

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 580**

51 Int. Cl.:

| | |
|--------------------|-----------|
| C12P 7/06 | (2006.01) |
| C12N 1/16 | (2006.01) |
| C12R 1/01 | (2006.01) |
| A01N 31/02 | (2006.01) |
| A01N 37/34 | (2006.01) |
| A01N 63/02 | (2006.01) |
| A23K 10/37 | (2006.01) |
| A23K 10/38 | (2006.01) |
| B01D 3/00 | (2006.01) |
| C07K 14/195 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2011 PCT/US2011/028587**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11116042**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2011 E 11756892 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2547777**

54 Título: **Procedimientos que utilizan alternativas a antibióticos en la producción de bioetanol**

30 Prioridad:

08.06.2010 US 352521 P
19.07.2010 US 365658 P
19.03.2010 US 315607 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

73 Titular/es:

**BUCKMAN LABORATORIES INTERNATIONAL,
 INC (100.0%)
 1256 North Mclean Boulevard
 Memphis, TN 38108-0305, US**

72 Inventor/es:

**WIATR, CHRISTOPHER, L.;
 CORCORAN, MICHAEL, L.;
 MCNEEL, THOMAS, E.;
 CLARK, RICHARD, A.;
 PORTO, RITA DE CASSIA, BORTOTO;
 OPPONG, DAVID y
 HOEKSTRA, PHILIP**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 684 580 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

Procedimientos que utilizan alternativas a antibióticos en la producción de bioetanol

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos de control del crecimiento de bacterias en procesos de fermentación con alternativas a antibióticos. Más particularmente, la presente invención se refiere a procesos de fermentación para producir etanol con control bacteriano utilizando alternativas a antibióticos que incluyen al menos un biocida no oxidante que es una dihalonitropropionamida y al menos un péptido antibacteriano policíclico.

La demanda mundial de etanol industrial está aumentando en vista de su utilidad como combustible o un suplemento de combustible, p. ej., mezclado con gasolina, y debido a su disponibilidad a partir de numerosas fuentes renovables y materiales de desecho.

El etanol se puede producir mediante fermentación utilizando una amplia variedad de materias primas que contienen almidón. La producción de etanol a base de almidón incluye generalmente preparar una masa de materia prima con almidón que contiene o puede degradarse en azúcares fermentables, añadir agua para preparar un mosto, sacarificación de celulosa u otros carbohidratos complejos en azúcares fermentables y añadir levadura que fermenta el azúcar en etanol y dióxido de carbono. El etanol se recupera sometiendo el mosto fermentado a destilación. Un co-producto de destilación en la producción de etanol son sólidos no amiláceos que contienen proteínas, fibras y aceites, que pueden procesarse para producir "granos secos de destilería con solubles" o "GSDS". Los GSDS son ricos en nutrientes y se venden comercialmente como pienso, complemento alimenticio o fertilizante para plantas.

Un problema en la industria de producción de etanol es que el equipo de proceso de fermentación de etanol y/o el mosto puede contaminarse con bacterias que reducen los rendimientos de producción. "Bacteria del ácido láctico" es una clase de bacterias que plantea un problema a este respecto. Las bacterias del ácido láctico incluyen, por ejemplo, especies *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. Las bacterias del ácido acético, p. ej., *Acetobacter* sp., también pueden causar problemas produciendo ácido acético u otros ácidos orgánicos que contaminan el proceso y reducen los rendimientos de etanol. La levadura convierte los azúcares en etanol, pero las bacterias también convierten esos mismos azúcares en ácido láctico o acético en lugar de etanol, dando lugar a reducciones en el rendimiento de producción de etanol. Para controlar el brote de tales bacterias, se han utilizado antibióticos en los procesos de fermentación de bioetanol. Los antibióticos utilizados para estos tratamientos pueden incluir, por ejemplo, virginiamicina, penicilina, eritromicina y tilosina. Estos antibióticos también se utilizan en medicina veterinaria y humana. El riesgo de que las bacterias desarrollen resistencia farmacológica a los antibióticos debido a su uso o uso excesivo es una preocupación conocida y creciente. Cambiar los antibióticos o aumentar las dosificaciones de antibióticos puede no proporcionar una solución a largo plazo y puede agravar el problema de resistencia a los antibióticos. Además, se han planteado preguntas sobre la no especificidad del antibiótico para las bacterias diana y los productos de fermentación. También se han expresado preocupaciones sobre la presencia de residuos de antibióticos en los GSDS destinados a piensos. Se pueden promulgar controles legislativos y reguladores más estrictos sobre el uso de antibióticos en las aplicaciones de fermentación de etanol. Se necesitan alternativas a los antibióticos para los procesos de fermentación de etanol.

El dióxido de cloro (es decir, ClO_2) se ha propuesto como un biocida oxidante. Sin embargo, el dióxido de cloro es un agente oxidante fuerte que tiene una acción antimicrobiana no selectiva. El dióxido de cloro ataca bacterias y levaduras no deseadas cruciales para el proceso de fermentación. La pérdida de levadura se traduce en una pérdida de rendimiento de etanol y/o una fermentación "lenta" y/o una fermentación "parada". El dióxido de cloro también genera iones cloruro, que pueden corroer el equipo y provocar depósitos de hierro o corrosión por picaduras en el equipo del procedimiento, así como liberar hierro y cromo en el sistema del procedimiento, lo que puede requerir costosas reparaciones.

Los presentes investigadores han reconocido la necesidad de estrategias de fermentación de etanol que puedan reemplazar a los antibióticos para el control bacteriano con un mínimo impacto ambiental negativo propio.

Los métodos de fermentación de etanol que implican biocidas orgánicos, tales como 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA), son conocidos del documento WO 2009/010836. Además, a partir del documento WO 2008/100837 se conocen métodos que implican péptidos antibacterianos, tales como nisina. La nisina también se ha utilizado para conservar bebidas alcohólicas, véase el documento EP-A-0 186 498, y en composiciones de encolado para papel o cartón, véase el documento WO 01/90480. Las composiciones germicidas que comprenden péptidos antibacterianos y otros biocidas orgánicos, tales como DBNPA, son conocidos del documento US 2003/194445. Sin embargo, no ha habido una divulgación previa de sinergia entre dihalo-nitropropionamidas y péptidos antibacterianos policíclicos.

Sumario de la invención

Una característica de la presente invención es proporcionar un método que utiliza alternativas a los antibióticos para el control de bacterias en la fermentación de etanol.

5 Una característica adicional de la presente invención es proporcionar un método que utiliza alternativas a los antibióticos para el control de bacterias en procesos utilizados en fermentaciones de etanol, tales como el control de bacterias en fermentaciones de mosto, tanques pulmón, o combinaciones de los mismos.

10 Otra característica de la presente invención es proporcionar un método que aumente el rendimiento de etanol en fermentaciones de etanol utilizando un tratamiento no antibiótico que tenga un bajo o nulo impacto ambiental adverso.

15 Una característica adicional de la presente invención es proporcionar un método que utiliza biocidas no oxidantes para el control de bacterias en fermentaciones de etanol que están esencialmente ausentes de los productos finales del procedimiento.

20 Una característica adicional de la presente invención es proporcionar un método que introduce biocidas no antibióticos para el control de bacterias en fermentaciones de etanol añadiendo el biocida a al menos una fuente de agua de proceso posterior a la fermentación que se recicla en el fermentador.

25 Las características y ventajas adicionales de la presente invención se expondrán en parte en la siguiente descripción, y en parte resultarán evidentes a partir de la descripción, o pueden aprenderse mediante la práctica de la presente invención. Los objetivos y otras ventajas de la presente invención se realizarán y obtendrán por medio de los elementos y combinaciones señalados particularmente en la descripción escrita y en las reivindicaciones adjuntas.

30 Para lograr estas y otras ventajas y según los fines de la presente invención, como se realiza y se describe ampliamente en la presente memoria, la presente invención, en parte, se refiere a un método de producción de etanol por fermentación. El método incluye fermentar un mosto fermentable en presencia de al menos un biocida no oxidable que es una dihalonitrilopropionamida, al menos un péptido antibacteriano policíclico y una levadura en un recipiente para producir etanol y un contenido de sólidos, en el que el biocida no oxidante controla el crecimiento de bacterias en el mosto sin reducir la población de levaduras y en el que dicho biocida no oxidante y dicho péptido antibacteriano policíclico son sinérgicos con respecto al control biocida de al menos una bacteria durante y/o

35 después de la fermentación para producir etanol. El método implica acto seguido destilar el mosto fermentada para separar al menos una porción del etanol del contenido de sólidos. Los rendimientos de etanol pueden aumentarse mediante el procedimiento de fermentación actual sin la necesidad de antibióticos. Además, los productos de etanol y granos secos de destilería del proceso de fermentación pueden estar libres o esencialmente libres de la alternativa a los antibióticos que se utiliza. El contenido de ácido del mosto fermentado se puede reducir, lo que refleja que se logre un mejor control de las bacterias.

40

45 La invención proporciona además una composición que comprende al menos un biocida no oxidante que es 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol o 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida o un análogo de haluro del mismo, y al menos un péptido antibacteriano policíclico, en el que dicho biocida no oxidante y dicho péptido antibacteriano policíclico están presentes en una cantidad sinérgica con respecto al control de al menos una bacteria durante una fermentación para producir etanol.

50 Queda entendido que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son sólo ilustrativas y explicativas y sólo tienen por objeto proporcionar una explicación adicional de la presente invención, como se reivindica.

55 Como se utiliza en la presente memoria, "antibiótico" se refiere a una sustancia que controla el crecimiento de bacterias, hongos o microorganismos similares, en el que la sustancia puede ser una sustancia natural producida por bacterias u hongos, o una sustancia sintetizada químicamente/bioquímicamente (que puede ser un análogo de una sustancia natural) o una forma químicamente modificada de una sustancia natural. La sustancia puede ser, por ejemplo, un compuesto.

60 "Azúcar fermentable" se refiere a azúcares simples tales como monosacáridos y disacáridos (p. ej., glucosa (dextrosa), fructosa, galactosa, sacarosa, maltosa) que pueden utilizarse mediante levadura u otros microorganismos en conversiones a etanol u otros productos finales.

65 "Material celulósico" se refiere a un material que contiene celulosa. La celulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en tallos, hojas, vainas, cáscaras y mazorcas de plantas u hojas, ramas y madera de árboles. El material celulósico puede ser, pero no se limita a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos forestales, residuos sólidos municipales, papel desechado y residuos de fábricas de pasta y papel. Queda entendido en la presente memoria que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un material de pared celular de plantas que contiene lignina,

celulosa y hemicelulosa en una matriz mixta.

"Biocida" se refiere a una sustancia química capaz de controlar bacterias de una manera selectiva.

5 "Biocida no oxidable" se refiere a un biocida que es selectivo para las bacterias (es decir, ataca al menos una bacteria pero no una levadura) en un mosto de fermentación durante al menos una dosificación.

10 "Controlar" el crecimiento de al menos una bacteria mantiene la población bacteriana a un nivel deseado, reduce la población a un nivel deseado (incluso a límites no detectables), y/o inhibe al menos parcialmente el crecimiento de las bacterias. Además, también debe entenderse que "controlar" el crecimiento de al menos una bacteria puede incluir reducir y/o mantener bioestáticamente un nivel bajo de al menos una bacteria de manera que se mitigue la reacción de las bacterias con azúcares en un mosto de fermentación, es decir, la tasa de crecimiento bacteriano o tasa de ataque bacteriano en los azúcares de fermentación se ralentiza y/o se elimina.

15 "Granos secos de destilería" (GSD) se refiere generalmente a co-productos de producción de etanol por fermentación que puede comprender sólidos de grano residual secos, que pueden ser de calidad para pienso.

20 "Granos secos de destilería con solubles" (GSDS) se refiere a co-productos de producción de etanol por fermentación que pueden comprender sólidos de grano residual secos con un contenido de solubles, tal como jarabe del proceso u otros solubles, y que pueden ser de calidad para piensos.

25 "Granos de destilería en húmedo" (GDH) se refiere a co-productos de producción de etanol por fermentación que pueden comprender sólidos de granos residuales antes del secado, que pueden contener al menos una porción de jarabe del proceso y que pueden ser de calidad para pienso.

