

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 854 723**

51 Int. Cl.:

C12P 7/10 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2010 PCT/US2010/057875**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11066318**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2010 E 10833878 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 2504445**

54 Título: **Fermentación de hidrato de carbono**

30 Prioridad:

25.11.2009 US 264596 P

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

22.09.2021

73 Titular/es:

**ANITOX CORPORATION (100.0%)
1055 Progress Circle
Lawrenceville, GA 30043, US**

72 Inventor/es:

**PIMENTEL, JULIO y
WILSON, JAMES, D.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 854 723 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

Fermentación de hidrato de carbono

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 Un método de alto rendimiento para producir etanol a partir de la fermentación de hidratos de carbono, tratando material de hidrato de carbono entrante con una composición que contiene formaldehído, un ácido graso, un terpeno y un tensioactivo.

ANTECEDENTES

- 10 En 2009, la Norma de Combustibles Renovables (RFS) exigió la mezcla de 11,1 billones de galones (42 billones de litros) de etanol y otros biocombustibles en el mercado de los combustibles de automoción de los EE. UU. para satisfacer la futura demanda. Esto daría como resultado un aumento en el nivel de maíz necesitado por la industria y también requeriría que se aumentara la capacidad de las plantas. En solo el año pasado, la capacidad de operación anual de los EE. UU. aumentó en 2,7 billones de galones (10,2 billones de litros), un aumento del 34 % con respecto al 2007. Este crecimiento en la capacidad de producción fue posible gracias a la finalización, la puesta en marcha y el funcionamiento de nuevas refinerías de etanol.

- 15 El etanol, un biocombustible prometedor a partir de recursos renovables, se produce a partir del almidón de granos de cereal (maíz, sorgo, trigo, triticale, centeno, cebada malteada, arroz), cultivos de tubérculo (patatas) o por el uso directo del azúcar en melaza, jugo de caña de azúcar o jugo de remolacha azucarera. El etanol también se puede producir por fermentación de material basado en celulosa (pasta varilla, pinos), pero esta tecnología no se ha comercializado ampliamente.

- 20 Brasil y los EE. UU producen el ochenta por ciento del etanol mundial. De este, el 60 % se produce por fermentación de levadura de maíz o jugo de caña de azúcar. La producción de etanol mediante fermentación anaerobia de una fuente de carbono por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los mejores procesos biotecnológicos conocidos y representa una producción mundial superior a 35 billones de litros de etanol por año (Bayrock, 2007).

- 25 El proceso de producción de etanol a partir de cereales empieza con la hidrólisis del almidón. La hidrólisis del almidón da como resultado la conversión de la amilosa, un α -D-(1-4)-glucano principalmente lineal, y la amilopectina ramificada, un α -D-(1-4)-glucano que tiene enlaces α -D-(1-6) en el punto de ramificación, en azúcares fermentables que posteriormente se convierten en etanol por levadura (Majovic, 2006), bacterias (Dien, 2003). Las bacterias se usan para la producción de etanol a partir de material que contiene principalmente celulosa, incluyen *Zymomonas spp.*, *E. coli* manipulada, *Klebsiella oxytoca*, *Zymomonas mobilis*, *Acetivibrio cellulolyticus*, entre otras (Dien, 2003)

- 30 En un sistema de producción de etanol, se muele el grano de maíz entero y se mezcla con agua. La mezcla se hierve entonces con vapor para gelatinizar el almidón y para reducir la contaminación bacteriana. Después de esta licuefacción, se añaden enzimas y levadura para empezar el proceso de fermentación para producir etanol.

- 35 La molienda en seco y la molienda en húmedo son los dos procesos principales usados para producir etanol en los Estados Unidos.

- 40 En el proceso de molienda en seco, se muele el grano de maíz entero u otro material almidonado dando harina y se mezcla con agua para formar una suspensión. Entonces, se añaden enzimas a la mezcla, que se procesa en un cocedor a alta temperatura, se enfría y se transfiere a fermentadores en donde se añade levadura y empieza la conversión del azúcar en etanol. Después de la fermentación, la mezcla resultante se transfiere a columnas de destilación donde se separa el etanol. Se procesan los sólidos resultantes después de la fermentación y la separación del etanol para producir granos secos de destilería con solubles (DDGS), que se usan para la producción de animales, por ejemplo, piensos para aves de corral, cerdos y ganado vacuno. Más del 80 % de la capacidad actual del etanol utiliza el proceso de molienda en seco (RFS, 2006).

- 45 En el proceso de molienda en húmedo, el grano se pone en remojo o se impregna en agua para facilitar la separación del grano en sus componentes nutritivos básicos, tales como los componentes de germen de maíz, fibra, gluten y almidón. Después de la impregnación, se procesa la suspensión de maíz mediante una serie de molinillos y se separan los componentes. Se filtra y se seca el componente de gluten para producir la harina de gluten de maíz (CGM), un producto rico en proteínas usado como ingrediente para pienso en operaciones animales. Entonces se procesa el almidón y cualquier agua restante del macerado en una de tres formas: se fermenta en etanol, se seca y se vende como almidón de maíz seco o modificado, o se procesa en jarabe de maíz (RFS, 2006).

- 50 Tanto los procesos de molienda en húmedo como en seco solo utilizan la porción de almidón del grano de maíz para la producción de etanol. La proteína restante, grasa, fibra y otros componentes nutritivos siguen disponibles para su uso como pienso para animales.

