



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 342 868**

② Número de solicitud: 200750079

⑤ Int. Cl.:

A23K 1/06 (2006.01)

A23K 1/02 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.06.2006**

⑩ Prioridad: **07.06.2005 FR 05/05762**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **15.07.2010**

Fecha de la concesión: **12.04.2011**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **26.04.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.04.2011

⑦ Titular/es: **Institut de la Recherche pour le
Developpement (I.R.D.)
213, rue La Fayette
F-75480 Paris Cédex 10, FR
Universidad Autónoma Metropolitana (U.A.M.I.)**

⑦ Inventor/es: **Christen, Pierre;
Domenech, Fidel y
Revah-Moissev, Sergio**

⑦ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

④ Título: **Procedimiento de enriquecimiento de residuos lignocelulósicos con proteínas de levadura.**

⑦ Resumen:

Procedimiento de enriquecimiento de residuos lignocelulósicos con proteínas de levadura.

La presente invención se refiere al uso de melaza de caña de azúcar y de vinaza de destilería, para la realización de un procedimiento de enriquecimiento de residuos lignocelulósicos, en particular de bagazo o de paja, con proteínas de levadura.

La presente invención se refiere asimismo a dicho procedimiento de enriquecimiento de residuos lignocelulósicos, así como al producto obtenido.

ES 2 342 868 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

ES 2 342 868 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de enriquecimiento de residuos lignocelulósicos con proteínas de levadura.

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de enriquecimiento de un residuo lignocelulósico, por ejemplo de bagazo de caña de azúcar, con proteínas de levadura, que comprende en particular el uso de melaza de caña de azúcar y de vinaza de destilación. La presente invención tiene asimismo por objeto el bagazo enriquecido tal como se ha obtenido.

10 Ciertos vertidos de refinerías de azúcar y de destilerías de alcohol son nocivos para el medioambiente. En efecto, la industria azucarera produce dos toneladas de bagazo de caña de azúcar, que es un residuo sólido lignocelulósico fibroso procedente de la trituración de la planta, por tonelada de azúcar refinada, lo que representa en Cuba de 10 a 20 millones de toneladas de bagazo por año. Otro subproducto contaminante es la melaza de caña de azúcar que es un residuo líquido muy rico en azúcares y en ciertas sales minerales. Además, las destilerías de alcohol, frecuentemente asociadas con la producción de azúcar de caña, emiten grandes cantidades de compuestos volátiles más o menos nocivos para el medioambiente (principalmente el etanol). Las destilerías de alcohol vierten asimismo en el medioambiente vinazas muy contaminantes, pero ricas en sales minerales. Así, todavía en Cuba, se estima que 1.600 toneladas de etanol, un compuesto cuya emisión está sometida a control, se vierten cada año en la atmósfera.

20 Recientemente, en respuesta a una legislación cada vez más estricta, se han emprendido numerosas investigaciones para desarrollar procedimientos biológicos de descontaminación de los efluentes gaseosos, simples, poco costosos, y particularmente bien adaptados al tratamiento de grandes cantidades de aire poco contaminado (por ejemplo la biofiltración).

25 Los procedimientos anteriores de biofiltración del etanol a partir de bagazo de caña de azúcar comprenden el uso de un medio mineral costoso (33% del coste total del procedimiento), el medio mineral de Thomas y Dawson (véase composición en el artículo de Christen P, Domenech F, Michelena G, Auria R, Revah S (2002) Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with *Candida utilis*. Journal of Hazardous Materials, 89(2/3):253-265).

30 La presente invención tiene como objetivo suministrar un procedimiento que permite, por una parte, valorizar el bagazo de caña de azúcar y, por otra parte, limitar las importantes emisiones en la atmósfera de etanol.

35 La presente invención tiene como objetivo suministrar dicho procedimiento que corresponde a un método de tratamiento biológico eficaz y poco costoso, que encuentra aplicaciones a escala industrial, en particular en los países tropicales productores de azúcar de caña y/o de alcohol.

40 La presente invención tiene como objetivo suministrar un procedimiento en el que la levadura crece directamente sobre un soporte lignocelulósico (bagazo por ejemplo) para producir un alimento para el ganado. Por lo tanto, no necesita ser cultivada en medio líquido en un primer tiempo, separada de este medio (centrifugación o filtración), antes de ser mezclada con el bagazo.

45 La presente invención se refiere al uso de melaza de caña de azúcar y de vinaza de destilería, para la realización de un procedimiento de enriquecimiento de residuo lignocelulósico, en particular bagazo o de pajas, con proteínas de levadura.

La expresión “melaza de caña de azúcar” designa un residuo líquido muy rico en azúcares y en ciertas sales minerales (Biar, Serrano y Conde, 1982, Ed. ICIDCA, La Habana, Cuba, “Estudio de las mieles de la caña de azúcar”).

50 En el ámbito de la presente invención, la melaza de caña de azúcar se usa como medio de cultivo para preparar inóculo activo a partir de una cepa de levadura forrajera.

55 La vinaza de destilería es tal como se ha descrito en el artículo de Obaya, Valdes y Ramos (1994, *Acta Biotechnol.*, 14(2), 193-198) o en la referencia “Manual de los derivados de la Caña de Azúcar”, 3ª edición, Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, capítulo 6.1, Editora: Luis Galvez Taupier.

La vinaza de destilería es un efluente contaminante ácido, rico en sales minerales corrientemente vertido en los ríos. En el ámbito de la presente invención, la vinaza se usa como fuente de sales minerales.

60 El residuo lignocelulósico es un residuo sólido, que procede de la trituración de plantas. Como ejemplo de residuo lignocelulósico, se puede citar la paja, que designa de manera general un tallo cortado de ciertas plantas, el heno, el serrín o las cosetas de la remolacha de azúcar.

65 El bagazo es tal como se ha descrito en la referencia: “Manual de los derivados de la Caña de Azúcar”, 3ª edición, Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, capítulo 2.2, Editora: Luis Galvez Taupier.

En el ámbito de la presente invención, el bagazo, que es un subproducto de la industria azucarera, se usa como soporte sólido para el procedimiento.

ES 2 342 868 B1

El procedimiento de enriquecimiento permite obtener un bagazo enriquecido con proteínas de levadura, y que contiene en particular al menos aproximadamente 8% de proteínas con relación al peso total del bagazo.