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en la presente solicitud y constituyen una parte de la misma, ilustran algunas de las realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la presente invención.

30 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra un diagrama de flujo de procedimiento de un método de producción de etanol con introducción de un biocida no antibiótico para el control de bacterias según una realización de la presente invención.

35 La FIG. 2 ilustra otro diagrama de flujo de procedimiento de un método de producción de etanol en una planta de producción con introducción de un biocida no antibiótico para el control de bacterias según una realización de la presente invención.

La FIG. 3 ilustra otro diagrama de flujo de procedimiento de un método de producción de etanol en una planta de producción con introducción de un biocida no antibiótico para el control de bacterias según una realización de la presente invención.

40 La FIG. 4 muestra el progreso de fermentación basado en la pérdida de masa (g) debido a la producción de dióxido de carbono en fermentaciones con el tiempo (horas), en la que las fermentaciones se someten a tratamientos con biocidas no oxidantes y controles no tratados en experimentos de fermentación de maíz como se describe en el Ejemplo 1.

45 La FIG. 5 muestra las concentraciones finales (g/100 ml) de ácido láctico en fermentaciones sometidas a tratamientos con biocidas no oxidantes y controles no tratados en experimentos de fermentación de maíz como se describe en el Ejemplo 1.

50 La FIG. 6 muestra rendimientos de etanol (g de etanol/g de maíz seco) para los tratamientos con biocidas no oxidantes y controles no tratados en experimentos de fermentación de maíz como se describe en el Ejemplo 1, en los que las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí en el nivel de confianza del 95 %.

Descripción detallada de la presente invención

55 La presente invención proporciona métodos de control del crecimiento de al menos una bacteria en la fermentación de etanol utilizando al menos una alternativa a los antibióticos, a saber, un biocida no antibiótico, que puede estar ausente o esencialmente ausente de los productos finales del procedimiento. Estas alternativas a los antibióticos son selectivas para las bacterias en relación con las levaduras de fermentación, de modo que los rendimientos de etanol pueden aumentarse en los métodos de la presente invención, por ejemplo, aumentarse al menos aproximadamente 0,5 % en peso, o de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 % en peso, o de aproximadamente 1 % a 60 aproximadamente 3,5 % en peso, o de aproximadamente 1,25 % a aproximadamente 2,5 % en peso, en comparación con el mismo proceso de fermentación sin la alternativa a los antibióticos. En la producción a escala industrial, incluso aumentos aparentemente pequeños en los rendimientos pueden ser significativos. Además, los granos secos de destilería (GSD), tales como granos secos de destilería con solubles (GSDS), producidos a partir de los métodos de la presente invención pueden estar exentos de antibióticos. Además, las alternativas a los 65 antibióticos pueden degradarse o reaccionar para formar otros materiales que tienen un menor impacto ambiental, si es que tiene alguno, durante el procesamiento de la fermentación y antes de las recuperaciones de etanol y GSD (p.

ej., GSDS). No se cree que la alternativa a los antibióticos utilizada en los métodos de la presente invención, es decir, el biocida no oxidante, sobreviva al procedimiento en el GSD, tal como GSDS (p. ej., el biocida se descompone y/o no está presente de otro modo). Por lo tanto, no se espera que el biocida no antibiótico termine en un pienso que tenga el GSD (p. ej., GSDS), y no en productos finales posteriores, tales como carnes comercializadas, obtenidas del ganado, aves o peces alimentados con GSD (p. ej., GSDS). Los co-productos de GSD y GSDS del proceso de fermentación, por ejemplo, pueden estar libres o esencialmente libres del biocida no oxidante utilizado para controlar las bacterias durante la fermentación. Por ejemplo, los co-productos de GSD, tales como los co-productos de GSDS, de los métodos de la presente invención, pueden contener las alternativas a los antibióticos utilizadas en los métodos de fermentación de la presente invención en una cantidad de menos de aproximadamente 100 ppm, menos de aproximadamente 10 ppm o menos de aproximadamente 5 ppm, o menos de aproximadamente 1 ppm, o menos que las cantidades detectables (p. ej., de 0,01 ppm a 10 ppm, de 0,0001 ppm a 5 ppm, de 0,001 ppm a 1 ppm).

Asimismo se describen métodos de introducción de biocidas no antibióticos para el control de bacterias en fermentaciones de etanol añadiendo el biocida a al menos una fuente de agua de proceso posterior a la fermentación que se recicla en un fermentador. El tratamiento de las fuentes de agua posteriores a la fermentación con los biocidas no antibióticos indicados antes de que estas fuentes de agua se reciclen en el fermentador puede proporcionar control de las bacterias que pueden haber contaminado la fuente de agua durante el procesamiento de fermentación o posterior a la fermentación. El tratamiento del agua reciclada con los biocidas indicados para controlar las bacterias en el mismo antes de la (re)introducción al fermentador puede evitar o reducir el riesgo de infecciones del fermentador u otras unidades de procedimiento por el agua reciclada.

En general, los procedimientos para convertir un carbohidrato complejo o almidón en azúcar fermentable incluyen generalmente una serie de etapas. En un procedimiento típico tal como el utilizado para granos y cereales que contienen almidón granular, por ejemplo, se utilizan generalmente dos procedimientos de molienda, que se denominan en la técnica como molienda en húmedo y molienda en seco. El material que contiene almidón molido se mezcla a continuación con una solución acuosa para producir una suspensión. En un procedimiento de molienda en seco, la solución acuosa que se mezcla con el material que contiene almidón molido incluye normalmente no solo agua, sino también cantidades variables de vinazas ligeras y/u otras fuentes de agua reciclada en el sistema de procedimiento. Las vinazas ligeras y/u otras fuentes de agua reciclada se pueden utilizar para conservar el uso de agua en el procesamiento de azúcares fermentables y/o alcohol. A continuación, el almidón se convierte en dextrinas menos viscosas de cadena corta mediante un procedimiento de licuefacción, que implica generalmente la gelatinización del almidón simultáneamente con, o seguido de, la adición de una enzima adecuada para ese fin. El almidón licuado se convierte luego en azúcares de bajo peso molecular mediante una etapa de sacarificación, que normalmente incluye de manera enzimática el uso de otra enzima adecuada. Los azúcares de bajo peso molecular pueden purificarse adicionalmente (p. ej., a dextrosa purificada) y metabolizarse mediante un microorganismo en fermentación, tal como levadura, en etanol. Como se indica, las etapas de sacarificación y fermentación se pueden llevar a cabo de forma secuencial o simultánea. La masa fermentada resultante puede destilarse para separar el producto de etanol de la vinaza, que puede procesarse adicionalmente para formar co-producto(s) de granos secos de destilería.

Las especies *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus plantarum*, con frecuencia, son un problema en los fermentadores de etanol. Otras bacterias pueden atacar los sustratos en los fermentadores; por ejemplo, anaerobios obligados, tales como bacterias de ácido acético. Las condiciones se vuelven anaeróbicas en el proceso de fermentación debido a la concentración insuficiente de oxígeno, fomentan el crecimiento de bacterias de ácido acético (p. ej., *Acetobacter*) y superan a las bacterias aeróbicas en nutrientes, y las hacen crecer, produciendo ácido acético por catabolismo. El ácido acético producido puede ser otro problema en la fermentación de etanol. La levadura puede ser aproximadamente diez veces más sensible al ácido acético que los lactobacilos. Por lo tanto, la fermentación de etanol con levadura se ve afectada negativamente por las bacterias del ácido acético, así como por los lactobacilos. El ácido acético puede causar un fermento contaminado en un tanque pulmón de una unidad de destilación. Un tanque pulmón es un depósito de materias primas de mosto fermentado para una unidad de destilación. En la presente invención, se utilizan uno o más biocidas no oxidantes en los métodos de la presente invención para controlar selectivamente lactobacilos, bacterias de ácido acético y/u otras bacterias que reducirían los rendimientos de etanol o perjudicarían el proceso de fermentación, y no la levadura beneficiosa. Por consiguiente, el uso de alternativas a los antibióticos, es decir, biocidas no oxidantes en los presentes métodos para controlar las bacterias pero no dañar las levaduras, permite que la levadura fermente apropiadamente sin impedimentos por la presencia o crecimiento de bacterias, particularmente las bacterias que crecen anaeróticamente y/o forman ácido acético nocivo para el procedimiento (procesamiento) (p. ej., el biocida no reduce ni destruye la levadura). Las bacterias diana pueden ser, por ejemplo, una especie de *Lactobacillus*, un anaerobio obligado o cualquier combinación de los mismos. El mosto fermentado puede tener al menos aproximadamente 5 veces (5x), o al menos aproximadamente 10 veces (10x), o al menos aproximadamente 25 veces (25x), menos ácido láctico, o ácido acético, o ambos, en una base de % en peso que el mismo mosto fermentado procesa en ausencia del biocida no oxidante, que refleja el control mejorado de las bacterias logrado en los métodos de la presente invención. Se mejoran los rendimientos de etanol y la calidad del producto, especialmente con respecto a los GSDS, está libre o esencialmente libre de antibióticos y biocidas que pueden ser no deseados en el medio ambiente o en la cadena alimentaria. Para los fines de la presente invención, queda entendido que "sin reducir la población de levaduras"

significa ninguna reducción significativa en la población de levaduras (p. ej., menos de una reducción del 10 % en la población de levadura dentro de los 30 minutos de introducir el biocida).

La FIG. 1 muestra un diagrama de flujo que ilustra un método no limitante de la presente invención. La producción de etanol a base de almidón de los procedimientos de la presente invención incluye generalmente etapas de procedimiento u operaciones de preparación de celulosa cruda o material almidonado (p. ej., molienda (1), mezcla/cocción (licuefacción) (2), sacarificación (3), fermentación (4) en presencia del biocida no oxidante, almacenamiento opcional en tanques pulmón (5') con biocida no oxidante, destilación (5) para producir un producto de etanol, filtración de vinaza (6) y secado de granos (7) para recuperar el co-producto de GSDS. Dependiendo del tipo de materia prima, el material de materia prima puede someterse a una o más operaciones previas de la unidad, tales como molienda, corte, cribado y/u otros métodos para facilitar el procedimiento del material y hacer que las superficies materiales sean más accesibles a los agentes de tratamiento, indicado generalmente como etapa 1 en la figura. El material de materia prima preparado (p. ej., materia prima triturada) puede mezclarse con agua (21) y un agente solubilizante (22), y cocerse, indicado como etapa 2. En la etapa 2, "licuefacción" se refiere a un procedimiento de solubilización e hidrólisis de celulosa u otros carbohidratos complejos en la materia prima. Se puede utilizar una enzima o un ácido solubilizante estable al calor adecuado para hidrolizar el material de almidón crudo, proporcionando un mosto licuado. Se pueden añadir otros aditivos, tales como agentes de ajuste del pH, en la etapa 2. En la etapa 3, se puede añadir un agente sacarificante (31), tal como una enzima sacarificante, al producto de la etapa 2 para convertir el mosto licuado en azúcares fermentables (p. ej., monosacáridos fermentables). Los azúcares fermentables pueden ser metabolizados por un organismo fermentador, tal como levadura. Como se ha indicado, se pueden necesitar múltiples tratamientos enzimáticos para convertir la celulosa de partida o el carbohidrato complejo en un almidón menos complejo, y finalmente en un azúcar fermentable. La levadura (41) y el biocida (biocida no oxidante, 42) se pueden añadir al mosto en un recipiente de fermentación, indicado como etapa 4, que fermenta el azúcar en etanol y dióxido de carbono (43). Las levaduras se cultivan en semilleros (no mostrados), por ejemplo, se pueden añadir al mosto para comenzar el procedimiento de conversión de azúcares fermentables en etanol. El biocida no oxidante se puede añadir al mosto para controlar cualquier bacteria problemática presente durante la fermentación. Como se entiende en la industria de fermentación, las etapas de licuefacción y/o sacarificación se pueden llevar a cabo simultáneamente con, o por separado de, la etapa de fermentación. Por ejemplo, los procedimientos de sacarificación y fermentación de levadura pueden realizarse en zonas de procedimiento separadas, o simultáneamente, al menos en parte, en la zona de fermentación. La sacarificación, por ejemplo, puede ocurrir mientras el mosto está llenando el fermentador en preparación para la etapa de fermentación, aunque no se limita a ello. Como también se entiende en la industria, las reacciones de sacarificación pueden producirse necesariamente antes de que puedan tener lugar las reacciones de fermentación de levadura, en las que el respectivo agente sacarificante y una levadura están presentes con mosto en el mismo recipiente de fermentación.