- 5 En el proceso de fermentación convencional, se añade el cultivo de levadura a la porción de grano del almidón del maíz y se incuba 72 horas para dejar tiempo suficiente para que aumente la población de levadura para aumentar hasta la concentración necesaria (Maye, 2006). Se necesitan desde 45 hasta 60 minutos para que se duplique la población de levadura. Se necesitan muchas horas de dicha propagación para producir la cantidad de levadura necesaria para fermentar tan gran cantidad de disolución de azúcar (Maye, 2006).
- 10 Un proceso llamado la hidrólisis del almidón en bruto convierte el almidón en azúcar, que luego se fermenta dando etanol, evitando las condiciones convencionales de gelatinización del almidón. Las enzimas usadas en la sacarificación/fermentación son alfa-amilasa fúngica y glucoamilasa (amiloglucosidasa) (Thomas, 2001). Esta sacarificación y fermentación simultánea permite fermentar mayores concentraciones de almidón y da como resultado mayores niveles de etanol. Si la fuente de azúcar es de cultivos tales como caña de azúcar, remolachas azucareras, fruta o melaza, no es necesaria la sacarificación y la fermentación puede empezar con la adición de levadura y agua (Maye, 2006).
- 15 Una de las preocupaciones importantes con los sistemas de fermentación discontinuos o continuos es la dificultad de mantenerlos libres de contaminación bacteriana. Desafortunadamente, la atmósfera óptima para la fermentación también es la óptima para el crecimiento bacteriano. La contaminación se origina, en general, a partir de la recogida del material de hidrato de carbono. El lavado del material puede ayudar a reducir el nivel de contaminación (Maye, 2006).
- 20 A pesar de los esfuerzos para prevenir la contaminación con la limpieza y la desinfección de los tanques de sacarificación y los sistemas continuos de propagación de levadura, las biopelículas pueden servir de reservorios de bacterias que reintroducen continuamente contaminantes (Bischoff, 2009).
- 25 Se ha aislado una gran variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de la fermentación del etanol para combustible que incluyen especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Clostridium* (Bischoff, 2009). Casi dos tercios de las bacterias aisladas fueron especies de bacterias ácido lácticas, por ejemplo *Lactobacillus* (Skinner, 2007).
- 30 En un estudio realizado por Skinner y Leathers (2004), el 44-60 % de los contaminantes en el proceso de molienda en húmedo se identificaron como lactobacilos. En el proceso de molienda en seco, 37 a 87 % de los contaminantes se identificaron como lactobacilos.
- 35 La contaminación por lactobacilos en el intervalo de 10^6 a 10^7 UFC/mL de suspensión de maíz puede reducir el rendimiento del etanol en 1-3 %. En la industria, incluso con un programa de control bacteriano activo para controlar la proliferación de lactobacilos, las pérdidas de hidratos de carbono a favor de los lactobacilos pueden marcar la diferencia entre la rentabilidad y la no rentabilidad (Bayrock, 2007). Los lactobacilos no solo toleran un pH bajo, alta acidez y concentraciones relativamente altas de etanol, sino que también se multiplican en condiciones de fermentación alcohólica (Thomas, 2001). Los contaminantes bacterianos compiten por factores de crecimiento que son necesitados por la levadura y también producen subproductos que son inhibidores de la levadura, particularmente los ácidos láctico y acético.
- 40 La contaminación de la suspensión de hidratos de carbono durante el transcurso de la fermentación alcohólica da como resultado a) disminución del rendimiento de etanol, b) aumento de la canalización de hidratos de carbono para la producción de glicerol y ácidos lácticos, c) una pérdida rápida de la viabilidad de la levadura después del agotamiento de azúcares fermentables, y d) disminución de la proliferación de levadura en el macerado en el que los lactobacilos contaminantes ya han crecido hasta un alto número (Thomas, 2001).
- 45 Un estudio reciente de contaminantes bacterianos de plantas basadas en maíz en los EE. UU. encontró que las cargas bacterianas en una instalación de molienda en húmedo fueron aproximadamente 10^6 UFC/mL de suspensión de maíz mientras que aquellas en las instalaciones de molienda en seco podrían alcanzar 10^8 UFC/mL de suspensión de maíz (Bischoff, 2007; Chang, 1997).
- 50 La presencia de subproductos de lactobacilos, es decir, ácidos acéticos y lácticos, durante la fermentación afecta el crecimiento y el metabolismo de la levadura, y se ha sugerido como una de las causas de la fermentación atascada o muy lenta (Thomas, 2001). Si el contenido de ácido láctico del macerado se aproxima a 0,8 % y/o la concentración de ácido acético supera 0,05 %, se estresan las levaduras productoras de etanol (Bayrock, 2007). Los lactobacilos pueden estresar las células de levadura, que liberan nutrientes, particularmente aminoácidos y péptidos que pueden estimular el crecimiento bacteriano (Oliva-Neto, 2004). Una concentración de ácido láctico de 8 g/L en una fermentación discontinua de melaza de remolacha redujo la viabilidad de la levadura en 95 % y la tasa de producción de alcohol en 80 % (Bayrock, 2001).
- 55 La presencia de lactobacilos en la fermentación del etanol puede disminuir el rendimiento del etanol en 44 % después de 4 días de operación a pH controlado. Esto coincide con un aumento en *L. paracasei* hasta $>10^{10}$ UFC/mL y un aumento cuádruple en la concentración de ácido láctico hasta 20 g/L. Se observó una reducción del 80 % en la densidad de la levadura con concentraciones de etanol, ácido láctico y ácido acético de 70, 38 y 7,5 g/L, respectivamente (Bayrock, 2001).

De Oliva-Neto y Yokoya (1994) evaluaron el efecto de la contaminación bacteriana sobre un proceso de fermentación alcohólica de lotes alimentados. Mostraron que *L. fermentum* inhibía fuertemente la levadura de panadero comercial en un proceso de lotes alimentados. Cuando el ácido total (láctico y acético) superó 4,8 g/L, interfirió con la formación de yemas de levadura y la viabilidad con una disminución de 6 g/L en la eficiencia alcohólica.

5 Otros han mostrado que: a) una mezcla de 10^6 lactobacilos/mL de macerado produjo aproximadamente 1 % v/v de reducción en el etanol final producido por levadura (Narendranath, 2004), b) la exposición del sistema de fermentación a 10^8 UFC/mL de *L. fermentum* disminuyó el rendimiento de etanol en 27 % y aumentó la glucosa residual desde 6,2 hasta 45,5 g/L (Bischoff, 2009), c) el uso de 10^5 UFC de lactobacilos/mL produjo una reducción de 8 % en el rendimiento de etanol y un aumento de 3,2 veces en la glucosa residual (Bischoff, 2009).

10 Los métodos de control de bacterias incluyen la adición de más cultivo de levadura, limpieza e higiene rigurosas, lavado con ácido de levadura destinada para su reutilización y el uso de antibióticos durante la fermentación (Hynes, 1997). Un aumento de la tasa de inoculación de levadura de 3×10^7 UFC/mL de macerado produjo más de 80 % de disminución en la producción de ácido láctico por *L. plantarum* y más de 55 % de disminución en la producción de ácido láctico por *L. paracasei*, cuando el macerado se infectó con 1×10^8 lactobacilos/mL (Narendranath, 2004; Bischoff, 2009).