5 Según un modo de realización ventajoso, el uso según la invención se caracteriza porque el procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura comprende una etapa de preparación de un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis* con melaza de caña de azúcar.

10 Mediante la expresión “cepa de levadura forrajera”, se designa una levadura rica en proteínas de alto valor nutricional, tal como la descrita en la referencia “Manual de los derivados de la Caña de Azúcar”, 3ª edición, Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, Capítulo 4.8, Editora: Luis Galvez Taupier. Entre los microorganismos “forrajeros”, se pueden citar asimismo ciertos hongos filamentosos (o microscópicos) de tipo *Aspergillus*, o la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería).

15 La presente invención se refiere asimismo al uso tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque el procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura comprende una etapa de cultivo del inóculo activo tal como se ha definido anteriormente, con la vinaza de destilería sobre bagazo de caña de azúcar.

20 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de enriquecimiento de residuo lignocelulósico, en particular de bagazo, con proteínas de levadura, que comprende las siguientes etapas:

- preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis*, con melaza de caña de azúcar, y
- 25 - añadir en continuo al residuo lignocelulósico, en particular al bagazo de caña de azúcar que se ha puesto en presencia de dicho inóculo activo con la vinaza de destilería, de etanol, en particular gaseoso, o de vapores de etanol, como fuente de carbono, permitiendo el consumo del etanol por la levadura antes mencionada, y la producción de residuos lignocelulósicos, en particular de bagazo, enriquecido(s) con proteínas de levadura.

30 Según un modo de realización preferido, la presente invención comprende el uso de una cepa de *Candida utilis*, también denominado *Torula utilis* (“Manual de los derivados de la Caña de Azúcar”, 3ª edición, Ciudad Habana, ICIDCA, 2000, capítulo 4.9, Editora: Luis Galvez Taupier).

35 Según el procedimiento de la invención, el inóculo activo forma con la vinaza de destilería una mezcla líquida que, después, se mezcla con el bagazo que sirve de soporte sólido.

El procedimiento de la invención es un procedimiento aerobio (que necesita la presencia de oxígeno).

40 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura, que comprende las siguientes etapas:

- preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis* con una melaza de caña de azúcar,
- 45 - cultivar dicho inóculo activo con la vinaza de destilería sobre un bagazo de caña de azúcar,
- añadir en continuo al bagazo de caña de azúcar etanol como fuente de carbono, permitiendo el consumo del etanol por la levadura antes mencionada y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.

50 Preferentemente, el etanol añadido en continuo está en fase gaseosa. Así, el procedimiento de la invención permite eliminar el etanol de una atmósfera contaminada por éste.

55 La originalidad del procedimiento de la invención se basa en el uso de bagazo de caña de azúcar, que es un subproducto de la industria azucarera, de vinaza de destilería que es un efluente contaminante, generalmente vertido en un río, rico en sales minerales, y vapores de etanol que proceden de las pérdidas por evaporación durante la fermentación alcohólica, para obtener un alimento para el ganado, enriquecido con proteínas.

60 En efecto, el bagazo se usa a veces como alimento para el ganado, a condición de ser completado con proteínas que pueden ser de origen vegetal (soja) o microbiana (levaduras). Así, el procedimiento de la invención permite producir un bagazo enriquecido con proteínas a partir de un inóculo activo. En efecto, lo más corriente en la técnica anterior es producir la levadura en medio líquido, separarla del medio mediante centrifugación y después mezclarla con el bagazo.

65 Para inocular el bagazo, se necesitan ventajosamente al menos 5×10^6 levaduras por gramo de bagazo seco, en particular para reducir el tiempo de latencia y tener un crecimiento rápido, y evitar una posible contaminación microbiana.

ES 2 342 868 B1

Para hacerse una idea, el porcentaje de multiplicación del inóculo activo sobre el bagazo en las condiciones descritas anteriormente es de aproximadamente 100 en aproximadamente 7 días.

5 Según un modo de realización ventajoso, el procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis* con melaza de caña de azúcar,
- 10 - mezclar el inóculo activo tal como se ha obtenido en la etapa anterior con vinaza de destilería,
- poner en presencia la mezcla tal como se ha obtenido en la etapa anterior sobre el bagazo de caña de azúcar, y
- 15 - añadir en continuo al bagazo de caña de azúcar etanol como fuente de carbono, permitiendo el consumo del etanol mediante la levadura antes mencionada y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.

20 Esta etapa de mezcla de los líquidos (vinaza e inóculo activo) en presencia de un sólido (bagazo) permite homogeneizar más fácilmente los líquidos y el bagazo.

Según un modo de realización ventajoso, el procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura de la invención comprende las siguientes etapas:

- 25 - preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis* con melaza de caña de azúcar,
- llenar un reactor con bagazo de caña de azúcar, inóculo activo tal como se ha obtenido en la etapa anterior y vinaza de destilería, y
- 30 - alimentar en continuo dicho reactor llenado según la etapa anterior con vapores de etanol, permitiendo el consumo de dichos vapores de etanol por la levadura antes mencionada, y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.

35 Según un modo particular de realización, el bagazo se dispone en sacos de fibra sintética, que pueden contener entre 3 y 17 kilogramos de bagazo húmedo (correspondiente al medio inicial) de una malla suficiente para dejar pasar y difundirse los gases, y lo bastante cerrado sin embargo para contener el bagazo y evitar que se disperse. Esto permite facilitar el mantenimiento del bagazo húmedo en el momento de disponerlo en el reactor, y facilitar asimismo el mantenimiento del producto terminado que se puede usar directamente para el ganado.

40 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura tal como se ha definido anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- 45 - preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis* con melaza de caña de azúcar,
- llenar un reactor con bagazo de caña de azúcar, e inóculo activo tal como se ha obtenido en la etapa anterior cultivado con vinaza de destilería, y
- 50 - alimentar en continuo dicho reactor llenado según la etapa anterior con vapores de etanol, permitiendo el consumo de dichos vapores de etanol por la levadura antes mencionada, y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.

