

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 833**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 1/18 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06799958 .1**

96 Fecha de presentación: **23.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1920046**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54 Título: **MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE ETANOL CON LA AYUDA DE LEVADURA LÍQUIDA.**

30 Prioridad:
24.06.2005 US 694098 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
**LALLEMAND, INC.
1620 PREFONTAINE
MONTREAL, XX H1W 2N8, CA**

72 Inventor/es:
**DEGRÉ, Richard;
KRAUS, Kevin y
ZHANG, Zhigen**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 369 833 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).

DESCRIPCION

Método de producción de etanol con la ayuda de levadura líquida

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un método de producción de etanol por el uso de una preparación de levadura líquida estabilizada que contiene un compuesto de polihidroxi, preferiblemente glicerol, y una goma, que comprende algarroba, guar, tragacanto, goma arábiga o xantana, preferiblemente goma xantana.
- 10 **[0002]** La producción de combustible de etanol ha ganado popularidad significativamente en los últimos pocos años. Hoy en día más de 80 de tales plantas están en funcionamiento sólo en los USA. Este entusiasmo ha sido impulsado por la necesidad de un reemplazo para el MTBE y el deseo de convertirse menos dependientes de la energía de otros países. Una planta de producción de etanol típica usa levadura (típicamente *Saccharomyces*) para producir una media de 189 millones de litros (50 millones de galones) de etanol puro por año, mayormente pero no exclusivamente de almidón de maíz hidrolizado en grandes fermentadores de más de 2 millones de litros.
- 15 **[0003]** Las fuentes de carbono y energía básicas para el crecimiento de la levadura son los azúcares. El almidón no modificado no puede ser usado porque la levadura con contiene los enzimas apropiados para hidrolizar este sustrato en azúcares fermentables. Las melazas de remolacha y caña son usadas normalmente como materia prima en la fermentación porque los azúcares presentes en las melazas, una mezcla de sacarosa, fructosa y glucosa, son fácilmente fermentables. Además del azúcar la levadura también requiere ciertos minerales, vitaminas y sales para crecer. Algunos de estos pueden ser añadidos a la mezcla de melazas de remolacha y caña antes de la esterilización flash mientras otros son añadidos separadamente a la fermentación. Alternativamente, un tanque de alimentación de nutrientes separado puede ser usado para mezclar y repartir algunas de las vitaminas y minerales necesarios. El nitrógeno requerido es suministrado en forma de amoníaco y el fosfato es suministrado en forma de ácido fosfórico. Cada uno de estos nutrientes es añadido separadamente a la fermentación para permitir un mejor control del pH del proceso. La melaza esterilizada, referida comúnmente como pasta o fermento, es almacenada en un tanque de acero inoxidable separado. La pasta almacenada en este tanque es después usada para añadir azúcar y otros nutrientes a los recipientes de fermentación apropiados.
- 20 **[0004]** En la producción de etanol comercial de alto volumen, el sustrato de elección es el almidón de maíz, por su bajo coste y por su disponibilidad. Al usar almidón de maíz, a menudo un primer paso de hidrólisis parcial (usando alfa-amilasa) precede un paso de fermentación por co-sacarificación (en presencia de glucoamilasa) que es después seguido por destilación.
- 25 **[0005]** Un preparado de levadura es usado para inocular varios fermentadores, incluyendo los llamados propagadores, normalmente esto ocurre en la etapa de fermentación por co-sacarificación. La fermentación por co-sacarificación asegura una hidrólisis controlada y progresiva de las dextrinas producidas en el paso previo de hidrólisis parcial. Esta hidrólisis y fermentación simultánea proporciona una liberación lenta de los azúcares y asegura que la levadura es expuesta a una presión osmótica puntual, muy grande, que podría existir si todas las dextrinas hubiesen sido ya hidrolizadas al principio de la fermentación y antes de la inoculación de la levadura.
- 30 **[0006]** La producción de levadura para el uso en la fermentación comercial es, en sí misma, un proceso multietapa. En muchos casos, la producción comercial requiere que la levadura sea empaquetada, almacenada y transportada en grandes cantidades de una manera que garantice la pureza y viabilidad del producto de levadura final.
- 35 **[0007]** La producción de levadura de panadería, por ejemplo, a menudo empieza con un tubo de cultivo puro o vial congelado de la cepa de levadura apropiada. Esta levadura sirve como el inóculo para el tanque de cultivo prepuro, un recipiente de presión pequeño donde la semilla se cultiva en el medio bajo estrictas condiciones estériles. Siguiendo al crecimiento, los contenidos de este recipiente son transferidos a un fermentador de cultivo puro más grande donde la propagación es llevada a cabo con alguna aireación, de nuevo bajo condiciones estériles. Estas etapas tempranas son realizadas como fermentaciones por conjunto de lotes. En la fermentación por conjunto de lotes, todos los medios de cultivo y nutrientes son introducidos en el tanque antes de la inoculación.
- 40 **[0008]** Del recipiente de cultivo puro, las células crecidas son transferidas a una serie de fermentadores de semillas y semi- semillas progresivamente más grandes. Estas etapas tardías son realizadas como fermentaciones por lotes alimentadas. Durante la fermentación por lotes alimentada, las melazas, el ácido fosfórico, el amoníaco y los minerales son añadidos a la levadura a una tasa controlada. Esta tasa está diseñada para añadir justo suficientes azúcares y nutrientes a la levadura para maximizar la multiplicación y evitar la producción de alcohol. Además, estas fermentaciones por lotes alimentadas no son completamente estériles. No es rentable usar tanques presurizados para garantizar la esterilidad de los grandes volúmenes de aire requeridos en estos fermentadores para conseguir condiciones estériles durante todas las transferencias a través de las muchas tuberías, bombas y centrifugadoras. Se ejerce una limpieza extensiva del equipamiento, vaporización de las tuberías y tanques, y filtrado del aire para asegurar unas condiciones tan asépticas como sea posible.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- 5 **[0009]** Al final de la fermentación de las semi-semillas, los contenidos del recipiente son bombeados a una serie de separadores que separan la levadura de las melazas gastadas. La levadura es después lavada con agua fría y bombeada a tanque de almacenamiento de levadura de semi-semilla donde la crema de levadura es mantenida a aproximadamente 1,1° C (34 grados Fahrenheit) hasta que es usada para inocular los tanques de fermentación comerciales. Estos fermentadores comerciales son la etapa final en el proceso de fermentación y son referidos a menudo como fermentación final o comercial.