Como se indica mediante la trayectoria del procedimiento 50A, el mosto fermentado se puede dirigir directamente desde el recipiente de fermentación a una columna de destilación u otra unidad de destilación. Como se indica mediante la trayectoria del procedimiento 50B, el mosto fermentado puede almacenarse en un tanque(s) pulmón, indicado en la etapa 5', antes de conducir el mosto a una columna de destilación u otra unidad de destilación. El tanque pulmón puede almacenar el vino fermentado entre lotes y puede suministrar una corriente continua de mosto fermentado a las operaciones de recuperación de etanol, incluida la destilación. Se puede utilizar una o ambas trayectorias del flujo de procedimiento 50A y 50B para los mostos fermentados. El biocida (biocida no oxidable, 53) se puede añadir al mosto fermentado en el tanque pulmón para controlar cualquier bacteria problemática presente en el tanque pulmón. Se puede utilizar un solo tanque pulmón o una pluralidad de tanques pulmón y tratarlos con biocida. El etanol (51) generado por la reacción de fermentación se recupera sometiendo el mosto fermentado a destilación, indicado en la etapa 5. Dependiendo del tipo de destilación, la corriente de etanol (51) puede tamizarse o procesarse adicionalmente (no se muestra) para separar eliminar el contenido de agua y purificar aún más el producto de etanol recuperado. El co-producto de vinaza (52) de destilación en la producción de etanol contiene sólidos no amiláceos que contienen proteínas, fibras y aceites, que pueden procesarse para producir los GSDS que pueden estar libres de antibióticos y libres o esencialmente libres del biocida no oxidante. Esta vinaza (52) se puede denominar "vinaza completa" en la que se trata el material que contiene los sólidos que quedan después de la fermentación y la destilación inicial del alcohol ("fondos de la columna de vino"). Como se ilustra, la vinaza (52) se puede filtrar, como se indica en la etapa 6, para separar líquidos (61), tales como vinaza ligera, que pueden reutilizarse en el procedimiento de sólidos (52) que se pueden secar, como se indica en la etapa 7, para producir GSDS (71). La vinaza puede ser, por ejemplo, centrifugada, prensada, tamizada o filtrada por malla, o procesada de otro modo para separar fracciones líquidas y sólidas en la etapa de separación 6.

Para los fines de la presente invención, el biocida no oxidante se puede introducir antes y/o durante la fermentación. El biocida se puede introducir de cualquier manera, como un sólido o líquido o incluso como gas. El biocida se puede introducir de forma continua o como un lote. El biocida se puede introducir antes y/o durante la fermentación. El biocida puede incluso aplicarse al recipiente (p. ej., a las paredes del recipiente) antes de que se introduzca el mosto en el recipiente de fermentación. El biocida se introduce preferentemente al menos justo antes de añadir la levadura y/o aproximadamente al mismo tiempo (o inmediatamente después) de añadir la levadura (p. ej., en un plazo de 6 horas, en un plazo de 3 horas, en un plazo de 1 hora, en un plazo de 30 minutos, en un plazo de 10 minutos tras añadir la levadura). El biocida se puede introducir en el recipiente de fermentación, y/o en una línea que

va al recipiente de fermentación, y/o en un recipiente aguas arriba del recipiente de fermentación (p. ej., recipiente de sacarificación) y/o en una fuente o fuentes de agua reciclada directamente en el recipiente de fermentación o indirectamente en el mismo (p. ej., aguas arriba). El biocida se puede introducir como un solo lote, lotes múltiples, como una línea de goteo, y similares.

5 Como se indica, el biocida no oxidante se puede añadir en un tanque(s) pulmón, si se utiliza, que almacena el mosto fermentado. El biocida se puede introducir antes y/o durante y/o después de la introducción del mosto en el tanque pulmón, y/o en una línea que va al tanque pulmón, tal como un mosto de suministro de línea al tanque pulmón. El biocida se puede introducir de forma continua o como un lote al tanque pulmón. El biocida se puede aplicar al tanque
10 pulmón (p. ej., a las paredes del tanque pulmón) antes de que el mosto fermentado se introduzca en el tanque pulmón. El biocida se puede introducir en el tanque pulmón como un solo lote, lotes múltiples, como una línea de goteo, y similares. El biocida se puede añadir antes, durante y/o después de cualquier otro procedimiento en la producción de etanol para controlar bacterias problemáticas.

15 La FIG. 2 muestra un diagrama de flujo que ilustra un método no limitante de la presente invención en el que la adición de biocida puede realizarse en al menos una fuente de agua reciclada del procedimiento en el recipiente de fermentación. El flujo del procedimiento y el diseño de las unidades de procedimiento en la FIG. 2 es esencialmente similar al de la FIG. 1, y se hace referencia a los mismos con respecto a elementos y unidades numerados de forma similar que pueden tener un significado esencialmente similar al mostrado para la FIG. 1. Para la conservación del
20 agua y/u otros fines, se pueden reciclar diferentes fuentes de agua posteriores a la fermentación a un punto de entrada o puntos aguas arriba del fermentador (p. ej., en las etapas 1, 2 y/o 3) y/o directamente al fermentador o fermentadores utilizados para la fermentación (4). Por ejemplo, la vinaza ligera (61) se puede reciclar al fermentador(es) utilizado(s) para la fermentación. La vinaza ligera se puede reciclar en un punto de introducción o puntos aguas arriba del fermentador(es), como se ilustra de forma no limitativa en la FIG. 2, o directamente en el mismo. De aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 %, o de aproximadamente 25 % a aproximadamente
25 75 %, o de aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 %, o aproximadamente 50 %, por ejemplo, u otras cantidades volumétricas de vinaza ligera puede reciclarse para su uso en la preparación de una suspensión de maíz. La cantidad relativa puede variar entre diferentes plantas y operaciones, y puede cambiar con el tiempo, por ejemplo, para mantener los balances de agua y sólidos. Como se describe *infra*, por ejemplo, cualquier porción no reciclada de vinaza ligera puede tener otro procesamiento aplicado, tal como la evaporación en el procedimiento de fabricación de jarabe que puede añadirse a los sólidos antes o después del secado en la producción del co-producto de GSDS. El agua en el tanque pulmón, la columna de destilación o ambos pueden estar contaminados con bacterias, p. ej., bacterias de ácido acético, que si no se tratan con biocidas antes de reciclarse, tal como residuos de destilación reciclados, podrían provocar una situación de llenado del fermentador(es) con agua contaminada y
30 arriesgarse a la (re)infección de las operaciones de fermentación a condiciones de pre-tratamiento o no tratamiento. Para eliminar o al menos reducir este riesgo, la vinaza ligera, en una opción, puede tratarse con biocida (63) en la corriente de retorno (61) antes de reintroducirse en el sistema de procedimiento aguas arriba o en el fermentador(es), o en otras ubicaciones del procedimiento. Normalmente, no toda el agua u otros líquidos volátiles transportados con sólidos (62) que van a los GSDS (71) a través de la etapa de secado de granos (7) se pierde en el sistema. Una porción predominante, p. ej., aproximadamente 80 % o más u otros porcentajes, de agua en sólidos (62) puede recuperarse como condensado del evaporador (secador) y devolverse al sistema de suspensión como agua reciclada. Una corriente de vapor (72) producida a partir de la etapa de secado (7) puede enfriarse en una etapa de condensación de vapor (9) para proporcionar una corriente de vapor condensado (73), que también puede reciclarse y utilizarse como fuente de agua del procedimiento suministrada al fermentador(es) En otra opción, la corriente de vapor condensado (73) puede tratarse con un biocida (74) antes de reintroducirse en el sistema de procedimiento aguas arriba o en el fermentador(es), o en otras ubicaciones del procedimiento. Al igual que una gran proporción del contenido de agua de la vinaza puede devolverse al sistema de suspensión de una forma u otra, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 95 % en volumen, o de aproximadamente 75 % a aproximadamente 92 % en volumen, o aproximadamente 90 % en volumen, u otros porcentajes, el tratamiento de estas fuentes de agua reciclada del proceso con los biocidas indicados puede proporcionar un enfoque eficaz para prevenir o reducir el riesgo de infección bacteriana y/o problemas de crecimiento en el fermentador, tanque pulmón, u otras unidades o líneas de procedimiento. Otra opción de entrada de agua al sistema de suspensión suministrado al fermentador(es) directamente puede ser agua de depuración. A medida que la levadura fermenta el azúcar, el gas de dióxido de carbono (43) puede liberarse con otros gases de fermentación, tales como compuestos orgánicos volátiles y vapor de agua. El dióxido de carbono se puede liberar directamente a la atmósfera o, como se muestra, se puede purificar con un depurador en una etapa de depuración (8) antes de liberarse. La etapa de depuración se puede utilizar para eliminar compuestos orgánicos volátiles (que incluyen, p. ej., etanol) de los gases de fermentación que contienen dióxido de carbono. El agua (44) se suministra a través de un depurador en la etapa de depuración (8) y entra en contacto con los gases de fermentación para eliminar los contaminantes y recuperar el etanol que de otro modo se perdería debido a la evaporación del fermentador. El efluente acuoso (45) de la etapa de depuración también se puede reciclar como fuente de agua del proceso para la fermentación. Como otra opción, el efluente del depurador (45) se puede tratar con un biocida (46) antes de reintroducirlo en el sistema de procedimiento aguas arriba o en el(los) fermentador(es), o en otras ubicaciones del procedimiento. Cualquier fuente de agua adicional que pueda desearse o utilizarse para los requisitos de agua del proceso de fermentación u otro procesamiento puede provenir, por ejemplo, directamente del suministro de agua de la planta (p. ej., aguas municipales, pozos, etc.), cuya cantidad puede ser una cantidad relativamente pequeña o no. Estas otras posibles
55
60
65

fuentes de agua para el sistema pueden no necesitar tratamiento con el biocida, aunque tal tratamiento puede aplicarse si así lo desea o si es necesario.

5 Con la presente invención, los niveles de bacterias (p. ej., bacterias del ácido láctico) (p. ej., en el mosto, mosto fermentado o etanol recuperado o GSDS recuperados o fuentes de agua reciclada en el fermentador) durante y/o después de la fermentación que pueden ser tratados con el biocida no oxidante pueden estar por debajo de aproximadamente 10^9 UFC/ml (unidades formadoras de colonias por ml), o por debajo de aproximadamente 10^8 UFC/ml, o por debajo de aproximadamente 10^7 UFC/ml, o por debajo de aproximadamente 10^6 UFC/ml, o por debajo de aproximadamente 10^4 UFC/ml, o de aproximadamente 1 UFC/ml a aproximadamente 10^9 UFC/ml, o de aproximadamente 10^4 UFC/ml a aproximadamente 10^8 UFC/ml, o de aproximadamente 10^2 UFC/ml a aproximadamente 10^7 UFC/ml, o de aproximadamente 10^3 UFC/ml a aproximadamente 10^6 UFC/ml, u otros niveles.