55 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura tal como se ha definido anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- 60 - preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis* con melaza de caña de azúcar,
- mezclar el inóculo activo tal como se ha obtenido en la etapa anterior con vinaza de destilería,
- llenar un reactor con la mezcla obtenida en la etapa anterior y bagazo de caña de azúcar, y
- 65 - alimentar en continuo dicho reactor llenado según la etapa anterior con vapores de etanol, permitiendo el consumo de dichos vapores de etanol por la levadura antes mencionada, y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.

ES 2 342 868 B1

En el procedimiento de la invención, no es necesario ajustar el pH del medio. Por el contrario, la acidificación observada (hasta un pH de 2,5) permite limitar la contaminación bacteriana.

5 Tampoco es necesario ajustar la temperatura. En efecto, una parte del exceso de calor metabólico se elimina gracias a la recirculación del medio líquido, teniendo ésta como primer objetivo evitar el secado del medio. Otra parte del calor metabólico se elimina con la corriente gaseosa que alimenta el reactor.

10 Según un modo de realización ventajoso, en el procedimiento de la invención, el bagazo de caña de azúcar es bagazo fresco triturado, cuyas partículas tienen un diámetro comprendido entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mm, y preferentemente comprendido entre aproximadamente 0,54 mm y aproximadamente 3 mm.

15 Las partículas usadas son pequeñas a fin de disponer de un aire en peso específico lo más grande posible. Sin embargo, si se trabaja con partículas todavía más pequeñas, el polvo (bagazo) será muy compacto, lo que puede provocar problemas de difusión de los gases (oxígeno y etanol) y de la vinaza, a través del soporte.

Un procedimiento ventajoso según la presente invención se caracteriza porque la melaza de caña de azúcar usada en la etapa de preparación del inoculo se completa con nitrógeno, y en particular mediante sulfato de amonio y fosfato de amonio.

20 El uso de estas dos sales de nitrógeno permite aumentar la cantidad de levadura producida. En efecto, cuando no se usa ningún complemento, la melaza no es lo bastante rica y el crecimiento de la levadura es menor.

25 Según la presente invención, el inoculo se produce a partir de melaza de caña de azúcar, que es un subproducto de la extracción del azúcar. Ahora bien, en los procedimientos anteriores ya conocidos, el medio de cultivo usado es, por ejemplo, una disolución de glucosa y un extracto de levadura, que son ingredientes más caros.

30 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la cepa de levadura se incuba en presencia de aproximadamente 22 a aproximadamente 82 g.L⁻¹, en particular de aproximadamente 42 a aproximadamente 62 g.L⁻¹, y preferentemente aproximadamente 52 g.L⁻¹, de melaza, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 g.L⁻¹, en particular de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 g.L⁻¹, y preferentemente aproximadamente 5,5 g.L⁻¹, de sulfato de amonio, y de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 g.L⁻¹, y preferentemente aproximadamente 1,2 g.L⁻¹, de fosfato de amonio.

35 Según un modo de realización ventajoso, la composición del medio para el inoculo es la siguiente (para un litro): 52 g de melaza (dilución 1:17); 5,45 g de sulfato de amonio y 1,22 g de fosfato de amonio. Esta adaptación del medio de preparación del inoculo permite producir un inoculo tan reactivo, es decir que la fase de latencia es corta y que, por consiguiente, el crecimiento de la levadura empieza muy rápidamente sobre el bagazo, y ligeramente más densa (al menos 1,75 x 10⁸ células/ml) que cuando se usa glucosa y extracto de levadura para la preparación de este medio.

40 Según un modo de realización ventajoso, el procedimiento de la invención se caracteriza porque la etapa de incubación de la cepa de levadura con la melaza de caña de azúcar se efectúa a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 35°C, preferentemente igual a aproximadamente 30°C, durante un tiempo comprendido entre aproximadamente 15 horas y aproximadamente 22 horas, y preferentemente durante un tiempo de aproximadamente 18 horas.

45 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la vinaza de destilería se enriquece previamente con sales de nitrógeno y con sales de magnesio, siendo dicha vinaza de destilería preferentemente enriquecida previamente con sulfato de amonio a razón de aproximadamente 73 g.L⁻¹, con fosfato de amonio a razón de aproximadamente 22 g.L⁻¹ y con sulfato de magnesio a razón de aproximadamente 7 g.L⁻¹.

50 El hecho de usar la vinaza enriquecida con sulfato de amonio, con sulfato de magnesio y con fosfato de amonio permite un crecimiento más importante de la levadura, lo que conlleva un aumento de la capacidad de eliminación de los vapores de etanol.

55 Un procedimiento ventajoso según la presente invención se caracteriza porque la cepa de levadura se adiciona con agua, a fin de obtener un porcentaje de humedad de aproximadamente 60 a aproximadamente 75%, y preferentemente de aproximadamente 65% con relación al peso total del bagazo húmedo.

60 Esta cantidad de agua permite saturar el bagazo en agua, lo que favorece el crecimiento de la levadura.

Según un modo de realización ventajoso, en el procedimiento de la presente invención, el reactor se alimenta con etanol a razón de aproximadamente 100 g.h⁻¹.m⁻³ de reactor a aproximadamente 200 g.h⁻¹.m⁻³ de reactor, y preferentemente a razón de aproximadamente 150 g.h⁻¹.m⁻³ a aproximadamente 200 g.h⁻¹.m⁻³ de reactor.

65 Una de las particularidades del procedimiento de la invención se basa en el hecho de que es importante no sobrepasar una concentración de etanol de 10 g.m⁻³ en la corriente gaseosa. Preferentemente, la concentración de etanol está comprendida entre 6 y 8 g.m⁻³ de aire. Este intervalo de concentración de etanol en el aire que alimenta el reactor

ES 2 342 868 B1

debe limitar los fenómenos de inhibición del metabolismo de la levadura y la producción de metabolitos volátiles intermedios que pueden ser tóxicos (acetaldehído).

5 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la etapa de alimentación del reactor con etanol se efectúa en continuo, en particular durante aproximadamente 7 días a temperatura ambiente.

10 Según un modo de realización ventajoso, en el procedimiento según la presente invención, el reactor se puede alimentar con etanol en flujo descendente y/o en flujo ascendente.

De manera ventajosa, el reactor se alimenta con etanol en flujo descendente.

15 En efecto, cuando se alimenta el reactor en flujo ascendente, se puede encontrar el siguiente problema: una alta condensación del vapor de agua cerca de la salida del reactor (parte superior), lo que provoca una pérdida de carga y favorece la contaminación microbiana.