- 10 **[0010]** Las fermentaciones comerciales son llevadas a cabo en grandes fermentadores con volúmenes de trabajo de hasta 189.000 litros (50.000 galones). Para comenzar la fermentación comercial, un volumen de agua, referido como agua establecido, es bombeado en el fermentador. Después, en un proceso referido como pitcheo, la levadura de semi-semilla del tanque de almacenamiento es transferida al fermentador. Después de la adición de la levadura de semilla, se comienza la aireación, enfriamiento y adición de nutrientes para empieza la fermentación de 15-20 horas. En el comienzo de la fermentación, la levadura de semilla líquida y el agua adicional puede ocupar sólo alrededor de un tercio a un medio del volumen del fermentador. Las adiciones constantes de nutrientes durante el curso de la fermentación llevan al fermentador a su volumen final. La tasa de adición de nutriente aumenta durante la fermentación porque se tienen que suministrar más nutrientes para apoyar el crecimiento de la población de células en aumento. El número de células de levadura aumenta alrededor de cinco a ocho veces durante esta fermentación.
- 20 **[0011]** El aire es proporcionado al fermentador a través de una serie de tubos perforados localizados en la parte de abajo del recipiente. La tasa del flujo de aire es de alrededor de un volumen de aire por volumen de fermentador por minuto. Una gran cantidad de calor es generado durante el crecimiento de la levadura y el enfriamiento es realizado por serpentines de refrigeración internos o bombeando el líquido de fermentación, también conocido como caldo, a través de un intercambiador de calor externo. La adición de nutrientes y la regulación del pH, la temperatura y el flujo de aire son monitorizados cuidadosamente y controlados por sistemas informáticos durante todo el proceso de producción. A lo largo de la fermentación, la temperatura es mantenida a aproximadamente 30° C (86 grados Fahrenheit) y el pH está generalmente en el rango de 4,5-5,5.
- 30 **[0012]** Al final de la fermentación, el caldo del fermentador es separado por centrifugadoras del tipo boquilla, lavado con agua y re-centrifugado para producir una crema de levadura con una concentración de sólidos del 15 al 24%, y a menudo en el intervalo del 18%. La crema de levadura es enfriada a alrededor de 45 grados Fahrenheit y almacenada en un tanque de crema de acero inoxidable refrigerado, separado. La crema de levadura puede ser cargada directamente en camiones cisterna y entregada a clientes equipados con un sistema de tratamiento de crema de levadura apropiado. Alternativamente, la crema de levadura puede ser bombeada a un filtro prensa de placas y estructura y deshidratada a una consistencia similar al pastel que contiene un 27-33% de sólidos de levadura de. Esta levadura de pastel prensada es desmenuzada en piezas y empaquetada en bolsas de 23 kg (50 libras) que son apiladas en un pallet. La levadura se calienta durante las operaciones de prensado y empaquetado y las bolsas de levadura desmenuzada deben ser enfriadas en un refrigerador durante un periodo de tiempo con la ventilación adecuada y colocación de los pallets para permitir el acceso libre del aire de refrigeración. Las bolsas paletizadas de levadura desmenuzada son después distribuidas a clientes en camiones refrigerados. La crema de levadura puede además ser también procesada en levadura seca (92-97% de sólidos) usando un secador de lecho fluidizado o tipos similares de secadores.
- 45 **[0013]** En contraste, la producción de levadura para plantas de combustible de etanol es significativamente diferente. Aunque las plantas de combustible de etanol son muy grandes, consumes mucha menos levaduras que las panaderías industriales. Una panadería industrial grande, por ejemplo, recibirá en cualquier parte entre 1 y de 4 a 5 cargas de camión de 20.000 litros de crema de levadura (medio de 18% de sólidos) por semana. Es por lo tanto común ver sistemas de crema de levadura instalados en esas panaderías; normalmente están compuestos de dos grandes receptores refrigerados, agitados que pueden recibir al menos una carga de camión de levadura líquida cada uno, un anillo de distribución a los mezcladores de masa y un sistema de limpieza total en el lugar (CIP). Por analogía, una planta de combustible de etanol grande usará típicamente de 200 a 500 kg de levadura seca por semana o el equivalente a de 1500 a 2500 litros de crema de levadura por semana. Tal uso reducido, sin embargo, no puede justificar instalar sistemas de crema de levadura sofisticados que son comunes en la industria de la panadería.
- 55 **[0014]** Las plantas de combustible de etanol, por otro lado, usan levadura seca y una serie de tanques de propagación para multiplicar y activar la levadura. El uso de tales tanques de propagación reduce la cantidad de levadura requerida y elimina efectivamente la necesidad de almacenamiento refrigerado. La levadura seca tiene el beneficio adicional de tener una vida útil relativamente larga (hasta alrededor de 3 meses). El paso de propagación visto comúnmente en plantas de combustible de etanol) y no es tan rápida como la levadura fresca (27-33% de sólidos).
- 60 **[0015]** La industria del etanol ha estado también usando levadura fresca pero la levadura fresca comprimida o desmenuzada requiere refrigeración para el almacenamiento y tiene una vida de almacenamiento media de 2 a 3 semanas. La levadura comprimida puede por supuesto ser guardada por un periodo de tiempo más largo (hasta 6 semanas) pero esto resulta en una pérdida significativa de actividad y también permite la posibilidad del desarrollo

