cada tratamiento y control (inoculado y no inoculado). Las suspensiones se incubaron durante 90 minutos a 83 °C, se enfriaron hasta 40 °C, y después se inocularon con *L. plantarum*. Después las suspensiones se dosificaron con antimicrobiano. En las instalaciones se introdujeron dióxido de cloro, extractos de ácidos del lúpulo y ácido cítrico en matraces Erlenmeyer de 250 ml, y las muestras se recolectaron a los 15, 30 y 60 minutos después de la adición del antimicrobiano. Después se recogieron muestras en 3 momentos, se ajustó el pH de la pulpa a <5,2 mediante la adición de 300 µl de ácido 5-N sulfúrico. Todas las enzimas, los nutrientes y otras rectificaciones añadidos a los matraces de fermentación fueron preparados frescos antes del uso. Se añadió urea como una disolución estéril de 0,2 g/ml hasta una concentración final de 500 ppm (en p/p) basado en el contenido en nitrógeno de la urea (en p/p, basado en la masa total de la pulpa). Se preparó la enzima glucoamilasa (Spirizyme Excel, Novozymes) como una disolución 0,25 g/ml y se añadió a una dosis de 0,066% (en p/p, basado en el peso húmedo del maíz). Se añadió agua estéril para igualar el contenido total en

sólidos de cada tratamiento. Todos los matraces de fermentación se inocularon con una suspensión 0,2 g/ml de levaduras (*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 levaduras para lograr una concentración inicial de 1×10^7 células de levadura/ml. La masa de cada matraz se registró después de realizar todas las adiciones, después se insertaron trampas de fermentación desinfectadas dentro de cada matraz y se volvieron a pesar. Los matraces se incubaron a 32 °C con agitación a 170 rpm en un incubador/agitador durante un total de 64 horas. El avance de la fermentación se controló pesando periódicamente los matraces de fermentación durante la incubación de 3 días (a las 0, 17,5, 22,5, 42,5, 48, y 64 horas después de la inoculación con la levadura). Las concentraciones de los sustratos (glucosa, DP2, DP3, y DP4+, en los que "DPx" representa a los oligómeros de glucosa con "x" subunidades) y de los productos (etanol, glicerol, ácido láctico y ácido acético) se midieron mediante HPLC al final de la fermentación. Las muestras se prepararon para una HPLC mediante una centrifugación para eliminar los sólidos más grandes, seguida de una filtración a través de filtros de jeringa de 0,45 µm y una acidificación hasta un pH de aproximadamente 2 mediante la adición de ácido sulfúrico hasta una concentración final de 0,01 N. El pH final, las concentraciones de sólidos secos totales y de sólidos secos disueltos, y la densidad del filtrado de cerveza se midieron después de una incubación durante 64 horas. Las muestras de cada matraz se cultivaron en placa para los recuentos de colonias bacterianas.

Tabla 3

Tiempo (horas)	Control ($\times 10^6$ cfu)	5 lúpulo/200 cítrico ($\times 10^6$ cfu)	5 lúpulo/400 cítrico ($\times 10^6$ cfu)	10 lúpulo/400 cítrico ($\times 10^6$ cfu)
0,25	1,30	1,30	1,01	0,745
0,5	0,9	1,14	1,19	0,535
1	3,47	10,7	5,28	3,19
64	0,0334	0,00424	0,00208	0,0000167

Este ejemplo demuestra que, durante la fermentación, 5 ppm de ácidos del lúpulo combinados con 200 ppm de ácido cítrico son eficaces para reducir el número de bacterias, lo cual es una cantidad sorprendentemente baja. La combinación de 5 ppm de ácidos del lúpulo con 400 ppm de ácido cítrico produjo resultados aún mejores. La mezcla sinérgica de 10 ppm de ácidos del lúpulo/400 ppm de ácido cítrico produjo una reducción en aproximadamente 3 unidades logarítmicas (reducción del 99,9%) en *Lactobacillus*.

La figura 2 y la tabla 4 muestran los rendimientos promedio 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 ($P = 0,055$) empleando ANOVA. En la figura 2 y la tabla 4, los datos representan el promedio de tres matraces de fermentación por duplicado independientes.