20 Cuando se alimenta el reactor en flujo descendente, los problemas de condensación en la parte alta del reactor desaparecen porque el agua que podría haberse acumulado en la base del reactor se elimina naturalmente por gravedad.

Asimismo, es posible usar en alternancia el flujo descendente y el flujo ascendente, lo que permite homogeneizar el crecimiento de la levadura en toda la altura del reactor.

25 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque la parte superior del reactor se rocía mediante una disolución de vinaza tal como se ha definido anteriormente, previamente enriquecida con sales de nitrógeno y con sales de magnesio, tales como se definen anteriormente.

30 Según un modo de realización ventajoso, la parte superior del reactor se rocía mediante la vinaza en exceso que se drena en un cono situado en la base del reactor, mediante una bomba activada durante 5 minutos cada hora. Este líquido que recircula corresponde a la vinaza inicialmente añadida al bagazo. La bomba de recirculación usada tiene un caudal comprendido entre 0,1 a 0,4 ml/minuto, preferentemente igual a 0,25 ml/minuto.

35 Según un modo de realización ventajoso, para evitar los problemas de elevación de la temperatura y del subsiguiente secado, en el sistema de humidificación del medio, se sustituye la torre de humidificación del aire que alimenta el reactor por una humidificación directa del medio mediante rociado discontinuo por la parte alta del reactor. Esto tiene por efecto de disminuir los fenómenos de secado (humidificación más eficaz) y de controlar la elevación de la temperatura gracias a la energía consumida durante la evaporación de este agua. Además, se trata de un método mucho más económico que la humidificación previa del aire.

40 Así, la humidificación mediante recirculación de la fase líquida, asociada con el uso de vinaza complementada, como se ha descrito anteriormente, permite un crecimiento más importante de la levadura y un aumento de la capacidad de eliminación del etanol.

45 La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque el agua se añade puntualmente durante el procedimiento, en particular en una cantidad comprendida entre 50 ml y 200 ml por litro de reactor, y por día, lo que corresponde a una cantidad comprendida entre 1 y 2 litros para un volumen de medio de cultivo de aproximadamente 16 litros.

50 Según un modo de realización preferido, el procedimiento de la invención se caracteriza porque comprende una etapa final suplementaria que consiste en secar con aire seco el producto final que corresponde al bagazo enriquecido con proteínas de levadura, y en recuperar el producto así secado, con el fin de facilitar su estabilidad, su conservación y su eventual transporte.

55 Un procedimiento ventajoso es un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque el bagazo enriquecido con proteínas de levadura presenta un porcentaje de aproximadamente 5 a aproximadamente 17%, y preferentemente de aproximadamente 17% con relación al peso total de bagazo seco.

La presente invención se refiere asimismo a un producto tal como se ha obtenido según el procedimiento tal como se ha definido anteriormente.

60 El procedimiento de la presente invención se puede usar en particular en el campo medioambiental, para permitir, por una parte, la reducción de la contaminación de los ríos en los que se vierte la vinaza rica en sales minerales y con un pH ácido (del orden de 4) Delbecq D, Le sucre, une douceur amère pour l'environnement, Libération, 22 de noviembre de 2004) y, por otra parte, para permitir la reducción de la contaminación atmosférica mediante los vapores de etanol procedentes de las cubas de destilación (esta molécula volátil aunque considerada como poco tóxica constituye, sin embargo, el objeto de una legislación en Europa: un individuo no debe estar expuesto más de 8 horas a una concentración de 1.000 ppm en el aire (Cioci F, Lavecchia R, Ferranti mm (1997) High-performance microbial removal of ethanol from contaminated air. Biotech. Techniques, 11:893-898)).

ES 2 342 868 B1

El procedimiento de la presente invención se puede usar asimismo en el campo alimentario puesto que el producto terminado constituye un alimento para el ganado (rumiantes) rico en fibras y enriquecido con proteínas. Es particularmente interesante en países que tienen un déficit en proteínas de la alimentación animal (Cuba, India) y/o productores de caña de azúcar (Brasil, India, Cuba, Méjico, etc.).

5

Parte experimental

La presente invención es el resultado de experimentos que consisten en ensayar las capacidades de varias cepas de la levadura *Candida utilis* para:

10

- eliminar el etanol (emitido por las destilerías de alcohol, fábricas de cerveza o panaderías industriales) y transformarle en CO₂ y H₂O (oxidación total) gracias a un procedimiento de biofiltración, y/o

15

- usar este etanol a fin de producir biomasa (proteínas unicelulares) para la alimentación animal.

Los experimentos realizados en el ámbito de la presente invención se han efectuado a escala piloto. Más exactamente, se han efectuado con un reactor piloto de 20 litros.

20

Durante los primeros ensayos, la CE (capacidad de eliminación) del etanol medio observada es de 120 g/h.m³ de etanol (periodo de 12 días) y en el 16º día, la biomasa producida es del orden de 129 g/kg de bagazo. La CE de los vapores de etanol se calcula según la siguiente ecuación:

25

$$CE = \frac{(C_e - C_s) * F}{V} \quad (1)$$

30 con

CE: capacidad de eliminación (g/h.m³)

35

C_e y C_s: concentración de etanol en la entrada y salida del reactor (g/m³)

F: aireación (m³/h)

V: volumen del reactor (m³).

40

Según un modo de realización preferido, el sentido de la alimentación con aire + etanol se invierte (flujo descendente). Los problemas de condensación en la parte alta del reactor han desaparecido, y en la base del reactor, la fase líquida (agua y/o vinaza) que podría haberse acumulado se elimina naturalmente mediante gravedad.

45

Según otro modo de realización preferido, la torre de humidificación del aire que alimenta el reactor se sustituye por una humidificación directa del medio mediante aspersion discontinua por la parte alta del reactor. Esto tiene por efecto disminuir los fenómenos de secado (humidificación más eficaz) y controlar la elevación de la temperatura gracias a la energía consumida durante la evaporación de este agua. Además, es un método de humidificación del medio mucho más económico que la humidificación del aire que necesita una torre de un volumen equivalente al del reactor.