15 Se han probado diversos agentes para el control de contaminantes bacterianos en condiciones de laboratorio que incluyen antisépticos tales como peróxido de hidrógeno, metabisulfito de potasio y 3,4,4'-triclorocarbanilida y antibióticos tales como penicilina, tetraciclina, monensina y virginiamicina. La penicilina y la virginiamicina se comercializan actualmente para tratar infecciones bacterianas de la fermentación del etanol para combustibles y algunas instalaciones usan estos antibióticos profilácticamente (Skinner, 2004).

20 Si no se usan antibióticos, es común una pérdida de 1 a 5 % en el rendimiento de etanol. Una planta de etanol para combustible de cincuenta millones de galones (189,3 millones de litros) con un nivel de ácido láctico de 0,3 % p/p en su cerveza de destilería pierde aproximadamente 570.000 galones (2,2 millones de litros) de etanol cada año debido a la contaminación bacteriana (Maye, 2006). En ausencia de un antibiótico, los números bacterianos aumentaron desde 1×10^6 UFC/mL hasta 6×10^6 UFC/mL durante un periodo de fermentación de 48 horas y se produjeron 5,8 mg de ácido láctico (Hynes, 1997).

25 Un programa de control bacteriano muy eficaz implica el uso de virginiamicina. Algunas características de la virginiamicina son a) a bajas concentraciones, por ejemplo, 0,3 a 5 ppm, es eficaz contra varios microorganismos que incluyen lactobacilos, b) los microorganismos no tienden a desarrollar resistencia, c) no inhibe significativamente la levadura, d) no se afecta por el pH o la concentración de alcohol, y e) se inactiva durante la destilación del etanol, por tanto no queda residuo en el alcohol o los granos destilados (Bayrock, 2007, Narendranath, 2000; Hynes, 1997).

30 Actualmente, la virginiamicina es el único antibiótico que se conoce que se usa en la planta de molienda en seco (Bischoff, 2007). La dosis recomendada de virginiamicina en las fermentaciones de etanol para combustible es, en general, 0,25 a 2,0 ppm (Bischoff, 2009), pero la concentración inhibidora mínima (CIM) varía desde 0,5 hasta más de 64 ppm (Hynes, 1997).

35 Se podrían controlar selectivamente *L. fermentum* por peróxido de hidrógeno a concentraciones de 1 a 10 mM en un proceso de fermentación de etanol (Narendranath, 2000). El *Lactobacillus* no tienen la enzima catalasa, por lo que no puede descomponer el peróxido de hidrógeno y, por tanto, es incapaz de eliminar su efecto tóxico (Narendranath, 2000).

40 Se ha usado peróxido de hidrógeno de urea (UHP) como antiséptico para administraciones tópicas sobre heridas y contra la gingivitis y la placa dental (Narendranath, 2000) y también sirve de antibacteriano durante la fermentación. El UHP no solo presenta excelente actividad bactericida contra *Lactobacillus*, sino que también tiene la ventaja importante de proporcionar nitrógeno utilizable en forma de urea para estimular el crecimiento de la levadura y las tasas de fermentación (Narendranath, 2000).

45 Otros métodos de control de la contaminación bacteriana incluyen el uso de sulfitos. Los sulfitos demuestran actividad bactericida solo en presencia de oxígeno y fueron más eficaces en destruir *L. casei* facultativa que en poseer altos niveles de enzimas relacionadas con peróxido de hidrógeno, que incluyen peroxidasa (Chang, 1997). También disminuyó la carga bacteriana cuando la concentración de sulfito varió desde 100 hasta 400 mg/L, pero solo en presencia de oxígeno. Esta concentración no afectó las poblaciones de levadura (Chang, 1997).

50 Un agente presente en el sobrenadante de cultivos de levadura reduce el crecimiento de lactobacilos. Todavía no se ha caracterizado este compuesto, aunque se conoce que es resistente a la congelación, inestable a altas temperaturas y se destruye cuando se mantiene a 90 °C durante 20 minutos (Oliva Neto 2004).

El ácido succínico por sí mismo a niveles de 600 mg/L reduce las concentraciones de *Lactobacillus* en 78 %, en presencia de etanol esa reducción es hasta 96 % (Oliva-Neto 2004).

55 Se ha desarrollado un inhibidor de la adherencia microbiana en forma de anticuerpos contra huevos de aves de corral y específicos contra microorganismos productores de ácido láctico para su uso en fermentadores (Nash 2009).

Solo los estudios de laboratorio han mostrado que los anticuerpos, productos de sulfito y peróxido pueden ser beneficiosos en controlar los lactobacilos, un problema con estos productos es la disminución en la concentración debido a la oxidación y la descomposición de los productos químicos que requerirán la monitorización constante de todo el proceso de fermentación para mantener una concentración eficaz. Se ha observado una disminución de la susceptibilidad a virginiamicina en lactobacilos aislados de plantas de etanol de molienda en seco que usan virginiamicina y también se ha informado de la emergencia de cepas aisladas con multi-resistencia a fármaco a tanto penicilina como a virginiamicina (Bischoff 2009). Así, se necesitan alternativas para prevenir la disminución del rendimiento de etanol de la fermentación de hidratos de carbono.