15 Queda entendido que el uso del biocida no oxidante en los métodos de la presente invención abarca la producción de etanol utilizando cualquier material de materia prima que contenga una fuente de azúcar fermentable. El material de materia prima puede ser de cualquier variedad de carbohidratos que se pueda descomponer mediante fermentación microbiana. Por ejemplo, el material de materia prima para el método de la presente invención puede ser cualquier material de carbohidrato o almidón que sea una fuente de azúcar fermentable, ya sea como fuente directa de azúcar fermentable, o como un material que puede proporcionar azúcar fermentable por degradación o conversión del almidón original o intermedio, celulosa o componente polisacárido del mismo. Ejemplos de fuentes adecuadas de materiales de materia prima son cultivos agrícolas, tales como granos (p. ej., maíz, trigo, sorgo de grano (milo)), cebada, arroz, centeno, caña de azúcar, remolacha azucarera, remolachas forrajeras, melazas, patatas, zanahorias, mandioca, ruibarbo, chirivías y sorgo dulce. Se pueden utilizar residuos agrícolas asociados con cultivos. El etanol puede producirse por fermentación con métodos de la presente invención utilizando otros materiales de materia prima con almidón tales como biomasa, por ejemplo, virutas de madera, serrín, pasto varilla (*Panicum virgatum*), rastrojo de maíz, mazorcas de maíz, paja, vainas de grano, así como materiales y productos de papel reciclado y desperdicios de papel, o cualquier combinación de los mismos. El material de biomasa puede ser material de biomasa lignocelulósica, tal como materiales leñosos, o puede ser un material herbáceo, tal como el pasto varilla, que tiene un contenido muy bajo en lignina. Materiales de materias primas adicionales pueden incluir frutas y/o zumos de fruta (p. ej., uvas, ciruelas, bayas, manzanas, peras, cerezas), enea, azúcar refinada (p. ej., sacarosa), miel, savia de árbol (arce, palma), flores (diente de león, hibisco), o cualquier combinación de los mismos. Queda entendido en la industria que estas y/u otras materias primas diferentes para la fermentación de etanol pueden tener diferentes rendimientos de etanol, tales como debido a diferentes contenidos de almidón y composiciones, y diferentes co-productos. Como se indica, se cree que los métodos de la presente invención que utilizan los biocidas no oxidantes para el control de bacterias en la producción de etanol pueden utilizarse sin limitación con respecto a la materia prima con almidón.

40 Cuando se utilizan materias primas que contienen celulosa u otras materias primas que contienen carbohidratos complejos que no son directamente azúcares fermentables, normalmente se utilizan varias reacciones para convertir el carbohidrato complejo en etanol. Como se ha indicado, la "licuefacción" y la "sacarificación" se utilizan generalmente junto con la "fermentación", en la que se utiliza una materia prima para la producción de etanol que contiene un carbohidrato complejo que no es un azúcar directamente fermentable con levadura, pero puede degradarse para liberar o proporcionar azúcares fermentables.

45 La licuefacción y la sacarificación pueden realizarse con enzimas o ácidos. La primera reacción puede ser, por ejemplo, una hidrólisis enzimática o ácida de celulosa u otro carbohidrato complejo en azúcares fermentables o precursores más pequeños de los mismos. La hidrólisis enzimática, por ejemplo, puede conducir a sacáridos intermedios que requieren catálisis enzimática adicional para conseguir azúcares fermentables. La sacarificación por adición de ácidos, tales como ácidos minerales diluidos, se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 1.323.540 y 4.201.596. La sacarificación por hidrólisis catalizada por enzimas, tal como el uso de enzimas celulíticas o celulasas, por ejemplo, para materias primas que contienen celulosa, se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 3.764.475 y 3.642.580. Agentes microbianos o enzimáticos adicionales para inducir la sacarificación microbiológica de celulosa pueden incluir, por ejemplo, el mutante de *Aspergillus niger* 817, y *sporocytophaga* celulolítica termófila, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.094.742. Con el maíz, por ejemplo, los almidones se descomponen generalmente en dextrinas y dextrosas con enzimas antes de la fermentación. La licuefacción y la sacarificación, respectivamente, del maíz, por ejemplo, pueden realizarse por etapas con la enzima alfa-amilasa, por ejemplo, utilizada para descomponer el almidón de maíz en dextrinas de cadena corta, y la enzima glucoamilasa, por ejemplo, puede utilizarse para descomponer las dextrinas para formar azúcares fermentables. La producción de etanol de trigo no es significativamente diferente de la producción de etanol de maíz y se puede utilizar en lugar de maíz con ajustes operacionales menores conocidos y utilizados en la industria. Además, el trigo tiene un mayor contenido proteico que el maíz, pero con un contenido de almidón ligeramente más bajo, más fibra y pentosanos, que son hemicelulosas que tienen una gran viscosidad y son más difíciles de descomponer en almidón. Debido al menor contenido de almidón, el trigo generalmente producirá menos etanol pero más granos de destilería que el maíz. La porción de fibra de la caña de azúcar (p. ej., ejemplo, bagazo) puede tratarse enzimáticamente para degradar la celulosa a azúcares fermentables. Los zumos de caña de azúcar (y algunos zumos de frutas) pueden ser adecuados para la fermentación directa. En general, los expertos en la industria de la fermentación conocen muchas soluciones intermedias en términos de rendimientos de etanol y tipos

de co-productos, así como la facilidad del procedimiento, en función del tipo de materia prima seleccionada y utilizada. El uso del biocida no oxidante para el control de bacterias durante la fermentación en el método de la presente invención se puede adaptar a diversas posibilidades y opciones a este respecto. La cantidad de cada enzima (p. ej., enzima(s) celulítica(s)) añadida(s) para sacarificación de material celulósico puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1 % en peso de enzima o de aproximadamente 0,015 % a aproximadamente 0,5 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 0,75 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,4 % en peso de enzima, basándose en el material fermentable sobre la base de peso de sólidos, aunque se pueden utilizar otras cantidades. La cantidad de enzima solubilizante añadida para una etapa de licuefacción puede ser en cantidades de intervalo similares. Cualquier cantidad de enzima indicada en el presente documento puede basarse en la enzima activa.

La fermentación puede implicar la conversión de los azúcares fermentables a etanol, y esto se hace habitualmente mediante una fermentación con levadura en los métodos de la presente invención. La formación de etanol a partir de los azúcares puede conseguirse mediante levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 2.802.774 y *Futilizarium oxysporum*. Otros microorganismos útiles son los bacilos productores de etanol descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4.094.742. La concentración de enzima (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*) añadida para fermentar azúcares puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,015 % a aproximadamente 0,5 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 0,75 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso de enzima, o de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 0,4 % en peso de enzima, basándose en el material fermentable en base al peso de sólidos, aunque se pueden utilizar otras cantidades.

El biocida no oxidante utilizado para el control de bacterias durante (y/o antes y/o después) la fermentación en los métodos de la presente invención se selecciona entre dihalonitrilopropionamidas (p. ej., 2,2-dihalo-3-nitrilopropionamidas), incluyendo, entre otros, dibromonitrilopropionamidas (p. ej., 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida, DBNPA), dicloronitrilopropionamidas (p. ej., 2,2-dicloro-3-nitrilopropionamida), diiodonitrilopropionamidas (p. ej., 2,2-diiodo-3-nitrilopropionamida), difluoronitrilopropionamidas (p. ej., 2,2-difluoro-3-nitrilopropionamida), o cualquier combinación de las mismas. Para cualquiera de los compuestos o composiciones identificadas en todas partes, se entiende que el haluro específico puede reemplazarse con un haluro diferente. Por ejemplo, el bromo puede reemplazarse con cloro o yodo, y viceversa.

Las tasas de tratamiento del biocida no oxidante en el mosto de fermentación deberían ser una concentración suficiente para controlar las bacterias problemáticas de las fermentaciones sin reducir la levadura. La concentración generalmente no está limitada de otra manera. La concentración de biocida no oxidante utilizada para tratar un mosto de fermentación puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 ppm, o al menos aproximadamente 1 ppm, o al menos aproximadamente 10 ppm, o de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, o de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 500 ppm, o de aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 250 ppm, o de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 200 ppm, basándose en el mosto fermentable, sobre una base de sólidos secos en peso/peso, aunque se pueden utilizar otras concentraciones. Por ejemplo, el tratamiento de mosto fermentable con 1 ppm de biocida sería equivalente al tratamiento con 1 libra de biocida por 1.000.000 libras de mosto fermentable. La concentración de biocida no oxidante que se puede utilizar para tratar un mosto fermentado en el tanque pulmón puede ser similar a los niveles indicados utilizados en el mosto de fermentación en el recipiente de fermentación u otras concentraciones. La concentración de biocida no oxidante utilizada para tratar el agua reciclada del proceso al fermentador, tal como la vinaza ligera reciclada, el efluente de depuración reciclado y/o los vapores condensados reciclados del secado del grano, puede ser igual o similar a los niveles indicados en el mosto de fermentación en el recipiente de fermentación u otras concentraciones.

El procedimiento y la composición de la presente invención también incluyen uno o más péptidos antibacterianos policíclicos, tales como nisina. El(los) péptido(s) está(n) presente(s) en una cantidad sinérgica con respecto a la dihalonitrilopropionamida, tal como de aproximadamente 0,01 ppm a 500 ppm o más, en el que esta cantidad es la concentración presente durante el inicio de la fermentación (p. ej., en el fermentador) o puede basarse en el peso de la composición general que se añade al procedimiento. Como una opción, uno o más péptidos antibacterianos policíclicos pueden estar presentes en una relación en peso de (péptido antibacteriano policíclico) a (biocida no oxidante) de 1:2 a 1:1.000, tal como 1:5 a 1:500, o 1:10 a 1:250 o 1:20 a 1:200 o 1:30 a 1:100 o 1:40 a 1:100 o 1:50 a 1:150 u otras relaciones dentro de estos intervalos o fuera de estos intervalos.

El uno o más péptidos antibacterianos policíclicos cuando se combinan con uno o más biocidas como se describe en la presente memoria, proporcionan resultados sinérgicos en la prevención o control de bacterias, especialmente en *Lactobacillus sp.* En otras palabras, la combinación es eficaz, en una forma sinérgica, para prevenir o controlar el deterioro microbiano o la contaminación en sistemas o procesos de fermentación de etanol, como se ejemplifica en la presente memoria.

Un método según la presente invención se puede poner en práctica en plantas convencionales de producción de etanol con modificaciones que pueden realizarse fácilmente a la vista de la presente invención. Con referencia a la FIG. 3, se muestra una planta de producción de etanol (100) basada en un procedimiento de molienda en seco en la que se puede utilizar el método de la presente invención con adaptaciones. El grano se puede administrar en una planta de etanol en la que se puede cargar en tolvas (101) diseñadas para contener suficiente grano para abastecer a la planta durante al menos una tirada de producción. El grano se puede tamizar para eliminar los restos y se muele en harina gruesa, tal como por medio de molienda (102). La harina se puede cocinar y licuar. Durante el procedimiento de cocción (103), el almidón en la harina se prepara física y químicamente para la fermentación. El grano molido se puede mezclar con agua del proceso, el pH se puede ajustar a un pH ácido, tal como de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0, y se puede añadir una enzima alfa-amilasa. La suspensión se puede calentar a 180-190 °F (82-88 °C) durante aproximadamente 30-45 minutos para reducir la viscosidad. La suspensión resultante se puede bombear a continuación a través de un cocedor de chorro presurizado (104) a aproximadamente 221 °F (105 °C) y se mantiene durante aproximadamente 5 minutos. La mezcla puede enfriarse a continuación mediante un condensador rápido atmosférico o al vacío. Después del enfriamiento por condensación instantánea, la mezcla puede mantenerse en un tanque de licuefacción durante aproximadamente 1-2 horas a 180-190 °F (82-88 °C) para dar tiempo a que la enzima alfa-amilasa descomponga el almidón en dextrinas de cadena corta.