de moho en la superficie de la levadura. La crema de levadura líquida (15 a 24%) sufre del mismo envejecimiento y problema de refrigeración y requiere agitación por la tendencia natural de la levadura a sedimentarse.

5 [0016] Ninguna de las anteriormente mencionadas formas en las que la levadura es actualmente suministrada es satisfactoria. Las más bien pequeñas cantidades de levadura requeridas en las instalaciones de etanol comerciales, comparadas con el tamaño de las operaciones, no hace rentable entregar cantidades pequeñas de levadura en una base frecuente a esas plantas. En muchos casos, la levadura fresca puede no estar disponible o la levadura comprimida fresca puede secarse, mohosa o inactiva. A la inversa, un producto de levadura seca permanece activo durante un largo periodo de tiempo pero, en cualquier caso, debe ser despertado apropiadamente y no es tan rápido como la levadura fresca; esta es una de las principales razones por la que los propagadores son comunes en la industria. En cuanto a la crema de levadura, tiene la tendencia a sedimentarse en la parte de abajo del contenedor en el que se transporta. Consecuentemente la crema de levadura tiene que ser agitada antes del uso.

15 [0017] La US-A-6033887 describe un gel polisacárido parcialmente deshidratado (alginato) que comprende una levadura o bacteria, un azúcar seleccionado de la xilosa, glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa en una cantidad de al menos 100g/kg del gel antes de la deshidratación, y un poliol seleccionado del sorbitol, inositol y glicerol en una cantidad de al menos 30 g/kg del gel antes de la deshidratación.

20 [0018] La WO 91/12315 describe una composición que comprende levadura fresca y un compuesto de polihidroxi seleccionado de propilenglicol, glicerol, mono- o oligosacáridos no fermentables o alcoholes de azúcar, carbohidratos oligo- o poliméricos solubles y polietilenglicol, o mezclas de los mismos.