50

Por otra parte, debido al coste del medio mineral de Thomas y Dawson (Christen P, Domenech F, Michelena G, Auria R, Revah S (2002) Biofiltration of volatile ethanol using sugar cañe bagasse inoculated with *Candida utilis*. Journal of Hazardous Materials, 89(2/3):253-265), este medio mineral ha sido sustituido por vinaza de destilería producida durante la fermentación alcohólica usando la melaza de caña de azúcar como sustrato. La vinaza es un efluente ácido rico en sales minerales corrientemente vertido en los ríos, contaminándolos. Se usa con una proporción de 1,04 l por kg de bagazo y se completa debidamente mediante fuentes baratas de nitrógeno (sulfato de amonio, 73 g/l y fosfato de amonio, 22 g/l), y de magnesio (sulfato de magnesio, 7 g/l).

55

Estas dos modificaciones (humidificación mediante recirculación de la fase líquida y uso de la vinaza complementada) han permitido un crecimiento más importante de la levadura en el módulo de entrada (356 g/kg de bagazo), así como un aumento de la CE del etanol (eliminación de 99,8% de una carga de 186 g/h.m³).

60

65

Según un modo de realización preferido, se ha utilizado un flujo de aireación más importante sin modificar la carga (lo que implica disminuir la concentración de etanol en la entrada con valores del orden de 8 g/m³). Esta concentración relativamente más baja de etanol en el aire que alimenta el reactor debe limitar los fenómenos de inhibición del metabolismo de la levadura y la producción de metabolitos volátiles intermedios que pueden ser tóxicos (acetaldehído).

ES 2 342 868 B1

Este modo de realización permite así evitar una gran heterogeneidad longitudinal de la concentración en biomasa en el reactor, con un crecimiento de la levadura mucho más importante en el módulo de entrada del etanol (356 g/kg de bagazo) que en el módulo de salida (76 g/kg de bagazo), que tiene como consecuencia un funcionamiento parcial del reactor en términos de CE, con más de 85% del etanol eliminado en el módulo de entrada y solamente 2% en el módulo de salida (observado durante el tercer ensayo de este reactor piloto).

El aumento del flujo de aire ha permitido una mejor repartición del consumo de etanol (57,5% en el módulo de entrada y 8,9% en salida), y de la biomasa producida (208 y 81 g/kg de bagazo en los módulos de entrada y de salida respectivamente). La CE media del sistema es de 161 g/h.m³.

Según otro modo de realización preferido, el reactor se alimenta de manera alternada con aire + etanol: cada dos días por la parte de arriba y cada dos días por la parte de abajo. Así, este modo de realización permite mejorar todavía más la homogeneidad del crecimiento en el reactor.

Debido a los grandes volúmenes de inóculo necesarios para inocular el medio (0,57 l/kg de materia seca), se decidió producir el inóculo a partir de melaza de caña de azúcar, subproducto de la extracción del azúcar, en lugar de la solución de glucosa y de extracto de levadura usada en laboratorio, mucho más costosa. La composición del medio para el inóculo es la siguiente (por litro): melaza, 52 g (dilución 1:17); sulfato de amonio, 5,45 g; fosfato de amonio, 1,22 g. Este cambio ha permitido producir un inóculo tan activo y más denso que el anterior (1,75 x 10⁸ células/ml frente a 1,53 x 10⁸ células/ml), en un tiempo idéntico (22 horas) y a un menor coste.

Ejemplo

25 *Etapas esenciales del procedimiento*

1. preparar el bagazo: se coge el bagazo preferentemente fresco que se tritura para obtener partículas inferiores a 20 mm;
2. producir el inóculo en medio líquido a partir de la melaza debidamente completada con sulfato de amonio y fosfato de amonio (incubación entre 15 y 20 horas), para obtener inóculo activo después de 14 horas (aproximadamente de 14 a 18 horas);
3. preparar el medio de cultivo "sólido" sobre el bagazo mezclando el inóculo activo, la vinaza previamente enriquecida con sales de nitrógeno y de magnesio y la cantidad necesaria de agua para obtener una humedad de 65%;
4. llenar el reactor y alimentar con vapores de etanol mediante flujo ascendente o descendente; y
5. hacer recircular periódicamente la fase líquida (5 minutos cada hora).

Productos de partida

Con la excepción de la levadura, todos se pueden considerar en diversos grados como ejemplos de subproductos contaminantes de la industria agroalimentaria: destilerías (vinaza y vapores de etanol), refinerías de azúcar (bagazo de caña).

La melaza de caña de azúcar se puede usar como medio de cultivo para la producción del inóculo de partida.

La levadura usada puede ser *Candida utilis*.

Producto final

55 Bagazo de caña enriquecido con proteínas de levadura para la alimentación del ganado (contenido mínimo: 8% de proteínas).

60

65

ES 2 342 868 B1

Proporciones de cada constituyente

En base a un kg de bagazo (seco), se usa:

5	Vinaza	1,04 l
	Sulfato de amonio	76 g
10	Fosfato de amonio	23 g
	Sulfato de magnesio	7,3 g
	Vapores de etanol	la carga no debe sobrepasar 200 g/h.m ³
15	Melaza (para la preparación del inóculo)	32,4 g

Descripción detallada

20

Se ha montado un bio-reactor de 20 litros, compuesto por 3 módulos en plexiglás

25

Volumen útil del reactor: 19,83 l; compuesto por 3 módulos (volumen de cada uno: 6,61 l; diámetro: 18 cm, altura: 26 cm).

Se alimenta aire gracias a una bomba y se regula el flujo de aire mediante un caudalímetro equipado de una válvula de aguja. Al igual que para el aire que va a burbujear en un recipiente que contiene el etanol (líquido). El ajuste de este flujo permite fijar con precisión la concentración de etanol en el aire que entra en el reactor.

30

Cada módulo está equipado de un puerto de extracción de muestras del soporte (bagazo) en el centro de cada módulo a fin de seguir la evolución del pH, de la humedad y del crecimiento de la levadura. Ésta se determina mediante recuento de las células al microscopio y mediante la determinación de proteína total mediante el método de Barnstein. Cada módulo está asimismo equipado de puertos de muestreo del aire (entrada y salida) a fin de determinar las concentraciones de etanol, de CO₂ y de eventuales metabolitos volátiles (acetaldehído y acetato de etilo) en el aire. Esto

35

permite seguir el comportamiento del reactor y al final del experimento realizar un balance de carbono.