Después del ajuste de pH y temperatura, se puede añadir una segunda enzima, la glucoamilasa, a medida que la mezcla se bombea a los tanques de fermentación. Una vez dentro de los tanques de fermentación, la mezcla se conoce como mosto. La enzima glucoamilasa descompone las dextrinas para formar azúcares simples adecuados para la reacción de fermentación. Para la fermentación (106), se añade levadura para convertir el azúcar en etanol y dióxido de carbono. El biocida no oxidante se combina con el mosto en el primer tanque de fermentación. La cantidad de biocida no oxidante puede variar dependiendo del agente particular. La cantidad añadida puede ser efectiva para erradicar o controlar una infección bacteriana existente de la planta o prevenir un brote de bacterias sin reducir la levadura. Se puede permitir que el mosto fermente durante aproximadamente 24-60 horas a una temperatura de 70 °F a 115 °F (21 °C a 46 °C), o de 80 °F a 100 °F (27 °C a 38 °C), dando como resultado una mezcla que contiene hasta aproximadamente 15 % de etanol, así como los sólidos del grano y la levadura añadida. Además, a medida que se inician las fermentaciones de levadura a un pH de 5,6 a 6,0 puede dar lugar a un mayor riesgo de contaminación microbiana, el pH después de la licuefacción puede ajustarse a un pH inferior a 5,0 utilizando, por ejemplo, ácido diluido (p. ej., ácido sulfúrico). El mosto fermentado se puede bombear a una unidad de destilación, tal como un sistema de destilación de múltiples columnas, en el que se añade calor adicional para la destilación (107). Se pueden utilizar uno o más tanques pulmón (126) como depósito para almacenar mosto fermentado como suministro de alimento a las columnas de destilación. Las columnas de destilación pueden utilizar las diferencias en los puntos de ebullición del etanol y el agua para hervir y separar el etanol. En el momento en que la corriente de producto esté lista para salir de las columnas de destilación, puede contener aproximadamente 95 % de etanol en volumen (graduación alcohólica de 190). El residuo de este procedimiento, llamado vinaza, contiene sólidos no fermentables y agua y puede bombearse desde el fondo de las columnas a las centrifugadoras u otros medios de filtración. El etanol con una graduación alcohólica de 190 grados todavía puede contener aproximadamente 5 % de agua. Se puede pasar a través de un tamiz molecular (108) para separar físicamente el agua restante del etanol en función de los diferentes tamaños de las moléculas, o se puede procesar de otra manera convencional para separar el contenido de agua del etanol. Esta etapa puede producir etanol anhidro (sin agua) de graduación alcohólica de 200. Antes de enviar el etanol a los tanques de almacenamiento (110), se puede añadir una pequeña cantidad de desnaturalizante (109), por lo que no es apto para el consumo humano. El etanol combustible (111) no contiene biocida ni antibiótico. Durante el procedimiento de producción de etanol, se crean dos co-productos comercialmente valiosos: dióxido de carbono y granos de destilería. A medida que la levadura fermenta el azúcar, se liberan grandes cantidades de gas de dióxido de carbono (112), junto con otros gases de fermentación, tales como compuestos orgánicos volátiles y vapor de agua. Como se ha indicado, el dióxido de carbono puede liberarse a la atmósfera como dióxido de carbono directamente ventilado (112) (como una opción), o el dióxido de carbono (112A) puede purificarse con un depurador (123) antes de su liberación o captura (como otra opción). El depurador (123) se puede utilizar para eliminar compuestos orgánicos volátiles (que incluyen, p. ej., etanol) del gas de fermentación. Los depuradores entran en contacto con los gases de fermentación (normalmente, principalmente dióxido de carbono) con agua (125) para eliminar los contaminantes y recuperar el etanol que de lo contrario se perdería debido a la evaporación del fermentador. El efluente acuoso del depurador (123) se puede reciclar como fuente de agua del proceso para la fermentación. Como se ha indicado, si se recicla como una fuente de agua para la fermentación, el efluente del depurador (124) se puede tratar opcionalmente con el biocida no oxidante antes de la reintroducción en el sistema de procedimiento. El dióxido de carbono purificado del depurador opcionalmente puede capturarse y comercializarse en la industria de procesamiento de alimentos para su uso en bebidas carbonatadas y aplicaciones de congelación instantánea. La vinaza (113) (p. ej., vinaza completa) del fondo de los tanques de destilación contiene sólidos del grano y levadura añadida así como también líquido del agua añadida durante el procedimiento. Puede enviarse a centrifugadoras (114) para su separación en una vinaza ligera (115) (un líquido con aproximadamente 5-10 % de sólidos) y una fracción que contiene sólidos (116) que puede procesarse en granos de destilería. Una cantidad de la vinaza (115) puede enviarse nuevamente a los tanques de cocción/suspensión como agua de reposición, reduciendo la cantidad de agua dulce requerida por el procedimiento de cocción. Como se indica, si se recicla como una fuente de agua para la fermentación, la vinaza ligera (115) se puede tratar opcionalmente con el biocida no oxidante antes de la reintroducción en el sistema del procedimiento. La adición de vinaza ligera a la suspensión requiere a menudo la necesidad de ajustar el pH de la suspensión. Por

ejemplo, cuando se utiliza grano molido de maíz entero como material que contiene almidón y se mezcla con agua, el pH de la suspensión puede ser, por ejemplo, de aproximadamente pH 5,8 a aproximadamente pH 6,2. Sin embargo, el pH de la suspensión puede reducirse mediante la adición de vinaza ligera a un pH de aproximadamente 4,8 a un pH de 5,2, que puede desestabilizar los agentes de sacarificación. Por lo tanto, cuando se reutiliza la vinaza líquida, el pH de la suspensión puede ajustarse a aproximadamente pH 5,6 a 6,0 utilizando álcali adecuado (p. ej., hidróxido sódico o cálcico, carbonato sódico o amoníaco). El resto (117) de la vinaza se puede enviar a través de un sistema de evaporación de múltiples efectos (118) en el que se puede concentrar en jarabe (p. ej., 25-50 % de sólidos) (119). Este jarabe, que tiene un alto contenido de proteína y grasa, se puede mezclar de nuevo con sólidos que contienen la fracción (116) para proporcionar granos de destilería en húmedo (GDH) (120). Con el jarabe añadido, los GDH todavía contienen la mayor parte del valor nutritivo de la materia prima original más la levadura añadida, por lo que es una excelente ración para ganado de cebadero y lecherías locales u otros tipos de piensos. Después de añadir el jarabe, se puede transportar a una almohadilla de torta húmeda como GDH (120), en la que se puede cargar para el transporte. Muchas instalaciones de etanol no tienen suficiente ganado cercano para utilizar todo el GDH. Para evitar el deterioro, los GDH generalmente se utilizan poco después de producirse. Por lo tanto, se envían comúnmente a través de un sistema de secado (121) para eliminar la humedad y extender su vida útil. Las prácticas de secado convencionales que se pueden utilizar en este sentido comprenden vapor indirecto a una presión de 100 a 250 psia (690 a 1724 kPa) o gas de combustión caliente para proporcionar calor para el secado. Los vapores (127) producidos en el secador se pueden condensar, utilizando un condensador (128) (p. ej., un intercambiador térmico) para formar un subproducto acuoso, o, alternativamente, se pueden ventilar a la atmósfera (no se muestra). Como se ha indicado, los vapores condensados (129) se pueden utilizar como agua reciclada del proceso para el sistema de fermentación, tal como una fuente de agua para el(los) recipiente(s) de fermentación. Como también se indica, si se recicla como una fuente de agua para la fermentación, los vapores condensados (129) pueden tratarse opcionalmente con el biocida no oxidante antes de la reintroducción en el sistema del procedimiento. Estos granos secos de destilería con solubles (GSDS) (122) se utilizan comúnmente como un ingrediente con un alto contenido proteico en el pienso, tal como alimento para ganado, cerdos, aves de corral y peces. Aunque es útil como un procedimiento continuo o semicontinuo con respecto a la FIG. 3, el proceso de fermentación de etanol de la presente invención también puede realizarse en forma discontinua.

Como otra ilustración, la dibromonitropropionamida (p. ej., 2,2-dibromo-3-nitropropionamida) u otra dihalonitropropionamida puede ser la alternativa a los antibióticos utilizada para el control de bacterias en un proceso de fermentación de etanol, como los que se muestran en las FIGS 1, 2 y 3, aunque no se limita a ello. Las fuentes comerciales de 2,2-dibromo-3-nitropropionamida (DBNPA) incluyen, por ejemplo, BRONAM® 20, que está disponible comercialmente en Buckman Laboratories International, Inc., Memphis TN. Durante el proceso de fermentación, el DBNPA se puede diluir en tanques (con agitación) en los que la fermentación tiene lugar durante aproximadamente 24-48 horas a 90-95 °F (32-35 °C). Las tasas de tratamiento de DBNPA de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 500 ppm, o de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 200 ppm (como producto basado en el principio activo), u otros intervalos, pueden controlar los lactobacilos, pero no afectan a la(s) levadura(s) en el proceso de fermentación de modo que el antimicrobiano no termina en los GSDS. El proceso de fermentación puede implicar, por ejemplo, de aproximadamente 600.000 a aproximadamente 1 millón de galones de material de procedimiento por ciclo productivo. Luego, el fermento se bombea al "tanque pulmón" durante aproximadamente 2-3 horas, que puede durar hasta 20 horas en pulmón a aproximadamente 105 °F (40,5 °C) y, a partir de entonces, se destila. DBNPA se añade preferentemente al primer tanque de fermentación (en caso de utilizar múltiples tanques) y se permite que este principio activo reaccione, y luego se descomponga durante aproximadamente 24-48 horas. DBNPA puede introducirse directamente en el primer tanque de fermentación, o mediante agua reciclada del proceso, como se indica, u otros métodos de introducción. El mosto fermentado en el tanque pulmón y/o porciones del tanque pulmón que entran en contacto con el mosto fermentada (p. ej., paredes del tanque interno), se pueden tratar con DBNPA. La concentración de DBNPA utilizada para tratar un mosto fermentado en el tanque pulmón puede ser similar a los niveles indicados utilizados en el tanque de fermentación.

Bajo las condiciones en el tanque de fermentación, se espera que DBNPA dure intacto solo aproximadamente 1-2 horas, en base al trabajo de laboratorio. La vinaza, es decir, producto no evaporado fermentado (posterior al "tanque pulmón") de destilación, se centrifuga y se seca (p. ej., aproximadamente 1 hora a 250-300 °F, 121-149 °C), luego la mezcla se bombea a un tanque final en la que se llama GSDS. Los GSDS son aproximadamente 1/3 de masa de la materia prima de partida para el maíz. No se espera que la química de DBNPA perdure y sobreviva a la centrifugación y al calor de secado antes de introducir la fase de granos secos de destilería con solubles (GSDS). En el procedimiento de maíz a etanol, por ejemplo, se espera que DBNPA se degrade a dióxido de carbono y vapor de agua, y, como tal, tendría un impacto ambiental bajo. Con base a los resultados experimentales, DBNPA destruye las bacterias (lactobacilos), pero no destruye la levadura involucrada en la fermentación, ni se cree que DBNPA se transfiera a los GSDS. La aplicación de DBNPA evita el uso de antibióticos, que pueden permanecer estables durante todo el procedimiento. El uso de DBNPA hace que el uso de antibióticos sea innecesario. El uso de DBNPA es más económico ya que el costo de los antibióticos (como el único tratamiento ampliamente empleado) puede ser relativamente alto y costoso para la fermentación. Además, DBNPA hace posible un aumento en el rendimiento de etanol, p. ej., de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5 en peso, o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 4 % en peso, o de aproximadamente 1 % a aproximadamente 3,5 % en peso, o de aproximadamente 1,25 % a aproximadamente 2,5 % en peso, o de aproximadamente 2 % a aproximadamente 3 %

en peso, u otros aumentos, en comparación con los mostos fermentados infectados no tratados, lo que obviamente es un beneficio para el procesador.

La presente invención puede proporcionar, por ejemplo, la conversión libre de antibióticos de biomasa en alcohol de calidad combustible, que puede combinarse con gasolina sin plomo para producir combustible "gasohol" u otras combustiones de combustibles. Los métodos de la presente invención también son aplicables a la producción de etanol de calidad alimentaria. La actividad inesperada de los biocidas no antibióticos como se muestra en la presente memoria en los procesos de fermentación se ha confirmado utilizando técnicas de laboratorio convencionales como se ilustra en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar, no limitar, la presente invención. En los siguientes ejemplos, todas las partes son proporciones en peso a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la eficacia de un biocida no oxidante como agente antimicrobiano para el control de las infecciones por *Lactobacillus* en la fermentación de etanol. El biocida no oxidante fue BRONAM® 20 (20 % de 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida). Los lactobacilos eran *L. Plantarum*. La levadura fue *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizaron mostos de maíz que contenían aproximadamente 30 % (p/p) de sólidos secos.