[0019] La EP 461725 describe una composición que comprende una crema de levadura y una goma, como la goma de algarroba, guar, de tragacanto, Arábica o xantana.

25 [0020] La GB 1425979 describe una composición que comprende levadura y manitol.

[0021] La presente invención pretende eliminar las desventajas descritas anteriormente.

30 [0022] Uno de los objetos de la presente invención es proporcionar un proceso para la producción de etanol que comprende combinar una preparación de levadura líquida estabilizada (SLY) que comprende un compuesto de polihidroxi, preferiblemente glicerol, y una goma, preferiblemente goma xantana, con una sustancia fermentable. El proceso es definido en la reivindicación 1. El glicerol estabiliza la vitalidad de la levadura y la goma xantana estabiliza la consistencia, evitando el asentamiento de la levadura.

35 [0023] La preparación de SLY usada en el proceso no requiere agitación y tiene una vida útil mejorada sobre la levadura líquida estándar de hasta 90 días.

40 [0024] Además, la preparación de SLY usada en el proceso tiene una fase de retraso más corta y un rendimiento general superior que la levadura comprimida correspondiente.

[0025] Otro objeto de la invención es un nuevo proceso para la producción de etanol que comprende la adición directa o pitcheo de levadura líquida estabilizada de alta germinación a un fermentador de producción, obviando de este modo la necesidad de un paso de propagación.

45 [0026]

50 La Figura 1 ilustra la actividad fermentativa relativa de una preparación de levadura líquida estabilizada contra la de las bolsas (levadura comprimida) y la de la levadura líquida normal.

La Figura 2 ilustra el mejor rendimiento de una preparación de levadura líquida estabilizada contra la levadura comprimida normal y la levadura seca durante las 12 primeras horas de la fermentación de la pasta de maíz.

55 La Figura 3 el rendimiento de etanol mejorado de la levadura líquida estabilizada sobre la levadura comprimida.

[0027] La levadura fresca, ya sea en su forma líquida (crema) o en forma prensada o desmenuzada, tiene un número de beneficios. Tal levadura está optimizada para la actividad, no requiere rehidratación, y tiene una fase de retraso más corta en el fermentador. La levadura fresca es usada generalmente para cepas que no pueden tolerar el secado.

60 [0028] La levadura seca, ya sea activa o inactiva, tiene un conjunto de beneficios diferente. Está generalmente optimizada para la estabilidad, no requiere refrigeración y es buena para el uso intermitente (puesta en marcha de la fermentación continua). Es generalmente usada para cepas que se usan en volúmenes pequeños.