Funcionamiento

40

La mezcla aire + etanol se alimenta al reactor en continuo en un solo sentido (ascendente o descendente) o bien de manera alternada. Periódicamente, se rocía la parte alta del reactor con agua y, a veces (en el caso en que se observa una disminución de la eficacia de la eliminación del etanol), se puede añadir una disolución de vinaza diluida y complementada con N y con P. La levadura consume el etanol y lo transforma en biomasa -mientras que no aparezca una limitación de uno de los nutrientes- y con CO₂. El procedimiento no necesita ni regulación de temperatura, ni regulación de pH.

45

Cuando el crecimiento ha terminado (al cabo de una semana aproximadamente), se pasa aire seco en el reactor a fin de secar el producto y mejorar su tiempo de conservación.

50

Una de las ventajas de este procedimiento es que la levadura produce ácidos (en particular el ácido acético) que reducen el pH del medio a valores de 2,5 a 3, lo que limita mucho la contaminación del medio por otros microorganismos (en particular bacterias).

55

Resultados

Se han realizado varios experimentos, y los resultados obtenidos son los siguientes:

60

Condiciones de realización

Humedad inicial del bagazo	65%
Porcentaje de inoculación	1,78 x 10 ⁶ levaduras/g bagazo
65 pH inicial	6

ES 2 342 868 B1

El medio de cultivo tiene la siguiente composición:

Bagazo seco (1 kg)

5 Vinaza (1,04 l),

Disolución mineral 1 (490 ml),

Disolución mineral 2 (49,2 ml),

10

Inóculo (622 ml).

La disolución mineral 1 tiene la siguiente composición (para 1 l): 155 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 46,78 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

15

La disolución mineral 2 tiene la siguiente composición (para 100 ml): 14,88 g de MgSO_4 .

El bagazo se lava, se seca y se tamiza (diámetro de partículas entre 0,54 y 3 mm), y se esteriliza durante 1 hora a 121°C . Después se mezcla de manera no estéril con las sales, la vinaza y el inóculo, y se introduce en el reactor.

20

Después, el reactor se alimenta con etanol (corriente descendente) con una carga de aproximadamente 200 g/h.m^3 durante 10 días, y después de 150 g/h.m^3 los 6 días siguientes. Para ello, el flujo de aire alimentado ha variado de 480 a 1.200 l/h , y el consumo de etanol en el aire ha variado de 2 a 9 g/m^3 .

25

La eficacia de eliminación (EE) es de 100% durante los 6 primeros días, y después cayó hasta 60% el 7º día. A fin de restablecer este EE, se ha añadido 1 l de disolución mineral que contiene 59,3 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 17,9 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y 5,66 g de MgSO_4 . Asimismo, se ha añadido 1 l de agua estéril por día al reactor a fin de compensar el agua perdida por evaporación y evitar así el secado del medio.

30

Durante el experimento, se obtuvo una capacidad de eliminación (CE) comprendida entre 130 y 220 g/j.m^3 . La biomasa máxima se alcanzó al final de 8 días con los contenidos en proteínas siguientes: 13,7; 5,8 y 5,1 g para 100 g de bagazo seco, en los módulos de entrada, del medio y de salida, respectivamente, es decir un contenido medio de 8,2 g para 100 g de bagazo seco en el conjunto del reactor. El pH final es de 2,6; 2,5 y 2,3 en los módulos de entrada, del medio y de salida, respectivamente.

35

Producción del inóculo

Se introduce la cepa de levadura (una osa) en un matraz Erlenmeyer que contiene la melaza (52 g/l) y se completa con sulfato de amonio (5,45 g/l) y fosfato de amonio (1,22 g/l). Después, el recipiente se dispone en un incubador con agitación orbital (200 rpm) a 30°C . Porcentaje de inoculación: $1,78 \times 10^6$ levaduras/g bagazo).

45

50

55

60

65

ES 2 342 868 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de melaza de caña de azúcar y de vinaza de destilería, para la realización de un procedimiento de enriquecimiento de residuo lignocelulósico, en particular de bagazo o de paja, con proteínas de levadura.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el enriquecimiento del bagazo con proteínas de levadura comprende la preparación de un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis* con melaza de caña de azúcar.
- 15 3. Uso según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura comprende el cultivo del inóculo activo tal como se define en la reivindicación 2, con vinaza de destilería sobre bagazo de caña de azúcar.
- 20 4. Procedimiento de enriquecimiento de residuo lignocelulósico, en particular de bagazo con proteínas de levadura, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis*, con melaza de caña de azúcar, y
 - añadir en continuo al residuo lignocelulósico, que se ha puesto en presencia de dicho inóculo activo con vinaza de destilería, etanol, en particular gaseoso, como fuente de carbono, permitiendo el consumo del etanol por la levadura antes mencionada, y la producción de residuo lignocelulósico enriquecido con proteínas de levadura.
- 25 5. Procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura según la reivindicación 4, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis*, con melaza de caña de azúcar,
 - mezclar el inóculo activo tal como se ha obtenido en la etapa anterior con la vinaza de destilería,
 - poner en presencia la mezcla tal como se ha obtenido en la etapa anterior sobre bagazo de caña de azúcar, y
 - añadir en continuo al bagazo de caña de azúcar, etanol, en particular gaseoso, como fuente de carbono, permitiendo el consumo del etanol por la levadura antes mencionada y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.
- 30 35 40 6. Procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura según la reivindicación 4, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis*, con melaza de caña de azúcar,
 - llenar un reactor con bagazo de caña de azúcar, inóculo activo tal como se ha obtenido en la etapa anterior y vinaza de destilería, y
 - alimentar en continuo dicho reactor llenado según la etapa anterior, con vapores de etanol, permitiendo el consumo de dichos vapores de etanol mediante la levadura antes mencionada, y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.
- 45 50 55 7. Procedimiento de enriquecimiento de bagazo con proteínas de levadura según la reivindicación 6, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- preparar un inóculo activo mediante incubación de al menos una cepa de levadura forrajera, en particular *Candida utilis*, con melaza de caña de azúcar,
 - llenar un reactor con bagazo de caña de azúcar y el inóculo activo tal como se ha obtenido en la etapa anterior, cultivado con vinaza de destilería, y
 - alimentar en continuo dicho reactor llenado según la etapa anterior, con vapores de etanol, permitiendo el consumo de dichos vapores de etanol por la levadura antes mencionada, y la producción de bagazo enriquecido con proteínas de levadura.
- 60 65