Tabla 4

Dosificación de lúpulo/ácido cítrico	Rendimiento de etanol
Control sin infección	0,421
5 ppm de lúpulo/200 ppm de ácido cítrico	0,427
5 ppm de lúpulo/400 ppm de ácido cítrico	0,422
10 ppm de lúpulo/400 ppm de ácido cítrico	0,429

El rendimiento promedio de etanol para los tratamientos se expresa como gramos de etanol por gramos de maíz seco.

Ejemplo 4: Datos del ensayo en planta

Se realizó una evaluación a escala de planta en una instalación de producción de etanol de 55 millones de galones anuales (208197648,12 litros) para evaluar los efectos del antimicrobiano binario formado por los ácidos del lúpulo/ácido cítrico sobre la producción de etanol. La planta utiliza una mezcla de 50% de maíz/50% de sorgo (milo) como materia prima. Las concentraciones y proporciones de los ácidos del lúpulo al ácido cítrico ensayadas se encuentran en la tabla 5. Se investigaron tres efectos específicos durante este ensayo: (1) el efecto sobre los niveles de glicerol, (2) el efecto sobre los niveles de ácido láctico, y (3) el efecto sobre los niveles de ácido acético. En la planta se construye un propagador de proceso discontinuo aproximadamente cada 17 horas para entregarlo al comienzo de una etapa de carga de fermentación/SSF (sacarificación y fermentación simultáneas). En la hora 1 se

empezó a llenar el recipiente de propagación hasta un volumen de trabajo de 47317,6 l (12.500 galones) con 15% de sólidos de la pulpa y se añaden 45,4 kg (100 libras) de urea en este momento. En la hora 2 se añaden 11,4 l (3 galones) de Provia (una proteasa diseñada para mezclas de sorgo) y 30 kg de Beta-Tec (Vita-Hop) a través del tanque de disparo cuando el propagador está lleno al 67%. En la hora 3 se añade el extracto de isoácidos del lúpulo a través de la parte superior del recipiente de propagación (la cantidad varía, véase la tabla 5). Después se añadieron 200 ml de glucoamilasa por la parte superior del recipiente de propagación, seguidos de 60 kg de levaduras líquidas SLY a través del tanque de disparo. Después se enjuaga el tanque de disparo. Después se añade ácido cítrico (véase la tabla 5) al recipiente de propagación a través del tanque de disparo y el montaje del propagador ya está completo. En la hora 5 se miden los análisis de calidad/actuación de las levaduras midiendo el pH, Brix, temperatura, porcentaje de gemación, recuento de células y porcentaje de viabilidad. En la hora 8 se repiten las mediciones y se realiza el ensayo de HPLC para determinar DP4, DP3, maltosa, dextrosa, ácido láctico, glicerol, ácido acético y porcentaje de etanol. En la hora 9, el volumen del propagador se envía al fermentador. Las figuras 3, 4 y 5 son diagramas de control que muestran los datos estadísticos generados. En las figuras se indica el UCL (límite de control superior) y el LCL (límite de control inferior). Las bacterias de ácido láctico metabolizan los azúcares y producen ácido láctico y ácido acético. Las figuras 3 y 4 demuestran que los ácidos acético y láctico fueron administrados suficientemente, lo cual demuestra que la combinación de ácidos del lúpulo/ácido cítrico mantiene el control microbiano en la planta de etanol. Las mediciones de glicerol, que indican la salud de las levaduras, demuestran que la mezcla de ácidos del lúpulo/ácido cítrico no afecta a la actuación de *S. cerevisiae* (figura 5). La instalación funcionó correctamente en todas las dosificaciones, en la que los ácidos del lúpulo se redujeron en al menos 42% de la dosificación histórica.

Tabla 5

Volumen de 30% de ácidos del lúpulo añadido al propagador (galones)	Volumen de 50% de ácido cítrico añadido al propagador (galones)	Concentración correspondiente de lúpulo (ppm)	Concentración correspondiente de ácido cítrico (ppm)	Proporción de lúpulo:cítrico
1,36 (5,14 l)	24 (90,8 l)	34	1000	1:29
1,42 (5,37 l)	25 (94,6 l)	35,5	1042	1:29
1,48 (5,60 l)	28,8 (109,0 l)	37	1200	1:32
1,6 (6,06 l)	24 (90,8 l)	40	1000	1:25
1,67 (6,32 l)	25 (94,6 l)	41,75	1042	1:25
1,8 (6,81 l)	24 (90,8 l)	45	1000	1:22