Procedimientos experimentales

Para la preparación de la suspensión, la humedad del maíz molido se determinó gravimétricamente utilizando un equilibrio hídrico midiendo la pérdida de masa que se produjo con el secado. Se determinó la cantidad de maíz, agua desionizada (DI) y enzima necesaria para preparar 160 g de suspensión de maíz a una concentración total de sólidos secos de 30 % (p/p) para cada replicado. Para cada tratamiento, se prepararon tres suspensiones de replicados independientes pesando la cantidad requerida de agua DI en vasos de precipitados de Labomat etiquetados, seguido de la adición de la masa requerida de harina de maíz. La enzima alfa-amilasa (Liquozyme SC DS, Novozymes) se diluyó para asegurar una administración más precisa de la enzima a cada matraz. Se utilizó una solución de trabajo de 0,13 g/ml de la alfa amilasa y se añadió a una dosis de 0,02 % (p/p) basándose en el peso en húmedo del maíz. Las suspensiones se agitaron a mano después de que todos los componentes estuvieran en los vasos de precipitados Labomat. Los vasos de precipitados sellados se unieron a una rueda montada verticalmente en Labomat (modelo BFL12 805, Mathis, Suiza), que giraba a 50 rpm durante la incubación. La rueda fue programada para invertir la dirección cada 50 segundos para mejorar la eficiencia de la mezcla. Las muestras se licuaron al incubarse a 83 °C durante 90 minutos, después de lo cual, las muestras se enfriaron a 40 °C en Labomat.

Para la fermentación, una vez que se enfrió la mezcla, los contenidos enteros (aproximadamente 160 g) de cada vaso de precipitados de Labomat se transfirieron a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 ml. Se registraron las masas del mosto y los matraces, y se calculó la masa de mosto transferida a los matraces de fermentación. El pH del mosto se ajustó a <5,2 mediante la adición de 150 µl de ácido sulfúrico 10 N. Los matraces se agitaron a 170 rpm en una incubadora/agitador (Sartorius, Certomat BS-1) a 32 °C hasta que se completó la preparación de todos los mostos.

Todas las enzimas, nutrientes y otras enmiendas añadidas a los matraces de fermentación se prepararon recientemente antes del uso. Los nutrientes de levadura (AYF1177, Ethanol Technology, Milwaukee, WI) se prepararon como una solución de 0,2 g/ml, y se utilizó una dosis de 1.500 ppm (p/p, basado en el peso en húmedo del maíz). Se añadió urea como solución estéril de 0,2 g/ml a una concentración final de 500 ppm como nitrógeno (p/p, basado en la masa total de mosto). La enzima glucoamilasa (Spirizyme Fuel, Novozymes) se preparó como una solución de 0,25 g/ml y se añadió a una dosis de 0,015 % (p/p, basado en el peso en húmedo del maíz).

El cultivo de *L. Plantarum* se preparó para la inoculación por el creciento a lo largo del día en 100 ml de caldo MRS. La cantidad de cultivo necesaria para alcanzar una concentración inicial de 10^7 UFC/ml en el mosto de maíz se estimó a partir de los datos de la curva de crecimiento para *L. plantarum* en caldo MRS. La concentración inicial de la bacteria se determinó recubriendo diluciones en serie del cultivo en agar MRS que contenía cicloheximida e incubándose a 32 °C durante 2 días antes de contar las colonias. Los matraces de fermentación se inocularon con 0,5 ml de este cultivo de *L. plantarum*, que tenía una concentración de células bacterianas de 2×10^9 UFC/ ml. Esto dio una concentración inicial de 6×10^5 UFC/ ml, que es ligeramente inferior a la concentración diana, pero suficiente para los fines de este estudio.

Después de la inoculación con bacterias, los matraces de fermentación se ajustaron con trampas de fermentación desinfectadas y se incubaron a 32 °C con agitación a 170 rpm durante 1 hora. Esto simula el tiempo típico entre el comienzo de un llenado de fermentador y la inoculación con levadura en instalaciones de etanol carburante a gran escala.

Se preparó una suspensión de 0,2 g/ml de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*; Ethanol Red; Fermentis, Marcq-en-Baroeul, Francia) en un matraz estéril de 250 ml. Esta suspensión se incubó y se mezcló durante 20 minutos a 40 °C antes de la inoculación en los matraces de fermentación. Cada matraz de fermentación se inoculó con 160 µl de la suspensión de levadura para alcanzar una concentración inicial de 10^7 células de levadura/ml. Después de la incubación inicial de 1 hora con bacterias, los matraces se inocularon con levadura y se dosificaron con BRONAM® 20. Los tratamientos (bacterias y dosis de BRONAM® 20) utilizados en este estudio para investigar la efectividad de BRONAM® 20 en el control de infecciones por bacterias del ácido láctico en las fermentaciones de combustible y etanol se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

| Tratamiento ID | inoculación | Concentración* BRONAM® 20 (ppm) | Concentración de sólidos secos de maíz (% p/p) |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| control libre de infección (CLI) | levadura | 0 | 30 |
| control infectado (CI) | levadura + <i>L. plantarum</i> | 0 | 30 |
| BRONAM® 20-50 | levadura + <i>L. plantarum</i> | 50 | 30 |
| BRONAM® 20-100 | levadura + <i>L. plantarum</i> | 100 | 30 |
| BRONAM® 20-200 | levadura + <i>L. plantarum</i> | 200 | 30 |

La masa de cada matraz se registró después de que se realizaran todas las adiciones, y las trampas de fermentación desinfectadas se reinsertaron en cada matraz. La masa de cada matraz con la trampa en su lugar también se registró. Los matraces se incubaron a 32 °C con agitación a 170 rpm en una incubadora/agitador (Sartorius, Certomat BS-1) durante 61 horas. La masa de cada matraz con las trampas en su lugar se midió periódicamente durante la fermentación para estimar la tasa de fermentación (la masa de los matraces de fermentación disminuye cuando se pierde dióxido de carbono burbujando fuera de las trampas de fermentación).

Después de la incubación durante 61 horas, se midió la masa de cada matraz antes y después de retirar la trampa. Mientras se agitaba con las manos, se pipeteó 1,0 ml de mosto de cada muestra y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9,0 ml de tampón fosfato 0,05 M. Estas muestras se diluyeron posteriormente en serie para lograr factores de dilución de 10^5 a 10^7 . Cien microlitros de cada una de las tres diluciones más altas se sembraron en placas sobre agar MRS para estimar la concentración final de *L. plantarum* en cada matraz. Las placas se incubaron durante 2 días a 32 °C antes de intentar contar las colonias.

Cada matraz se mezcló con un agitador de cabeza y se recogieron muestras para las siguientes mediciones: recuentos de células de levadura, concentraciones finales de sustratos (glucosa, DP2, DP3 y DP4+, en el que "DPx" representa oligómeros de glucosa con subunidades "x"), productos de fermentación (etanol, glicerol, ácido láctico y ácido acético), sólidos secos totales y sólidos secos disueltos, y la densidad de la fase líquida del vino. Todas las mediciones se realizaron utilizando procedimientos operativos convencionales. Las muestras se prepararon para los recuentos de células de levadura diluyendo a un factor de 100 en agua desionizada y tiñendo con azul de metileno para estimar la viabilidad y luego se contaron microscópicamente utilizando un hemacitómetro. Las concentraciones finales de sustratos y productos de fermentación se determinaron mediante HPLC. Las muestras se prepararon para HPLC por centrifugación para eliminar sólidos grandes (8.000xg durante 3 minutos) seguido de filtración a través de filtros de jeringa de 0,45 µm y acidificación con ácido sulfúrico hasta una concentración final de 0,01 N. Las concentraciones de sólidos totales y disueltos se midieron gravimétricamente basándose en la pérdida de masa durante el secado durante 3 horas a 105 °C. Se prepararon muestras para medir los sólidos disueltos y la densidad de la fase líquida por centrifugación seguido de filtración del sobrenadante a través de filtros de jeringa de 0,45 µm. La densidad de la fase líquida del vino se midió utilizando un densitómetro Anton-Parr.

Las tasas de fermentación para todos los tratamientos se muestran en la Figura 4. Una de las diferencias aparentes entre los tratamientos fue el control infectado (CI), que parecía tener una pérdida de masa total más pequeña que los otros tratamientos. Esto se debió enteramente sin embargo a un matraz de fermentación y su influencia se muestra por las grandes barras de error para el tratamiento CI en relación con los otros tratamientos. Por lo tanto, la diferencia en la pérdida de masa final no se considera estadísticamente significativa. También se observa que la pérdida de masa después de aproximadamente 16 horas parece ser ligeramente menor para las dos dosis más altas de BRONAM® 20. Aunque estas diferencias fueron reproducibles y estadísticamente significativas, no parecen ser importantes, ya que la pérdida de masa para estos dos tratamientos fue idéntica al control libre infección (CLI) después de 24 horas, que es solo la mitad del tiempo de incubación convencional de la industria.

Las concentraciones finales de ácido láctico y los rendimientos de etanol para cada tratamiento se muestran en las Figuras 5 y 6. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que existían diferencias significativas entre los tratamientos para ambos criterios de valoración. El ensayo de Tukey para comparaciones pareadas, que compara todos los pares

posibles de tratamientos, se utilizó para identificar las diferencias significativas, y éstas se muestran por las etiquetas en cada barra en ambas figuras. Cualquier tratamiento etiquetado con la misma letra no es significativamente diferente entre sí.

5 Se observaron diferencias obvias en las concentraciones finales de ácido láctico, como se muestra en la Figura 5. La concentración más baja de ácido láctico se observó en el CLI y la más alta ocurrió en el CI. Por ejemplo, la infección de mostos de maíz por *L. plantarum* sin el biocida no oxidante como en el control infectado (CI) aumentó la concentración final de ácido láctico casi 14 veces en contraste con el control libre de infección (CLI). BRONAM® 20 redujo la cantidad de ácido láctico que se producía en todas las dosis, y hubo una clara relación de la respuesta a la dosis. La concentración más baja de ácido láctico se observó para el mosto de maíz infectado tratado con la dosis de 200 ppmv de BRONAM® 20, y esta concentración fue solo ligeramente mayor que la observada en el control sin infección (CLI) ($0,11 \pm 0,01$ g/100 ml) vs. $0,06 \pm 0,003$ g/100 ml para el CLI). La diferencia entre las concentraciones finales de ácido láctico en los tratamientos con "Bronam-200" y CLI fue estadísticamente significativa: $P = 0,012$, en el que P es la probabilidad de que las dos concentraciones sean las mismas). La incapacidad de BRONAM® 20 para eliminar completamente el aumento en la concentración final de ácido láctico incluso a la dosis más alta puede deberse al periodo de incubación de 1 hora entre la inoculación con bacterias del ácido láctico y la adición del compuesto antimicrobiano.

20 Las diferencias en el rendimiento de etanol observadas se consideraron estadísticamente significativas y siguieron un patrón que es consistente con las tendencias mostradas en la Figura 5. El rendimiento de etanol del CI fue significativamente inferior que el rendimiento de etanol de todos los demás tratamientos, excepto el tratamiento con "Bronam-50". La infección por *L. plantarum* en el control infectado (CI) redujo el rendimiento de etanol en aproximadamente un 2 % en relación con el control libre infección (CLI). La adición de BRONAM® 20 redujo los efectos de la infección bacteriana a todos los niveles de dosis ensayados en relación con el control infectado (CI), y a una concentración de al menos 100 ppmv, los efectos de la infección bacteriana se eliminaron por completo en relación con el control infectado (CI). Con "Bronam-20", por ejemplo, se descubrió un aumento en el rendimiento de etanol del 2,6 % en relación con el control infectado (CI).

30 Los resultados de este estudio muestran claramente que BRONAM® 20 es capaz de controlar las infecciones por *Lactobacillus plantarum* en condiciones de fermentación que son típicas de las utilizadas en la industria del etanol carburante. Cuando los mostos que contienen 30 % (p/p) de sólidos secos de maíz se infectaron por *L. plantarum*, la concentración de ácido láctico aumentó en más de 10 veces (de 0,06 % a 0,76 %, p/v) y el rendimiento de etanol disminuyó en un 2 %. El tratamiento con BRONAM® 20 a una concentración de al menos 100 ppm eliminó por completo el efecto de la infección bacteriana sobre el rendimiento de etanol y redujo la concentración final de ácido láctico en un 80 % o más en relación con el control infectado (CI).