ES 2 342 868 B1

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizado** porque el bagazo de caña de azúcar es bagazo fresco triturado, cuyas partículas tienen un diámetro comprendido entre 0,1 y 5 mm, y preferentemente comprendido entre 0,54 mm y 3 mm.
- 5 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, **caracterizado** porque la melaza de caña de azúcar que se usa en la etapa de preparación del inoculo está complementada con nitrógeno, y en particular por sulfato de amonio o fosfato de amonio.
- 10 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, **caracterizado** porque la cepa de levadura se incuba en presencia de 22 a 82 g.l⁻¹, y preferentemente de 52 g.l⁻¹, de melaza, de 3 a 8 g.l⁻¹, y preferentemente de 5,5 g.l⁻¹, de sulfato de amonio, y de 0,5 a 2 g.l⁻¹, y preferentemente de 1,2 g.l⁻¹ de fosfato de amonio.
- 15 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, **caracterizado** porque la etapa de incubación de la cepa de levadura con la melaza de caña de azúcar se efectúa a una temperatura de 25 a 35°C, y preferentemente igual a 30°C, durante un tiempo que varía entre 15 horas a 22 horas, y preferentemente durante un tiempo de 18 horas.
- 20 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, **caracterizado** porque la vinaza de destilería se enriquece previamente con sales de nitrógeno, con sales de fósforo y con sales de magnesio, siendo preferentemente dicha vinaza previamente enriquecida con sulfato de amonio a razón de 73 g.l⁻¹, con fosfato de amonio a razón de 22 g.l⁻¹, y con sulfato de magnesio a razón de 7 g.l⁻¹.
- 25 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 12, **caracterizado** porque la cepa de levadura se adiciona con agua, a fin de obtener un porcentaje de humedad de 60 a 75%, y preferentemente de 65% con relación al peso total del bagazo húmedo.
- 30 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, **caracterizado** porque el reactor se alimenta con etanol a razón de 100 g.h⁻¹.m³ de reactor a 200 g.h⁻¹.m³ de reactor, y preferentemente a razón de 150 a 200 g.h⁻¹.m³ de reactor.
- 35 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, **caracterizado** porque la etapa de alimentación del reactor con etanol se efectúa en continuo, durante 7 días a temperatura ambiente.
- 40 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, **caracterizado** porque el reactor se puede alimentar con etanol en flujo descendente y/o en flujo ascendente.
- 45 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, **caracterizado** porque la parte superior del reactor se rocía mediante una disolución de vinaza complementada con nitrógeno y con fósforo, tal como se define en la reivindicación 12.
- 50 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17, **caracterizado** porque el agua se añade puntualmente durante el procedimiento, en particular con una cantidad comprendida entre 50 ml y 200 ml por litro de reactor y por día.
- 55 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 18, **caracterizado** porque comprende una etapa final suplementaria que consiste en secar con aire seco el producto final que corresponde al bagazo enriquecido con proteínas de levadura, y en recuperar el producto así secado.
- 60 20. Producto obtenido según el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 19, **caracterizado** porque el bagazo enriquecido con proteínas de levadura presenta un porcentaje de proteínas de 5 a 17%, y preferentemente de 17% con relación al peso total del bagazo seco.
- 65 21. Producto tal como se ha obtenido según el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 19.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 868

② N° de solicitud: 200750079

③ Fecha de presentación de la solicitud: **06.06.2006**

④ Fecha de prioridad: **07.06.2005**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A23K 1/06** (2006.01)
A23K 1/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y A	FR 2550420 A1 (MULTIBIO, S.A.) 15.02.1985, todo el documento.	1 2-21
Y	MARTÍNEZ, J.A., et al. Production of fodder yeast from stillage in Cuba-an environmental approach. Zuckerindustrie-Sugar Industry-Industrie sucrère.01.01.2004.Vol.129, N°2, páginas 92-95. ISSN 0344-8657.	1
X	CU 23078 A1 (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS JORGE DIMITROV) 17.08.2005, páginas 1-4.	20,21
A	ES 8200212 A1 (SOCIEDAD ANONIMA AZUCARERA ARGENTINA COMERCIAL E INDUSTRIAL) 16.01.1982, páginas 1-5.	1-3,9-13
A	OTERO,M.A; REYES,A. Behaviour of Candida utilis during growth in relation to Mg-2+ and K+ concentration in sugar cane molasses. Acta Biotechnologica.1994. Vol.14, N°1, páginas 111-114, en especial páginas 111 y 112.	1,2,9-11
A	CHRISTEN, P. et al. Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with Candida utilis. Journal of Hazardous Materials. 28.01.2002.Vol.89, N°2-3, páginas 253-265, en especial páginas 253-255.	4-8,14-18
A	SILVEIRA RUEGGER M.J. et al.Producao de biomasa por fungos filamentosos em meio de vinhaca de cama-de-acucar suplementado com melaco/biomass production by filamentous fungi in sugar cane vinasse medium supplemented with molasses. Archivos de Biología y Tecnología.01.06.1996. Vol.39, N°2, páginas 323-332. ISSN 0365-0979.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
30.06.2010

Examinador
E. Ulloa Calvo

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 868

② Nº de solicitud: 200750079

③ Fecha de presentación de la solicitud: **06.06.2006**

④ Fecha de prioridad: **07.06.2005**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A23K 1/06** (2006.01)
A23K 1/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LEZCANO, P. Development of a protein source in Cuba. Torula yeast (<i>Candida utilis</i>). Cuban Journal of Agricultural Science. 2005.Vol.39. Special Issue. Páginas 447-451.ISSN 0864-0408	1,3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