REFERENCIAS

- 5 Bayrock, Dennis, 2007. Method of reducing the growth of lactobacillus in a process of ethanol production by yeast fermentation comprising adding a pristinamycin type antimicrobial agent and/or a polyether ionophore antimicrobial agent dissolved in an organic solvent. Patente PCT N° WO 2007/145858
- Bayrock, D.P., K.C.Thomas and W.M. Ingledew, 2003. Control of Lactobacillus contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin. *G. App. Microbiol. Biotechnol* 62: 498-502.
- 15 Bayrock, D. and W.M. Ingledew, 2001. Changes in steady state on introduction of a lactobacillus contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. *J. Industrial Microbiology and Biotechnology* 27: 39-45.
- Bischoff, K.M., S. Liu, T.D. Leathers and R.E. Worthington, 2009. Modeling bacterial Contamination of Fuel Ethanol Fermentation. *Biotechno. Bioeng.* 103: 117-122.
- 20 Bischoff, K.M., K.A. Skinner-Nemec and T.D. Leathers, 2007. Antimicrobial susceptibility of Lactobacillus species isolated from commercial ethanol plants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- Chang I.N., B.H. Kim and P.K. Shin, 1997. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 63(1): 1-6.
- Dien, B.S., M.A. Cotta and T.W. Jeffries, 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 258-266.
- 25 Hynes, S.H., Kjarsgaard, K.C. Thomas and W.M. Ingledew, 1997. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *J Industrial Microbiology and Biotechnology* 18: 284-291.
- Majovic, L, S. Nikolic, M. Rakin and M. Vukasinovic, 2006. Production of Bioethanol from Corn Meal Hydrolyzates. *Fuel* 85: 1750-1755.
- Maye, John P., 2006. Use of hop acids in fuel ethanol production. Solicitud de patente de EE. UU. N° 20060263484
- 30 Narendranath, N.V. and R. Power, 2004. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminant lactobacilli during fermentation of corn mash. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 581-584.
- Narendranath, N.V., K.C. Thomas and W.M. Ingledew, 2000. Urea hydrogen peroxide reduces the number of lactobacilli, nourish yeast, leaves no residues in the ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 66(10): 4187-4192.
- 35 Nash, Peter, et al 2009. Immunogen adherence inhibitor directed to lactobacillus organisms and method of making and using it. Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20090117129
- Oliva Neto, P., M.A. Ferreira and F. Yokoya, 2004. Screening for yeast with antibacterial properties from ethanol distillery. *Bioresource Technology* 92: 1-6.
- RFA "Renewable Fuels Association 2006 and 2009.
- 40 Skinner-Nemec, K.A., N. N Nichols and T.D. Leathers, 2007. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 29: 379-383.
- Skinner, K.A. and T.D. Leathers, 2004. Bacterial Contaminants of Fuel Ethanol Production. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 31: 401-408.
- 45 Thomas, K.C., S.H. Hynes and W.M. Ingledew, 2001. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation on corn mash. *J. Applied Microbiology* 90: 819-828.
- El documento de patente WO-A-2009/010836 desvela un método de producción de un producto basado en fermentación que comprende fermentar un medio que contiene azúcar con levadura en presencia de un biocida orgánico y un compuesto de amonio cuaternario, en cantidades suficientes para reducir o controlar una población bacteriana en el medio que contiene azúcar.

El documento de patente WO-A-2009/001205 desvela un método de producción de un producto basado en fermentación que comprende fermentar un medio que contiene azúcar con levadura en presencia de un aditivo seleccionado del grupo que consiste en monoaldehídos y dialdehídos alifáticos y aromáticos; fenólicos no halogenados y sus sales de sodio y de potasio correspondientes; compuestos que liberan formaldehído tras el contacto con agua;

5

El documento de patente US-A1-2007/292919 desvela un método de mejora de la producción de un compuesto orgánico no terpénico por un microorganismo en un medio de fermentación, comprendiendo el método añadir al medio de fermentación una combinación de un terpeno y un tensioactivo.

10

SUMARIO DE LA INVENCION

Es un objeto proporcionar una composición química que previene la "fermentación atascada" durante la producción de etanol inhibiendo o reduciendo el crecimiento de *Lactobacillus spp.* y otras bacterias durante la fermentación de maíz, otro almidón o material basado en celulosa.

15

Es un objeto de la invención proporcionar un método de fermentación de hidratos de carbono en etanol, que comprende:

a) tratar el hidrato de carbono que se va a fermentar con una composición que contiene

10 - 90 % en peso de formaldehído,

20

1 - 50 % en peso de un tensioactivo que tiene un HLB desde 4 hasta 18,

1 - 20 % en peso de un terpeno antimicrobiano, o aceites esenciales que comprenden terpenos,

1 - 50 % en peso de ácidos orgánicos seleccionados de ácidos grasos C₁ a C₂₄, sus sales, glicéridos y ésteres de los mismos, y

1 - 50 % en peso de agua;

25

b) fermentar dicho hidrato de carbono tratado en presencia de levadura y/o una enzima en el caldo de fermentación, y

c) aislar el etanol,

en donde el hidrato de carbono que se va a fermentar es maíz.

También se describe un método de aumento de la producción de etanol en un sistema de fermentación inicialmente atascado añadiendo una composición que comprende:

30

a) 10 - 90 % en peso de un aldehído seleccionado del grupo que consiste en formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído y mezclas de los mismos,

b) 1 - 50 % en peso de un tensioactivo que tiene un HLB desde 4 hasta 18,

c) 1 - 20 % en peso de un terpeno antimicrobiano, o aceites esenciales,

35

d) 1 - 50 % en peso de ácidos orgánicos seleccionados de ácidos grasos C₁ a C₂₄, sus sales, glicéridos y ésteres de los mismos, y

e) 1 - 50 % en peso de agua.

También se describe un método de reducción del uso de antibióticos durante la fermentación de hidratos de carbono añadiendo al sistema de fermentación una composición que comprende:

40

a) 10 - 90 % en peso de un aldehído seleccionado del grupo que consiste en formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído y mezclas de los mismos,

b) 1 - 50 % en peso de un tensioactivo que tiene un HLB desde 4 hasta 18

c) 1 - 20 % en peso de un terpeno antimicrobiano, o aceites esenciales,

45

d) 1 - 50 % en peso de ácidos orgánicos seleccionados de ácidos grasos C₁ a C₂₄, sus sales, glicéridos y ésteres de los mismos, y

e) 1 - 50 % en peso de agua.

Es otro objeto de la invención reducir la presencia de antibióticos en el subproducto resultante de la fermentación de hidratos de carbono, por ejemplo, granos destilados, gluten de maíz y otros.

5 Es otro objeto de la invención reducir los residuos de antibióticos en productos animales alimentando a los animales subproductos de fermentación resultantes de no antibióticos, sino los sustratos tratados de la presente invención.

Es otro objeto inhibir el desarrollo de cepas resistentes a antibióticos de bacterias que ocurren durante la fermentación.

Es otro objeto aumentar el rendimiento de etanol a partir de hidrato de carbono fermentado.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Definiciones

10 La "fermentación atascada" ocurre cuando la fermentación del almidón en etanol es incompleta y se ha detenido debido a una alta concentración bacteriana y contenido de ácido en el fermentador.

El "porcentaje en peso" (% en peso) de un componente se basa en el peso total de la formulación o composición en la que está incluida el componente.

"Aldehído" incluye formaldehído, paraformaldehído y otros aldehídos activos.