40 En base a los resultados de este estudio, se demostró que los biocidas no oxidantes, tales como BRONAM® 20, pueden controlar las infecciones bacterianas en los procedimientos de fermentación del maíz sin destruir la levadura de gran valor para la fermentación en la producción de etanol carburante. Además, a la vista de estos resultados, se cree que los biocidas no oxidantes, tales como BRONAM® 20, proporcionan una alternativa viable a los antibióticos para controlar las infecciones bacterianas en las fermentaciones de etanol carburante.

Ejemplo 2

45 Se preparó caldo MRS con lactobacilos (25 % de concentración) y se dispensó en cantidades de 10 ml en tubos de ensayo y se sometió a autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Los biocidas se añadieron a los tubos de ensayo en las concentraciones deseadas, y luego se añadieron durante la noche 100 microlitros de un caldo de *Lactobacillus fermentans* a los respectivos tubos de ensayo y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

50 En este ejemplo, se demostró un efecto sinérgico ensayando la combinación de nisina, designada como componente A, y 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, designado como componente B en una serie de ensayos en diferentes relaciones y un intervalo de concentraciones contra la bacteria, *Lactobacillus fermentans*, utilizando el método descrito anteriormente. Los resultados se muestran a continuación.

| Cantidades que producen criterios de valoración (ppm) | | | | | | |
|---|----------------|----------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| Q _a | Q _A | Q _b | Q _B | Q _A /Q _a | Q _B /Q _b | Q _A /Q _a + Q _B /Q _b |
| 1,0 | - | - | - | - | - | - |
| | 0,1 | | 25 | 0,1 | 0,5 | 0,6 |
| | 0,25 | | 25 | 0,25 | 0,5 | 0,75 |
| | 0,25 | | 10 | 0,25 | 0,2 | 0,45 |
| | 0,5 | | 10 | 0,5 | 0,2 | 0,7 |
| - | - | 50 | - | - | - | - |

55

ES 2 684 580 T3

El sinergismo se demostró mediante el método descrito por Kull, E.C., Eisman, P.C., Sylwestrwickz, H.D., y Mayer, R.L. 1961, *APPLIED MICROBIOLOGY*, 9: 538-541, en el que:

$$Q_a/Q_a + Q_b/Q_b \text{ es inferior a } 1.$$

- 5
- Q_a = Concentración del Compuesto A en partes por millón, actuando solo, que produjo un criterio de valoración;
 Q_b = Concentración del Compuesto B en partes por millón, actuando solo, que produjo un criterio de valoración;
 Q_A = Concentración del Compuesto A en partes por millón, en la mezcla, que produjo un criterio de valoración;
 Q_B = Concentración del Compuesto B en partes por millón, en la mezcla, que produjo un criterio de valoración.

10 Cuando la suma de Q_A/Q_a y Q_B/Q_b es superior a uno, se indica antagonismo y cuando la suma es igual a uno, se indica aditividad. Cuando la suma de este valor es inferior a uno, existe sinergia.

15 En la tabla anterior, como puede verse, la combinación de nisina con 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol proporcionó resultados sinérgicos para las diversas combinaciones. Esta efectividad sería bastante útil para controlar las bacterias antes y/o durante las fermentaciones que producen etanol.

Ejemplo 3

20 En este ejemplo, se demostró un efecto sinérgico ensayando la combinación de nisina, designada como componente A, y 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida, designada como componente B en una serie de ensayos en relaciones variables y un intervalo de concentraciones contra la bacteria, *Lactobacillus fermentans*, utilizando el método descrito anteriormente. Los resultados se exponen a continuación.

| Cantidades que producen criterios de valoración (ppm) | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-----------|-----------|---------------------|
| Q_a | Q_A | Q_b | Q_B | Q_A/Q_a | Q_B/Q_b | $Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$ |
| 1,0 | - | - | - | - | - | - |
| | 0,1 | | 60 | 0,1 | 0,6 | 0,7 |
| | 0,1 | | 80 | 0,1 | 0,8 | 0,9 |
| | 0,25 | | 60 | 0,25 | 0,6 | 0,85 |
| | 0,5 | | 20 | 0,5 | 0,2 | 0,7 |
| | 0,5 | | 40 | 0,5 | 0,4 | 0,9 |
| - | - | 100 | - | - | - | - |

25 En la tabla anterior, como puede verse, la combinación de nisina con 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida proporcionó resultados sinérgicos para las diversas combinaciones. Esta efectividad sería bastante útil para controlar las bacterias antes y/o durante las fermentaciones que producen etanol.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de etanol por fermentación que comprende:
- 5 a) fermentar un mosto fermentable en presencia de al menos un biocida no oxidable que es una dihalonitrilopropionamida, al menos un péptido antibacteriano policíclico y una levadura en un recipiente para producir etanol y un contenido de sólidos, en el que dicho biocida no oxidante controla el crecimiento de bacterias en el mosto sin reducir la población de levaduras y en el que dicho biocida no oxidante y dicho péptido antibacteriano policíclico son sinérgicos con respecto al control biocida de al menos una bacteria durante y/o
- 10 después de la fermentación para producir etanol; y
b) destilar el mosto fermentado para separar al menos una porción del etanol de dicho contenido de sólidos.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la obtención de un producto de granos secos de destilería a partir de dichos contenidos de sólidos que contienen menos de aproximadamente 100 ppm del biocida no oxidante.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que el mosto fermentado en la etapa b) contiene no más de 10 ppm de antibiótico.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicho mosto fermentado en la etapa b) tiene menos de 10 ppm de biocida no oxidante presente después de la destilación.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho mosto fermentado en la etapa b) comprende menos de 1 ppm de biocida no oxidante presente después de la destilación.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que las bacterias son *Lactobacillus sp.*, *Acetobacter sp.*, o combinaciones de las mismas.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en el que las bacterias son anaerobios obligados.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el biocida no oxidante es 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida.
- 35 9. Una composición que comprende al menos un biocida no oxidante que es 2-bromo-2-nitropropano-1,3 diol o 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida o un análogo de haluro del mismo, y al menos un péptido antibacteriano policíclico, en la que dicho biocida no oxidante y dicho péptido antibacteriano policíclico están presentes en una cantidad sinérgica con respecto al control de al menos una bacteria durante una fermentación para producir etanol.