REIVINDICACIONES

1.- Un método para controlar la concentración de microorganismos indeseables en una disolución acuosa empleada en un proceso de fermentación, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 (a) introducir un carbohidrato fermentable en la disolución acuosa;
- (b) introducir al menos una levadura en la disolución;
- (c) introducir un extracto de ácidos del lúpulo en la disolución; y
- (d) introducir al menos un ácido orgánico, o una de sus sales, en la disolución,
- 10 en el que el microorganismo indeseable es una bacteria productora de ácido láctico y el ácido orgánico es ácido cítrico.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dichas etapas se realizan de modo secuencial.
- 3.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad de extracto de ácidos del lúpulo en la disolución acuosa comprende de 1 ppm a 100 ppm.
- 15 4.- El método de la reivindicación 3, en el que la cantidad de extracto de ácidos del lúpulo en la disolución acuosa comprende de 2 ppm a 70 ppm.
- 5.- El método de la reivindicación 3, en el que la cantidad de extracto de ácidos del lúpulo en la disolución acuosa comprende de 5 ppm a 50 ppm.
- 6.- El método de la reivindicación 3, en el que la cantidad de extracto de ácidos del lúpulo en la disolución acuosa comprende de 5 ppm a 45 ppm.
- 20 7.- El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el extracto de ácidos del lúpulo se encuentra en una dosificación de al menos 5 ppm.
- 8.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ácido orgánico, o su sal, se encuentra en una dosificación de 100 ppm.
- 25 9.- El método de la reivindicación 8, en el que el ácido orgánico, o su sal, se encuentra en una dosificación de al menos 200 ppm.
- 10.- El método de la reivindicación 8, en el que el ácido orgánico, o su sal, se encuentra en una dosificación de al menos 300 ppm.
- 11.- El método de la reivindicación 1, en el que la proporción en peso de extracto de ácidos del lúpulo a ácido cítrico, o su sal, es de 1:10 a 1:6500.
- 30 12.- El método de la reivindicación 11, en el que la proporción en peso de extracto de ácidos del lúpulo a ácido cítrico, o su sal, es de 1:20 a 1:6400.
- 13.- El método de la reivindicación 11, en el que la proporción en peso de extracto de ácidos del lúpulo a ácido cítrico, o su sal, es de 1:10 a 1:200.
- 35 14.- El método de la reivindicación 11, en el que la proporción en peso de extracto de ácidos del lúpulo a ácido cítrico, o su sal, es de 1:25 a 1:100.

FIG 1.