15 "Ácido orgánico" incluye ácido fórmico, acético, propiónico, butírico y otros ácidos grasos C₁ a C₂₄, o mono-, di-, o triglicéridos de ácidos grasos C₁ a C₂₄ orgánicos o sus ésteres.

20 "Terpeno antimicrobiano" puede incluir disulfuro de alilo, citral, pineno, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, anetol, alcanfor, mentol, limoneno, farnesol, caroteno, timol, borneol, mirceno, terpeneno, linalool, o mezclas de los mismos. Más específicamente, los terpenos pueden comprender disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, limoneno, carvacrol y carvona, o mezclas de los mismos. El componente terpénico puede incluir otros terpenos con propiedades antimicrobianas y aceites esenciales.

Las bacterias que pueden interferir con la fermentación del etanol incluyen Lactobacillus y Leuconostoc, que provocan la mayoría de los problemas. Otras de dichas bacterias incluyen Pediococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus y Clostridia.

25 En el etanol producido a partir de maíz, los antibióticos son el biocida común, por ejemplo, virginiamicina, penicilina, clindamicina, tilosina, cloranfenicol, cefalosporina y tetraciclina.

30 Sin embargo, en el etanol producido a partir de caña de azúcar, puesto que el producto final no se alimenta a los animales, se pueden usar otros biocidas puesto que los residuos no presentan el mismo problema. En tales casos, los biocidas adecuados incluyen carbamatos, compuestos de amonio cuaternario, fenoles y antibióticos (por ejemplo, virginiamicina, penicilina, clindamicina, tilosina, cloranfenicol, cefalosporina y tetraciclina).

El término "cantidad eficaz" de un compuesto significa una cantidad capaz de realizar la función o tener la propiedad para la que se expresa la cantidad eficaz, tal como una cantidad no tóxica pero suficiente para proporcionar beneficios antimicrobianos. Así, un experto habitual en la técnica puede determinar una cantidad eficaz por experimentación sistemática.

35 Las formulaciones varían no solo en las concentraciones de los principales componentes, por ejemplo, formaldehído, los ácidos orgánicos, sino también en el tipo de terpenos, tensioactivo(s) y concentración de agua. La presente invención se puede modificar añadiendo el terpeno, tipo de ácido orgánico y usando otro tipo de tensioactivo, dentro del alcance de las reivindicaciones.

Composición (composiciones)

40 En general, una composición usada en el método de la invención contiene:

a) 10 - 90 % en peso de formaldehído,

b) 1 - 50 % en peso de un tensioactivo que tiene un HLB desde 4 hasta 18,

c) 1 - 20 % en peso de un terpeno antimicrobiano, o aceites esenciales que comprenden terpenos,

45 d) 1 - 50 % en peso de un ácido orgánico o mezclas de ácidos orgánicos seleccionados de ácido acético, propiónico, butírico, u otros ácidos grasos C₁ a C₂₄, formas de sal, glicéridos y ésteres de los mismos, y,

e) 1 - 50 % en peso de agua.

Los terpenos antimicrobianos, extractos vegetales o aceites esenciales que contienen terpenos se pueden usar en las composiciones de la presente invención, así como los terpenos más purificados. Los terpenos están fácilmente disponibles comercialmente o se pueden producir por métodos conocidos en la técnica, tales como extracción con disolvente o extracción con vapor de agua/destilación o síntesis química.

- 5 El tensioactivo es no iónico, que incluye tensioactivos de aceite de ricino etoxilado con 1 a 200 moléculas de etileno distribuidas normalmente alrededor de la media, preferentemente una media de 10 a 80. Se pueden usar otros tensioactivos con características similares que incluyen tensioactivos Tween.

Métodos

- 10 La presente invención es eficaz contra bacterias. Los ejemplos de estos agentes infecciosos incluyen *Lactobacillus spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Brachyspira spp.*, *Listeria spp.*, *Arcobacter spp.* y otros.

La mezcla de la presente invención se aplica por una boquilla de pulverización.

La mezcla se aplica de manera que se proporcione una distribución uniforme y homogénea en todo el sustrato de hidrato de carbono.

- 15 En toda esta memoria descriptiva se hace referencia a diversas patentes y publicaciones. Las divulgaciones de cada documento se incorporan por este documento como referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Este ejemplo muestra la formulación del producto basado en formaldehído usado en ejemplos posteriores

Fórmula A	
Ingrediente	(%)
Formalina (37 %)	90,00
Acido propiónico	9,00
d-Limoneno (terpeno)	0,35
T-Maz 80 (tensioactivo)	0,65

20

EJEMPLO 2

El objetivo de este estudio era determinar el efecto de una fórmula A sobre la supervivencia de *Lactobacillus*.

Material y métodos:

- 25 Se obtuvo *Lactobacillus plantarum* (B-4496) de USDA-Microbial Genomics and Bioprocessing Research en Illinois. Se cultivó *L. plantarum* en caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe) de lactobacilos Difco™. Se diluyó el cultivo de caldo con agua de peptona estéril para obtener diferentes concentraciones de *Lactobacillus*. Las diluciones se trataron con diferentes concentraciones de fórmula A (0, 1, 2 y 3 kg/MT) y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (20 °C). Después de la incubación, se tomaron muestras por triplicado y se dispusieron en caldo MRS que contenía 1,5 % de agente solidificante granulado de agar Difco™. Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche y se numeraron las colonias después de 24 horas. Las UFC/mL promedio para cada tratamiento se muestran en la siguiente
- 30 tabla:

Tratamiento	Lactobacillus (UFC/mL)						
Control (0 kg/MT)	4,1 x 10 ⁷	4,8 x 10 ⁶	5,2 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁴	3,3 x 10 ²	5,3 x 10 ¹	4,0 x 10 ⁰
Fórmula A - 1 kg/MT	5,0 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁵	8,6 x 10 ⁵	7,9 x 10 ³	0	0	0
Fórmula A - 2 kg/MT	0	0	0	0	0	0	0
Fórmula A - 3 kg/MT	0	0	0	0	0	0	0

Se observó que el uso de 2 kg/MT de producto basado en formaldehído redujo el crecimiento de *Lactobacillus* en un cultivo que contenía 10^7 UFC/mL.

EJEMPLO 3

5 El objetivo de este estudio era determinar el efecto de la fórmula A sobre la supervivencia de levadura y *Lactobacillus* durante la fermentación.