30.06.2010

Examinador

E. Ulloa Calvo

Página

2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23K, C12

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, NPL, MEDLINE, EMBASE, COMPDX, INSPEC, FSTA, AGRICOLA, HCAPLUS, CABA, CROPU, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-21	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-19	SÍ
	Reivindicaciones	1,20,21	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FR 2550420 A1	15-02-1985
D02	MARTÍNEZ, J.A., et al. Zuckerindustire-Sugar Industry-Industrie sucire.01.01.2004.Vol.129, N°2, páginas 92-95. ISSN 0344-8657.	01-01-2004
D03	CU 23078 A1	17-08-2005
D04	ES 8200212 A1	16-01-1982
D05	OTERO,M.A; REYES,A. 1994. Vol.14, N°1, páginas 111-114, en especial páginas 111 y 112.	1994
D06	CHRISTEN, P. et al. 28.01.2002. Vol.89, N°2-3, páginas 253-265, en especial páginas 253-255.	28-01-2002
D07	SILVEIRA RUEGGER M.J. et al. Archivos de Biología y Tecnología.01.06.1996. Vol.39, N°2, páginas 323-332. ISSN 0365-0979.	01-06-1996
D08	LEZCANO, P. Cuban Journal of Agricultural Science. 2005.Vol.39. Special Issue. Páginas 447-451.ISSN 0864-0408.	2005

Observaciones sobre documentos:

La solicitud describe el uso de melaza de caña de azúcar y vinaza de destilería en un procedimiento de enriquecimiento de un residuo lignocelulósico (bagazo o paja) con proteínas de levadura, el procedimiento para llevarlo a cabo así como el producto obtenido por el procedimiento.

El documento D01 detalla un procedimiento de obtención de un producto proteico mediante el cultivo, en un reactor, de un microorganismo (ej. Candida) sobre melaza y bagazo de caña de azúcar. También aporta nitrógeno y fósforo como micronutrientes, en forma de sulfato amónico y fosfatos.

El documento D02 produce proteína microbiana para alimentación animal mediante la propagación de Candida utilis sobre vinaza suplementada con melaza. Emplea también sulfato y fosfato amónico.

El documento D03 obtiene un pienso con un contenido proteico del 12-28% mediante un proceso en el que se emplea C.utilis fresca, melaza de caña de azúcar y bagacillo de caña con un tamaño de 0.01-6mm.

El documento D04 describe un procedimiento de obtención de un complejo proteico-vitamínico que incluye proteínas de levadura (Candida utilis) sobre vinaza y cachaza. En un primer paso cultiva C.utilis con vinaza y minerales (sulfato amónico, fosfato amónico) durante 20 horas a 30C. Posteriormente adiciona cachaza a la suspensión anterior.

El documento D05 anticipa la propagación de Candida utilis sobre melaza de caña de azúcar. Realiza un cultivo de C.utilis en melaza(40g/l) suplementada con sulfato amónico ((7.5g/l) y fosfato amónico (1.5g/l) a 32C.

El documento D06 narra el proceso de biofiltración de etanol con Candida utilis sobre bagazo de caña de azúcar. La carga de etanol es de 94-510 g/hxm3 y la temperatura de proceso de 30C. Utiliza también una solución mineral que lleva sulfato de amonio entre otros.

El documento D07 cultiva hongos sobre vinaza suplementada con melaza para obtener proteína microbiana.

El documento D08 describe el cultivo de Candida utilis sobre vinaza de destilería procedente de caña de azúcar, para su empleo como complemento proteico en alimentación animal.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

(ver hoja adicional)

Hoja adicional

NOVEDAD (Art. 6.1 L.P.)

La solicitud está constituida por tres reivindicaciones independientes referentes a tres categorías:

Reivindicación independiente 1 y dependientes 2 y 3, referentes al uso de melaza de caña de azúcar y vinaza de destilería en un procedimiento de enriquecimiento de un residuo lignocelulósico (bagazo o paja) con proteínas de levadura.

Reivindicación independiente 4 y dependientes 5-19, referentes al procedimiento de enriquecimiento, en el cual se prepara un inóculo incubando *C. utilis* y melaza, y posteriormente se añade a esa mezcla vinaza, bagazo y etanol. Las reivindicaciones dependientes 5-19 especifican alguna de las etapas o reflejan formas alternativas en cuanto al momento de aplicar cada componente.

Reivindicación independiente 20 y dependiente 21, referente a un producto: bagazo enriquecido con proteínas de levadura, con un porcentaje de proteínas del 5-17%.

A la vista del estado de la técnica anterior, las reivindicaciones 1-21 cumplen con el requisito de novedad.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 L.P.)

Reivindicación 1

La solicitud, en su reivindicación 1, describe el uso de melaza de caña de azúcar y vinaza de destilería en un procedimiento de enriquecimiento de un residuo lignocelulósico (bagazo o paja) con proteínas de levadura.

D01 detalla un procedimiento de obtención de un producto proteico mediante el cultivo de un microorganismo (ej. *Candida*) sobre melaza y bagazo de caña de azúcar. También aporta nitrógeno y fósforo como micronutrientes, en forma de sulfato amónico y fosfatos.

El documento D01 difiere de la solicitud en emplear, además, vinaza de destilería.

El efecto técnico que produce esta diferencia es potenciar el cultivo de la levadura.

Sin embargo, existe un documento D02 que anticipa el cultivo de *Candida* sobre vinaza suplementada con melaza. Este documento emplea ambas sustancias, melaza y vinaza, para el cultivo de la levadura con el fin de aumentar la producción del mismo.

Así, y a la vista de D01 en combinación con D02, la reivindicación 1 carece de actividad inventiva.

Reivindicaciones 20 y 21

Las reivindicaciones 20 y 21 reivindican el bagazo enriquecido con proteínas de levadura, con un porcentaje de proteínas del 5-17% (reivindicación 20).

D03 obtiene un pienso con un contenido proteico del 12-28% mediante un proceso en el que se emplea *C. utilis* fresca, melaza de caña de azúcar y bagacillo de caña con un tamaño de 0.01-6mm.

El producto obtenible por el procedimiento no parece que difiera de forma esencial del obtenido en el procedimiento descrito en D03. De hecho, la única característica resaltable respecto al mismo, referente al contenido proteico, la cumple también el documento D03.

Por tanto, y a la vista de este documento, las reivindicaciones 20 y 21 no cumplen el requisito de actividad inventiva.

Nota: Hay que tener en consideración que procedimientos diferentes pueden dar lugar a un mismo producto, de forma que el procedimiento puede tener novedad y actividad inventiva y no así el producto que se obtiene del mismo.

Reivindicaciones 2-19

Las reivindicaciones 2-19 cumplen con el requisito de actividad inventiva a la vista del estado de la técnica anterior.