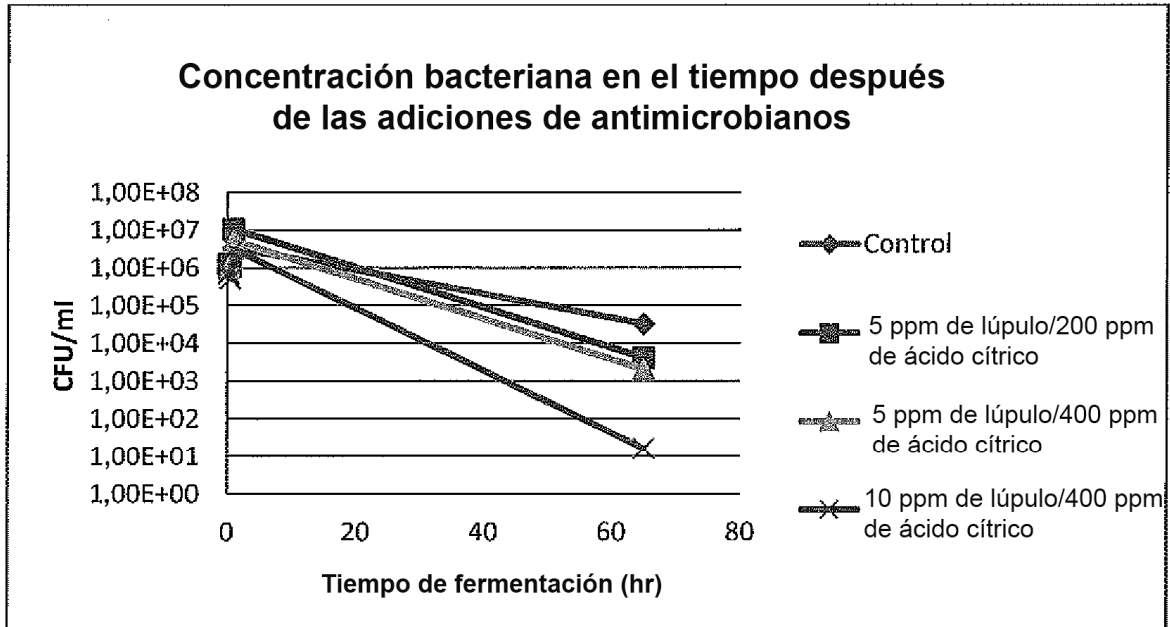


FIG 2.

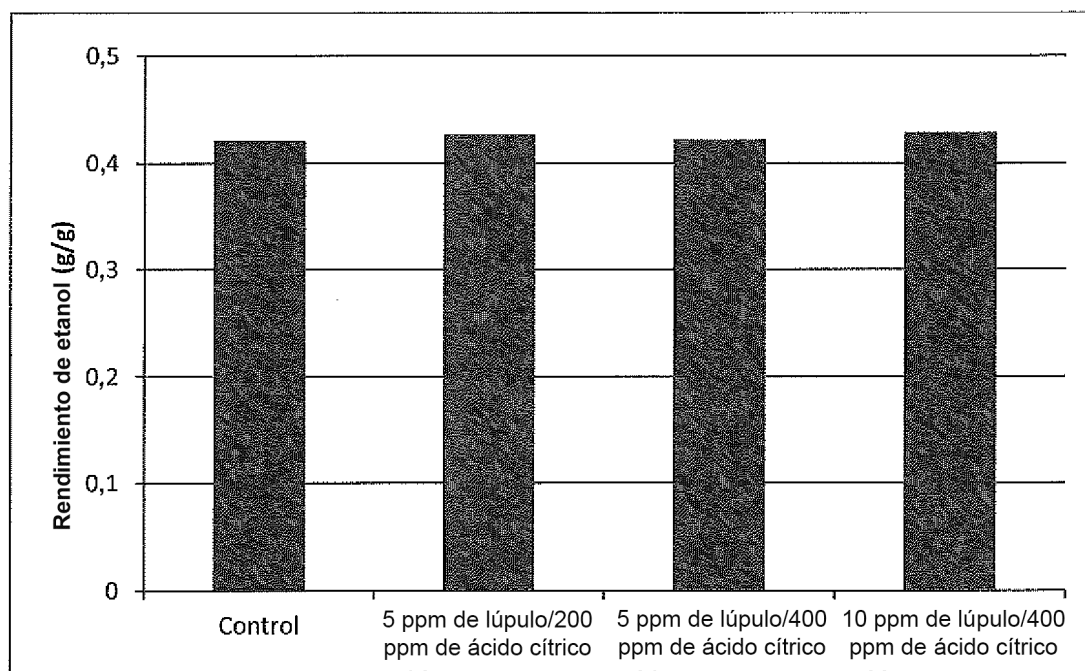


FIG 3.