Material y métodos:

10 Se mezcló maíz estéril finamente molido con agua estéril en un fermentador de vidrio. A continuación, se añadió una disolución de enzima comercial que contenía mezcla de alfa-amilasa y glucoamilasa (Stargen: Genencor) para el procesamiento del almidón no cocido. Se añadió levadura Fali (10^{10} UFC/g; Fleischmann) usada como levadura fermentativa a las mezclas de suspensión de maíz mientras se mezclaba. Finalmente, se usó *Lactobacillus plantarum* (B-4496), obtenido de USDA-Microbial Genomics and Bioprocessing Research en Illinois y se cultivó en caldo MRS de lactobacilos Difco™, como el contaminante bacteriano representativo del fermentador. Se añadió un producto basado en formaldehído como etapa final del proceso.

15 Los tratamientos usados se muestran en la siguiente tabla. Las muestras tomadas a las 4 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 horas se analizaron para recuentos de levadura y *Lactobacillus*. Los tratamientos son los siguientes:

Tratamiento	Maíz	Agua	Enzima	Levadura (10^{10} UFC/g)	<i>Lactobacillus</i> (10^7 UFC/mL)
Control	20 g	40 mL	0,04 mL	1 g	0,02 mL
Fórmula A (1 kg/MT)	20 g	40 mL	0,04 mL	1 g	0,02 mL

Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tratamiento	Levadura (UFC/mL)				
	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	$6,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^{11}$
Fórmula A (1 kg/MT)	$7,9 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^9$	$4,8 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^9$

Tratamiento	<i>Lactobacillus</i> (UFC/mL)				
	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	$7,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^{12}$	$2,2 \cdot 10^8$
Fórmula A (1 kg/MT)	$6,4 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^{12}$	$9,0 \cdot 10^7$

20 Se observó que 1 kg/ton del producto basado en formaldehído disminuyó el nivel de *Lactobacillus*, pero no afectó el nivel de levadura.

EJEMPLO 4

El objetivo de este estudio era determinar el efecto de la fórmula A sobre la supervivencia de levadura y *Lactobacillus* durante la fermentación.

25 Material y métodos:

30 Se obtuvo maíz completo naturalmente contaminado de una fuente comercial. Se encontró que el recuento de *Lactobacillus* que existe de forma natural en el maíz era 300 UFC/g. En este estudio se trató maíz completo con la fórmula A a 0, 1, 2 y 3 kg/MT. Después de 24 h, se molieron finamente 20 g de maíz de cada tratamiento y se añadieron a fermentadores de vidrio con agua, enzima y levadura como se describe a continuación. Se analizaron las muestras tomadas a las 4, 24, 48 y 72 horas para recuentos de levadura y *Lactobacillus*. Los tratamientos son los siguientes:

Tratamiento	Maíz (g)	Agua (mL)	Enzima (mL)	Levadura (10 ¹⁰ UFC/g)
Control	20	40	0,04	1 g
Fórmula A (1 kg/MT)	20	40	0,04	1 g
Fórmula A (2 kg/MT)	20	40	0,04	1 g
Fórmula A (3 kg/MT)	20	40	0,04	1 g

Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

Tratamiento	Levadura (UFC/mL)			
	4 h	24 h	48 h	72 h
Control	1,45 x 10 ⁹	1,0 x 10 ⁹	1,74 x 10 ⁹	1,98 x 10 ⁹
Fórmula A (1 kg/MT)	2,33 x 10 ⁹	2,0 x 10 ⁹	1,90 x 10 ⁹	1,33 x 10 ⁹
Fórmula A (2 kg/MT)	1,78 x 10 ⁹	1,8 x 10 ⁹	1,92 x 10 ⁹	1,54 x 10 ⁹
Fórmula A (3 kg/MT)	2,03 x 10 ⁹	3,3 x 10 ⁹	1,58 x 10 ⁹	1,02 x 10 ⁹

Tratamiento	Lactobacillus (UFC/mL)		
	24 h	48 h	72 h
Control	3,1 x 10 ⁴	1,2 x 10 ⁶	1,24 x 10 ⁷
Fórmula A (1 kg/MT)	1,6 x 10 ³	2,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶
Fórmula A (2 kg/MT)	3,0 x 10 ²	1,4 x 10 ⁴	3,9 x 10 ⁵
Fórmula A (3 kg/MT)	2,0 x 10 ²	0	0

- 5 Se observó que el uso de la fórmula A no afectó el crecimiento de levadura y disminuyó el número de Lactobacillus hasta 0 al nivel de tratamiento más alto.

EJEMPLO 5

El objetivo de este estudio era determinar el efecto de la fórmula A sobre la supervivencia de levadura y Lactobacillus durante la fermentación.

- 10 Material y métodos:

Se obtuvo maíz completo naturalmente contaminado de una fuente comercial. Se encontró que el recuento de Lactobacillus que existe de forma natural en el maíz era 300 UFC/g. En este estudio se trató maíz completo con la fórmula A a 0, 1, 2 y 3 kg/MT. Después de 24 h, se molieron finamente 20 g de maíz de cada tratamiento y se añadieron a fermentadores de vidrio con agua, enzima y levadura como se describe a continuación. Se añadió *Lactobacillus plantarum* (B-4496) cultivado en caldo MRS a las botellas de fermentación (0,1 mL de 6,2 x 10⁵ UFC/mL). Se tomaron muestras después de 72 horas de fermentación para recuentos de levadura y de Lactobacillus. Los tratamientos se enumeran en la siguiente tabla.

- 15

Tratamiento	Maíz (g)	Agua (mL)	Enzima (mL)	Levadura (10 ¹⁰ UFC/g)	<i>L. plantarum</i> (6,2 x 10 ⁵ UFC/mL)
Control	20	40	0,04	1 g	0,1 mL
Fórmula A (1 kg/MT)	20	40	0,04	1 g	0,1 mL
Fórmula A (2 kg/MT)	20	40	0,04	1 g	0,1 mL
Fórmula A (3 kg/MT)	20	40	0,04	1 g	0,1 mL

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tratamiento	Levadura (UFC/mL)	Lactobacillus (UFC/mL)
	72 h	72 h
Control	$3,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^7$
Fórmula A (1 kg/MT)	$2,8 \times 10^8$	$8,5 \times 10^5$
Fórmula A (2 kg/MT)	$4,3 \times 10^8$	$7,5 \times 10^4$
Fórmula A (3 kg/MT)	$5,7 \times 10^8$	$5,0 \times 10^3$

No hubo efecto del tratamiento químico sobre la concentración de levadura. Los recuentos de Lactobacillus disminuyeron a medida que aumentó el nivel de tratamiento químico en el maíz.