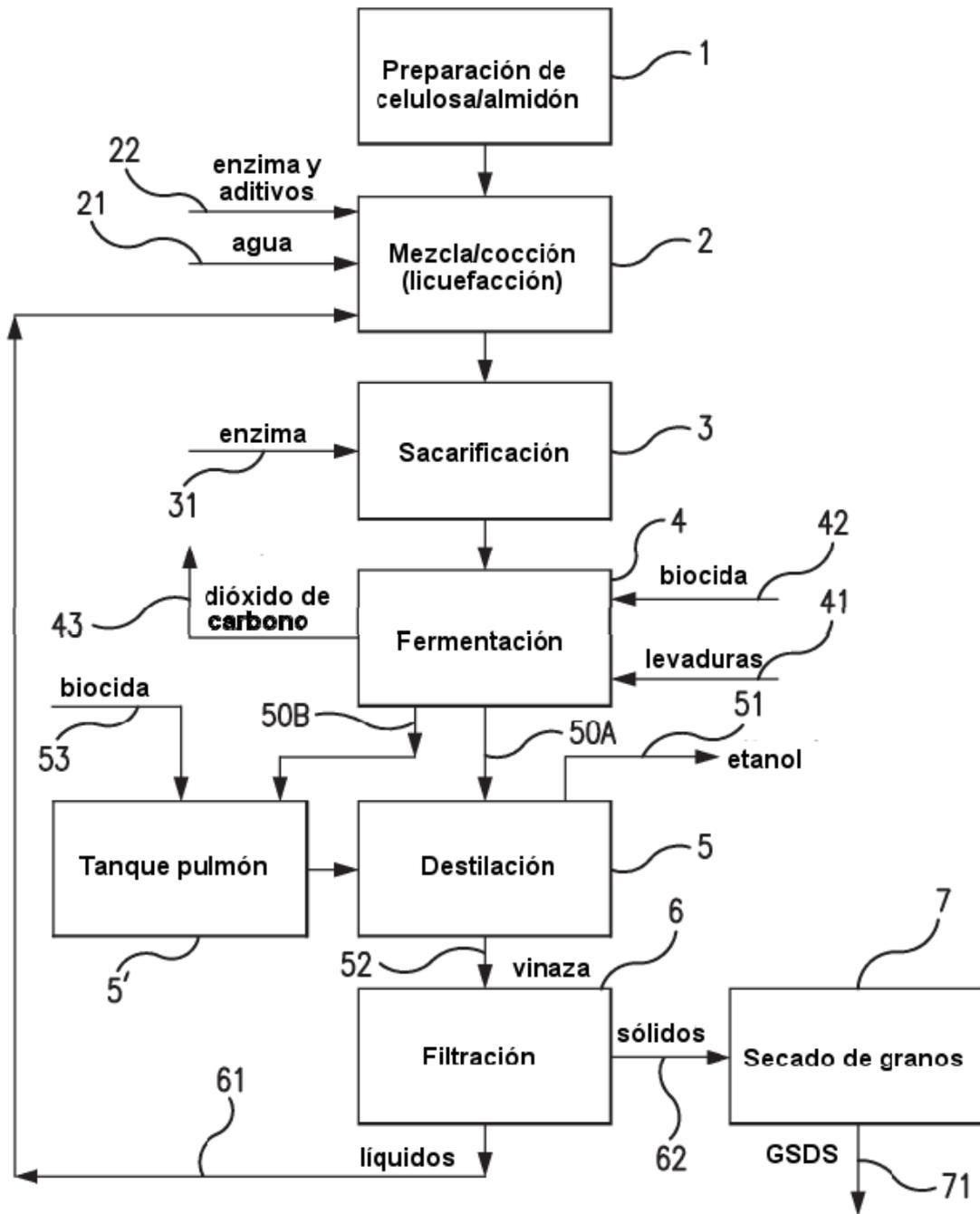


FIG. 1

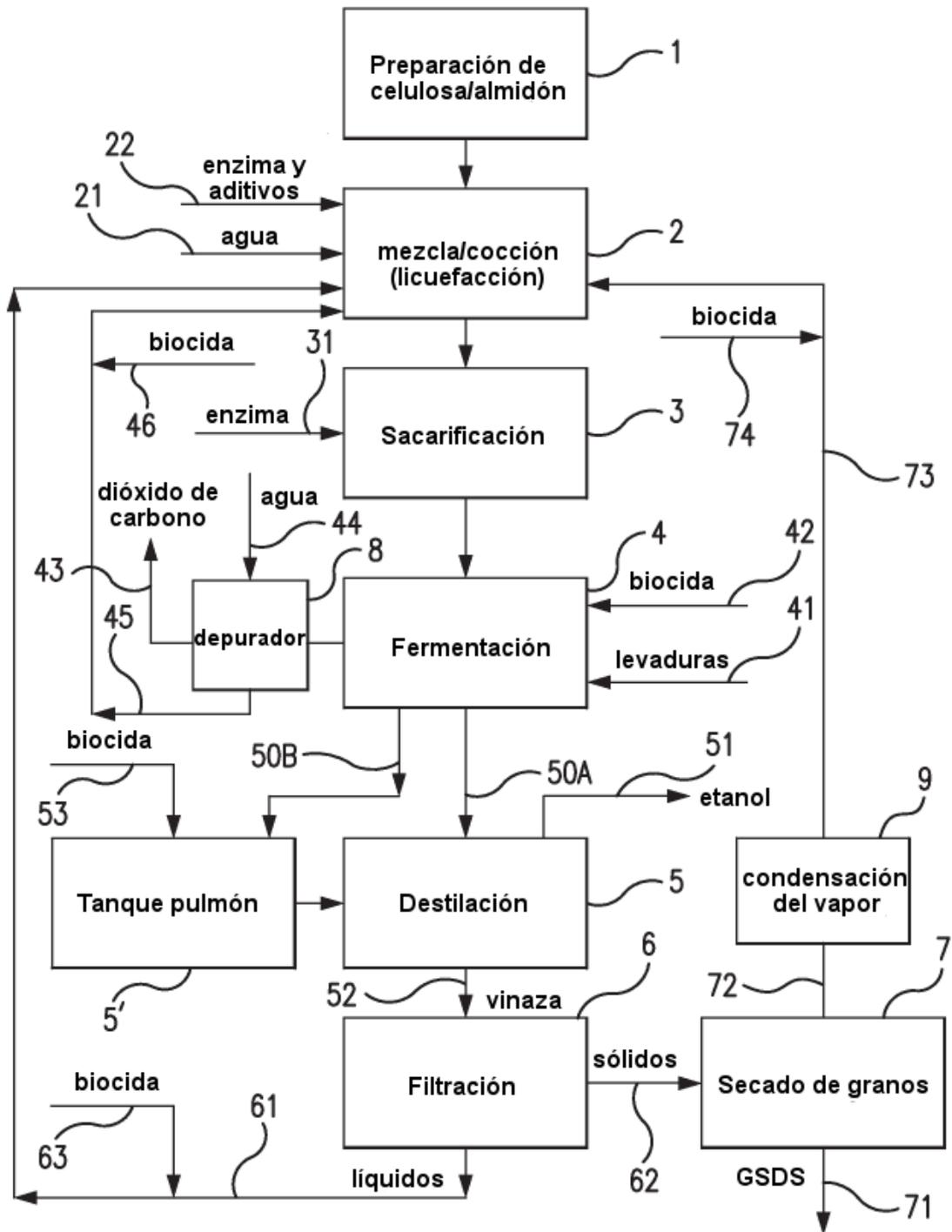


FIG. 2

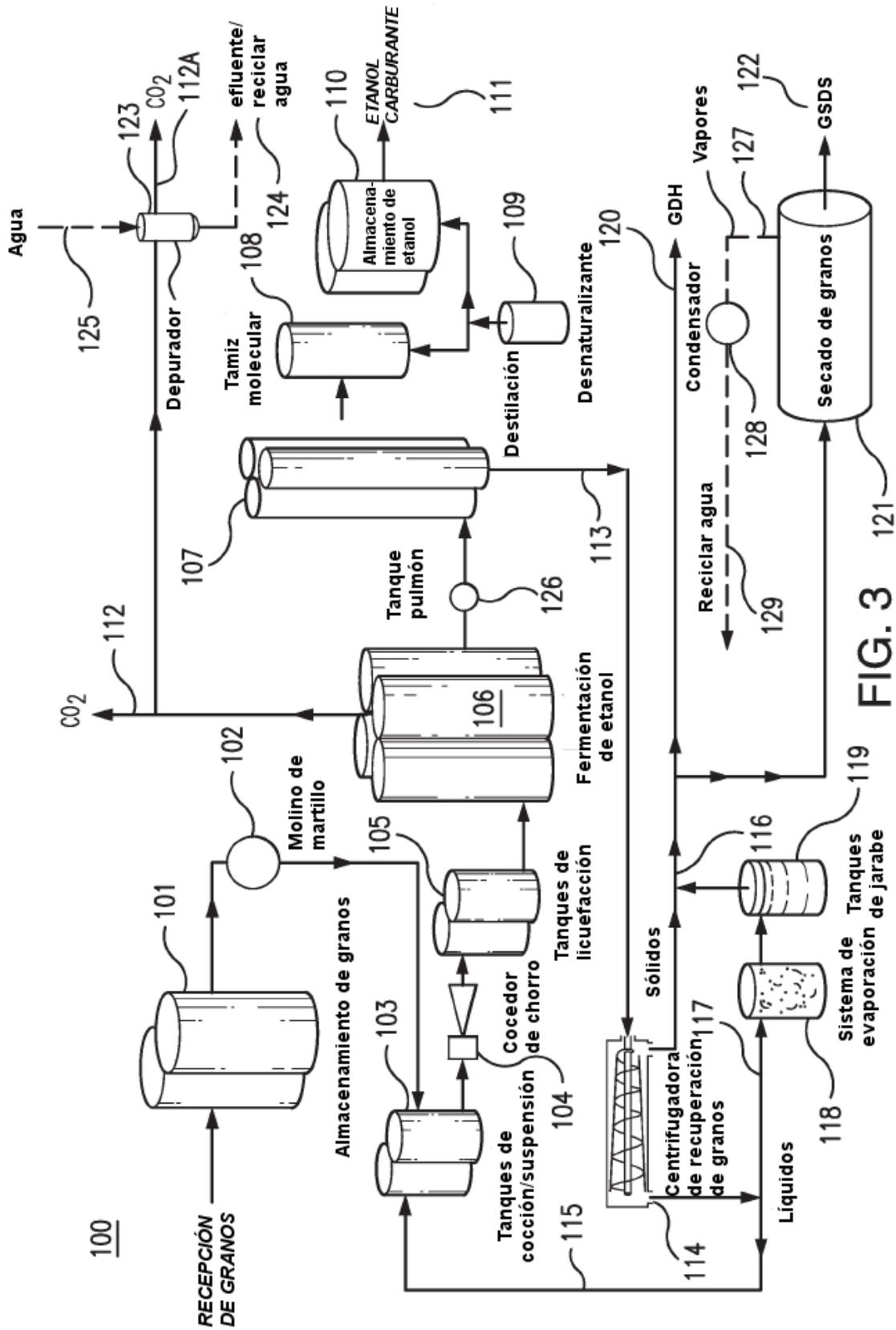


FIG. 3

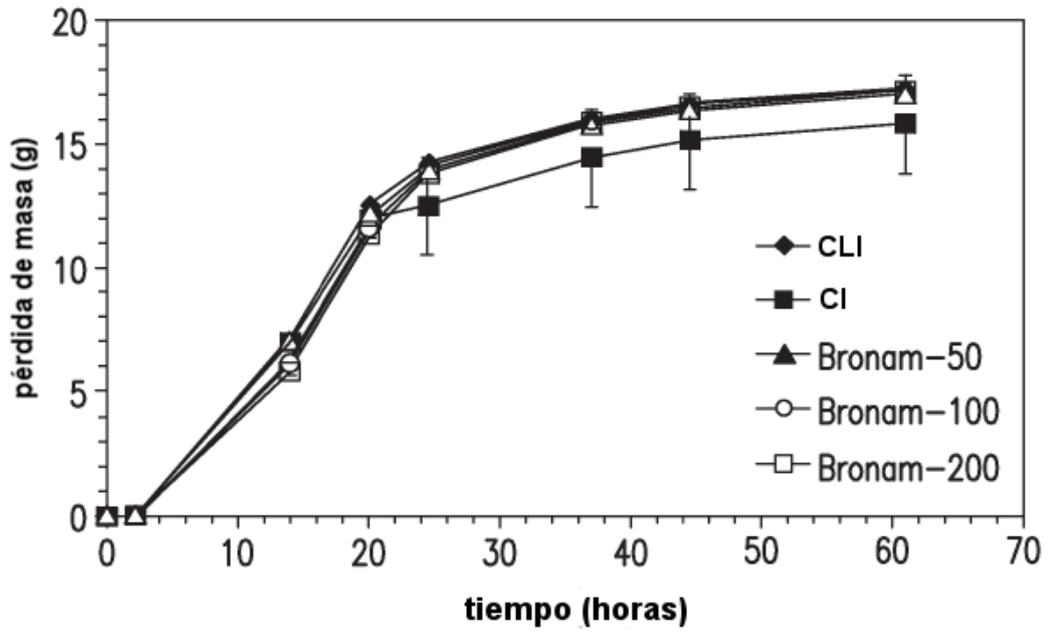


FIG. 4

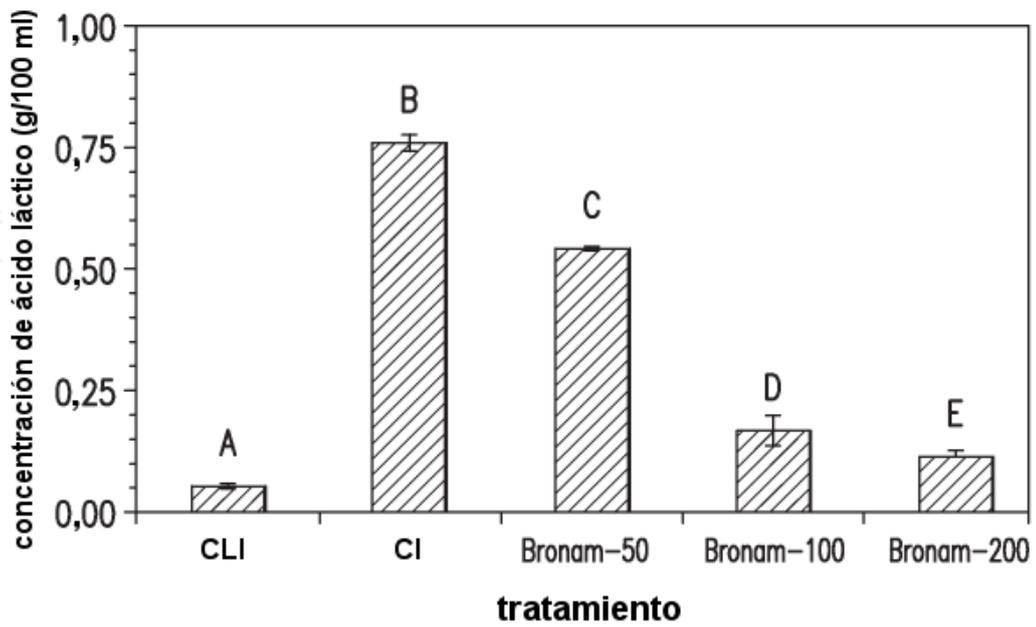


FIG. 5

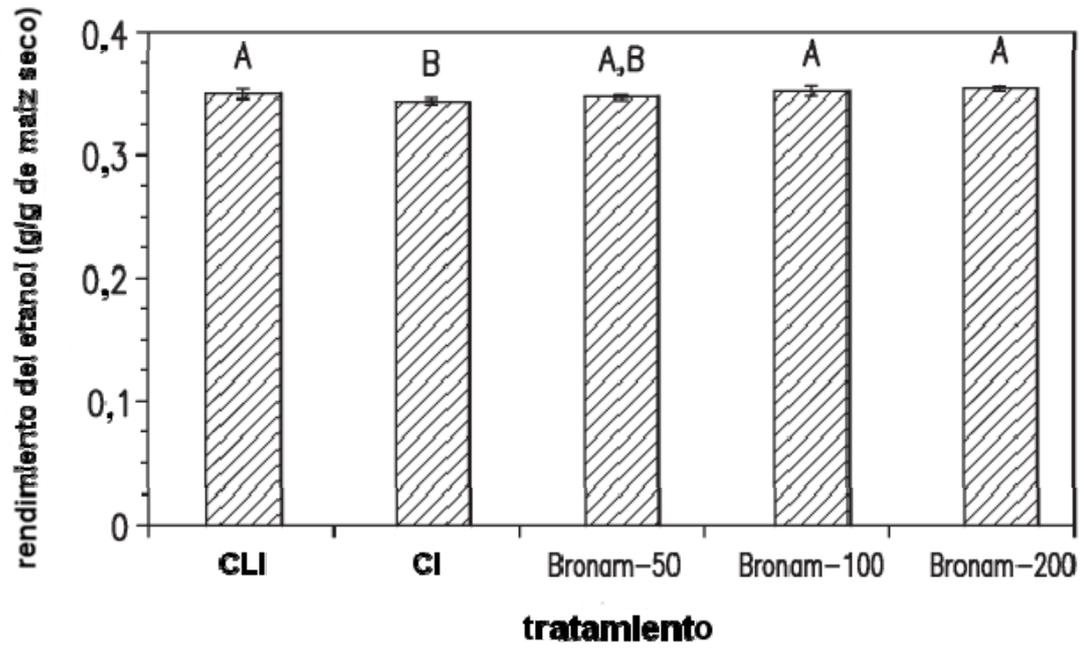


FIG. 6