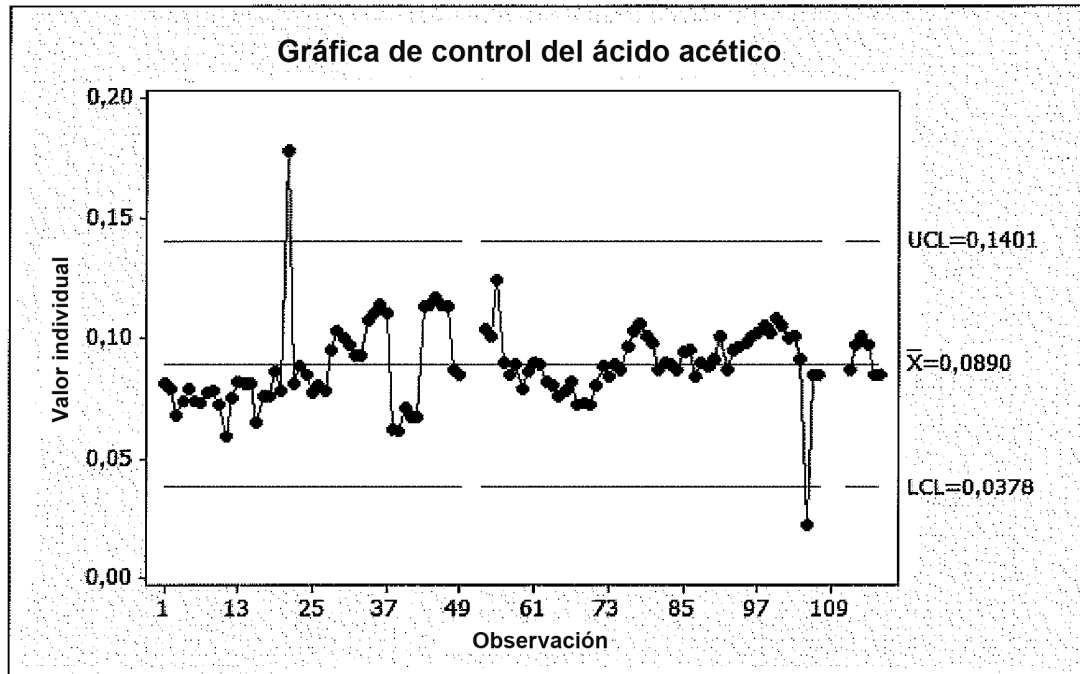


FIG 4.

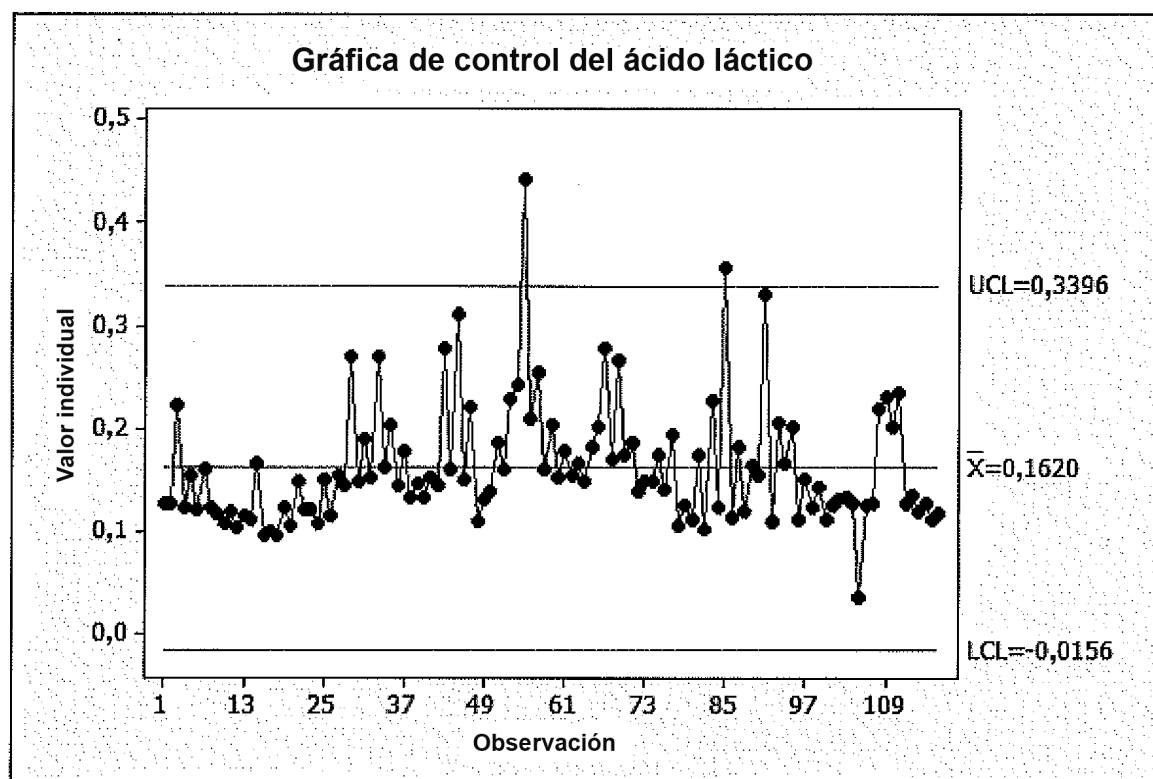


FIG 5.