5 **EJEMPLO 6**

El objetivo de este estudio era determinar el efecto de la fórmula A sobre la supervivencia de levadura y Lactobacillus durante la fermentación.

Material y métodos:

10 Se obtuvo maíz completo naturalmente contaminado de una fuente comercial. Se encontró que el recuento de Lactobacillus que existe de forma natural en el maíz era 300 UFC/g. En este estudio se trató maíz completo con la fórmula A a 0, 1, 2 y 3 kg/MT. Después de 24 h, se molieron finamente 20 g de maíz de cada tratamiento y se añadieron a fermentadores de vidrio con agua, enzima y levadura como se describe a continuación. Se añadió *Lactobacillus plantarum* (B-4496) cultivado en caldo MRS a las botellas de fermentación (0,1 mL de $6,2 \times 10^5$ UFC/mL). Se tomaron muestras después de 72 horas de fermentación para recuentos de levadura y de *Lactobacillus*.

15

Tratamiento	Maíz (g)	Agua (mL)	Enzima (mL)	Levadura (10^{10} UFC/g)	<i>L. plantarum</i> ($6,2 \times 10^5$ UFC/mL)
Control	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
Fórmula A (1 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
Fórmula A (2 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
Fórmula A (3 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL

Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tratamiento	Levadura (UFC/mL)	Lactobacillus (UFC/mL)
	72 h	72 h
Control	$9,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$
Fórmula A (1 kg/MT)	$1,25 \times 10^9$	$7,4 \times 10^4$
Fórmula A (2 kg/MT)	$7,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^4$
Fórmula A (3 kg/MT)	$9,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^4$

20 No hubo efecto del tratamiento químico sobre la concentración de levadura. Los recuentos de Lactobacillus disminuyeron a medida que aumentó el tratamiento químico en el maíz.

EJEMPLO 7

El objetivo de este estudio era determinar el efecto del formaldehído sobre la supervivencia de levadura y lactobacillus durante la fermentación.

Material y métodos:

Se trató maíz completo obtenido de una fuente comercial con formalina (disolución al 37 % de formaldehído) a 0, 0,9, 1,8 y 2,7 kg/MT. Después de 24 h, se trituraron finamente 30 g de maíz de cada tratamiento y se añadieron a fermentadores de vidrio con agua, enzima y levadura como se describe a continuación.

- 5 Se añadió *Lactobacillus plantarum* (B-4496) cultivado en caldo MRS a las botellas de fermentación (0,2 mL de $6,2 \times 10^5$ UFC/g). Se tomaron muestras después de 72 horas de fermentación para los recuentos de levadura y *Lactobacillus*. Se centrifugó el contenido total de las botellas de fermentación durante 30 minutos a 5000 rpm, se filtró a través de estopilla y a través de un filtro de 0,45 μ para cuantificar la producción de etanol. Los tratamientos se enumeran en la siguiente tabla.

	Maíz (g)	Agua (mL)	Enzima (mL)	Levadura (10^{10} UFC/g)	<i>L. plantarum</i> ($6,2 \times 10^5$ UFC/mL)
Control	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
Formaldehído (0,9 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
Formaldehído (1,8 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
Formaldehído (2,7 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL

10

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tratamiento	Levadura (UFC/mL)	Lactobacillus (UFC/mL)
	72 h	72 h
Control	$1,3 \times 10^9$	0
Formaldehído (0,9 kg/MT)	$9,50 \times 10^8$	0
Formaldehído (1,8 kg/MT)	$6,60 \times 10^8$	0
formaldehído (2,7 kg/MT)	$4,20 \times 10^8$	0

Conclusiones:

1. El inóculo de *Lactobacillus plantarum* no se multiplicó en ninguno de los tratamientos.
- 15 2. Pareció que el uso de disolución al 37 % de formaldehído tenía un efecto negativo sobre el crecimiento de la levadura.

EJEMPLO 8

El objetivo de este estudio era determinar el efecto del formaldehído sobre la supervivencia de levadura y *Lactobacillus* durante la fermentación.

20 Material y métodos:

Se trató maíz completo obtenido de una fuente comercial con disolución al 37 % de formaldehído a 0, 0,9, 1,8 y 2,7 kg/MT. Después de 24 h, se molieron finamente 30 g de maíz de cada tratamiento y se añadieron a fermentadores de vidrio con agua, enzima y levadura como se describe a continuación. Se añadió *Lactobacillus plantarum* (B-4496) cultivado en caldo MRS a las botellas de fermentación (0,1 mL de $6,2 \times 10^{10}$ UFC/mL). Se tomaron muestras después

25

de 72 horas de fermentación para recuentos de levadura y de *Lactobacillus*. Se centrifugó el contenido completo de las botellas de fermentación durante 30 minutos a 5000 rpm, se filtró a través de estopilla y a través de un filtro de 0,22 μ para cuantificar la producción de etanol. Los tratamientos se enumeran en la siguiente tabla.

Tratamiento	Maíz (g)	Agua (mL)	Enzima (mL)	Levadura (10^{10} UFC/g)	<i>L. plantarum</i> ($6,2 \times 10^5$ UFC/mL)
Control	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
formaldehído (0,9 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
formaldehído (1,8 kg/MT)	30	100	0,15	2 g	0,2 mL
formaldehído (2,7 kg/MT)	30	100	0,151	2 g	0,2 mL

Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tratamiento	Levadura (UFC/mL)	Lactobacillus (UFC/mL)
	72 h	72 h
Control	$1,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^8$
Formaldehído (0,9 kg/MT)	$8,8 \times 10^8$	$9,8 \times 10^7$
Formaldehído (1,8 kg/MT)	$6,6 \times 10^8$	$4,7 \times 10^7$
Formaldehído (2,7 kg/MT)	$8,0 \times 10^8$	$3,7 \times 10^7$

Resultados de densidad	
Tratamiento	Peso de 10 mL de sobrenadante (g)
Control (agua)	10,0466
Formaldehído (0,9 kg/MT)	10,0090
Formaldehído (1,8 kg/MT)	10,0183
Formaldehído (2,7 kg/MT)	10,0073
Etanol	7,9438

Conclusiones:

- 5 1. El formaldehído produce una ligera disminución (1 log) en UFC cuando se añadió Lactobacillus a concentraciones más altas.
2. El formaldehído disminuyó ligeramente la concentración de levadura.
3. El tratamiento con formaldehído disminuyó la densidad de la disolución de fermentación que indica un aumento en el contenido de etanol.

10 Ejemplos 9-12

Se analizaron la producción de etanol y el perfil microbiológico en cuatro estudios de fermentación usando maíz tratado con 0 (control), 0,45 y 0,90 kg/MT de formaldehído. Se mezclaron maíz molido y agua y se incubaron a temperatura ambiente en un frasco fermentador estanco al aire de 250 mL durante 6 horas. Esto se hizo para aumentar el Lactobacillus que existe de forma natural en el maíz. Estudios previos han mostrado que el nivel de Lactobacillus es inferior a 100 UFC/g en maíz. Los otros reactivos se añadieron a los fermentadores como se describe en la siguiente tabla.

Tratamiento	Maíz (g)	Agua (mL)	Enzima (mL)	Levadura (10^{10} UFC/g)
Control - 0 kg/MT	30	100	0,20	1,0 g
Formaldehído - 0,45 kg/MT	30	100	0,20	1,0 g
Formaldehído - 0,90 kg/MT	30	100	0,20	1,0 g

Después de la adición de todos los reactivos, se taparon los fermentadores con una tapa que contenía una trampa de agua. Los fermentadores se mantuvieron con agitación constante (baja velocidad) a temperatura ambiente (21-23 °C) durante 72 horas antes del muestreo de levadura, Lactobacillus y la producción de alcohol. Los recuentos de Lactobacillus se determinaron en caldo MRS que contenía 1,5 % de agar Difco™. Se incubaron las placas en una cámara anaerobia a 37 °C durante 48 horas y se numeraron las colonias. Se determinaron los recuentos de levadura en placas PDA. Las placas se incubaron a 27 °C durante 48 horas y se numeraron las colonias. Se determinó el alcohol por FT-IR (sistema FOSS).

Perfil microbiológico (UFC/g) después de 72 h de fermentación							
Tratamiento	Estudio 9		Estudio 10		Estudio 11	Estudio 12	
	Levadura	Lactobacillus	Levadura	Lactobacillus	Levadura	Levadura	Lactobacillus
Control	$1,1 \times 10^9$	$1,1 \times 10^9$	$7,3 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$4,7 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$
Formaldehído 0,45 kg/MT	$9,5 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^9$	$5,2 \times 10^8$	$4,7 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$8,9 \times 10^8$
Formaldehído 0,9 kg/MT	$7,4 \times 10^8$	$7,4 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$	$3,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$9,4 \times 10^8$

Concentración de etanol (%) en líquido fermentado			
Estudio	Tratamiento con formaldehído		
	control	0,45 kg/MT	0,90 kg/MT
9	9,3	9,7	10,3
10	9,6	9,4	9,6
11	8,9	9,1	9,2
12	8,3	8,6	8,3
Promedio	9,025	9,2	9,35
% de incremento		2 %	3,60 %

A partir de estos estudios, los presentes inventores pueden llegar a la conclusión de que el tratamiento de maíz con formaldehído mejoró el rendimiento del etanol. Este efecto parece ser debido al control de Lactobacillus.

5 Ejemplos 13-16

Se determinaron el perfil de Lactobacillus y de levadura/moho natural en cuatro estudios usando maíz tratado con 0 (control), 0,45 y 0,90 kg/MT de formaldehído (HCHO). Se mezclaron maíz molido y agua y se incubaron a temperatura ambiente (21-23 °C) en un entorno anaerobio durante 24 horas. A 5 g de maíz molido se añadieron 45 mL de Butterfield y se incubó durante la noche en un recipiente cerrado mientras se agitaba a temperatura ambiente. Después de la incubación, se tomaron las muestras para numerar levadura/moho y Lactobacillus natural. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Perfil microbiológico (UFC/g) después de 24 h de incubación								
Tratamientos	Estudio 1		Estudio 2		Estudio 3		Estudio 4	
	Levadura	Lactobacillus	Levadura	Lactobacillus	Levadura	Lactobacillus	Levadura	Lactobacillus
Control	$1,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$
Formaldehído 0,45 kg/MT	$3,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$
Formaldehído 0,9 kg/MT	$7,6 \times 10^4$	$6,2 \times 10^4$	$5,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^5$	$8,1 \times 10^4$

Estos estudios mostraron una reducción en los niveles de Lactobacillus y levadura/moho en maíz tratado con formaldehído.

REIVINDICACIONES

1. Un método de fermentación de hidrato de carbono en etanol, que comprende:
 - a) tratar el hidrato de carbono que se va fermentar con una composición que contiene
 - 10 - 90 % en peso de formaldehído,
 - 5 1 - 50 % en peso de un tensioactivo que tiene un HLB desde 4 hasta 18,
 - 1 - 20 % en peso de un terpeno antimicrobiano, o aceites esenciales que comprenden terpenos,
 - 1-50 % en peso de ácidos orgánicos seleccionados de ácidos grasos C₁ a C₂₄, sus sales, glicéridos y ésteres de los mismos, y
 - 1 - 50 % en peso de agua;
 - 10 b) fermentar dicho hidrato de carbono tratado en un caldo de fermentación que contiene levadura y formaldehído, y
 - c) aislar etanol;
- en donde el hidrato de carbono que se va fermentar es maíz.
- 15 2. El método de fermentación de la reivindicación 1, en donde el material que queda después de dicho método se recoge y se añade a un pienso para animales.
 3. El método de fermentación de la reivindicación 1 o 2, en donde el ácido orgánico es ácido fórmico, acético, propiónico o butírico.
 4. El método de fermentación de la reivindicación 1 o 2, que comprende un antibiótico para controlar *Lactobacillus* en una cantidad que es inferior a su CIM determinada en fermentaciones sin la composición de la etapa a).
 - 20 5. El método de fermentación de la reivindicación 1 o 2, que está libre de antibióticos que se usan para controlar bacterias en fermentación.
 6. El método de fermentación de la reivindicación 1 o 2, que está libre de virginiamicina.