65

- 5 **[0029]** Lo que se necesita es una Levadura Líquida Estabilizada (SLY) que tiene muchos de los beneficios de tanto la levadura líquida como la levadura seca. En particular lo que es necesario es una formulación de levadura que tiene una mayor actividad que la levadura fresca convencional; mayor estabilidad que la levadura fresca convencional; una fase de retraso más corta en el fermentador; no requiere agitación; y proporciona la posibilidad de picheo directo sin la necesidad de un propagador.
- 10 **[0030]** Se proporciona una SLY que cumple estas necesidades insatisfechas y está comprendida de una crema de levadura, en combinación con una o más gomas y uno o más compuestos de polihidroxi.
- 15 **[0031]** Más específicamente, la crema de levadura (15-24% de sólidos) comprende una goma y un compuesto de polihidroxi. La goma está presente en la crema de levadura en una concentración de 0,03 al 1% por peso de la levadura de crema, y es seleccionada de la algarroba, guar, tragacanto, goma arábica o xantana. El termino goma incluye gomas que pueden ser obtenidas de plantas o que son de origen microbiano o mezclas de los mismos.
- 20 **[0032]** La formulación también incluye uno o más compuestos de polihidroxi seleccionados de propilenglicol, glicerol, mono- o oligosacáridos no fermentables, como la xilosa, o alcoholes de azúcar no fermentables, como el manitol y el sorbitol, carbohidratos oligo- o poliméricos solubles como el almidón parcialmente hidrolizado, celulosa o agarosa y polietilenglicol o mezclas de los mismos. Preferiblemente la formulación contiene de un 1 a un 5% de glicerol por peso de la crema de levadura.
- 25 **[0033]** En una realización más preferida se usa 0,5 g/kg de pasta de SLY en la fermentación en donde el SLY está compuesto de 3,2% (w/v) de 95% de glicerol y 0,1% (w/v) de goma xantana.
- 30 **[0034]** Además, la formulación de SLY comprende una levadura que es alta en nitrógeno, proteínas, actividad o levadura en germinación del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota*, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o combinaciones de una o más de las especies de levadura mencionadas.
- 35 **[0035]** Un objeto adicional de la invención es un nuevo proceso para la producción de etanol, que comprende la adición directa o picheo de la SLY de alta germinación descrita a un fermentador de producción, por lo tanto obviando la necesidad para un paso de propagación.
- 40 **[0036]** Tales preparaciones de SLY no son sólo de interés para la industria de combustible de etanol (no limitada a la fermentación de pasta de maíz tampoco, incluyendo también sustratos celulósicos o "biomasa" o cualquier otro sustrato usado en la fabricación de combustible de etanol) si no que también son aplicables a los alcoholes potables (destilación), fermentación, panificación, bebidas fermentadas en general, y cualquier proceso de fermentación que requiera las características de la mencionada SLY.
- 45 **[0037]** También pueden ser añadidas ayudas a la transformación a las composiciones de levadura descritas en tal cantidad que las propiedades del producto final son mejoradas cuando las mencionadas composiciones son añadidas a l mezcla de fermentación o masa. Como se describe más adelante las ayudas a la transformación pueden ser divididas en nutrientes, aditivos químicos y enzimas.
- 50 **[0038]** Los componentes nutrientes pueden incluir nitrógeno inorgánico (como urea y sales nitrogenadas), nitrógeno orgánico (como levadura, autolisado de levadura, extracto de levadura, o solubles de fermentación), fósforo (como sales de nitrógeno y fósforo), minerales (como las sales), vitaminas.
- 55 **[0039]** Los aditivos químicos adecuados son agentes oxidantes como el ácido ascórbico, el bromato y la azodicarbonamida y/o agentes reductores como la L-cisteína y el glutatión. Un agente oxidante preferido usado a menudo para la panificación es el ácido ascórbico, que es añadido a la composición en tales cantidades que resultan en una cantidad de entre 5 y 300 mg por kg de harina. Otros aditivos químicos adecuados son los emulsionantes actuando como acondicionadores de masa como los ésteres diacetiltartáricos de mono/diglicéridos (DATEM), el lactilato estearoil de sodio (SSL) o el lactilato estearoil de calcio (CSL), o actuando como suavizantes de las migas como el monoestearato de glicerol (GMS) o sales biliares, materiales grasos como los triglicéridos (grasas) o lecitina y otros. Los emulsionantes preferidos son los DATEM, SSL, CSL o GMS. Las sales biliares preferidas con colatos, deoxicolatos y taurodeoxicolatos.
- 60 **[0040]** Los enzimas adecuados don enzimas degradantes de almidón, arabinoxilano- y otros enzimas degradantes de la hemicelulosa, enzimas degradantes de la celulosa, enzimas oxidantes, enzimas divisores de material graso, enzimas degradantes de proteínas. Los enzimas degradantes de almidón preferidos son amilasas endo-activas como la amilasa-alfa y amilasas exo-activas como la beta-amilasa y la glucoamilasa. Los enzimas degradantes de arabinoxilano preferidos son las pentosanasas, las hemicelulosas, las xilanasas y/o arabinofuronosidades, en particular xilanasas del *Aspergillus* de la especie *Bacillus*. Las enzimas degradantes de celulosa preferidas son las celulasas (es decir endo-1,4-beta-glucanasas) y las celobiohidrolasas en particular de la especie *Aspergillus*, *Trichoderma* o *Humicola*. Los enzimas oxidantes preferidos don las Hpoxigenasas, las oxidasas de glucosa, las oxidasas de sulhidrilo, las oxidasas de hexosa, las oxidasas de piranosa y las lacasas. Los enzimas divisores del material graso preferidos son las lipasas, en particular lipasas fúngicas de la especie *Aspergillus* o *Humicola*, y las

5 fosfolipasas como la fosfolipasa A1 y/o A2. Los enzimas degradantes de proteínas son proteinasas endo-activas como las pertenecientes a las clases tiolproteasas, metaloproteasas, proteasas de serina y proteasas de aspartil, así como proteinasas exo-activas, también conocidas como peptidasas, pertenecientes a la clase de las aminopeptidasas y las carboxipeptidasas. Adicionalmente, también pueden ser añadidas las proteasas microbianas y vegetales para producir nitrógeno libre de amino de las proteínas en grano.

10 [0041] Los enzimas pueden proceder de origen animal, vegetal o microbiano y pueden ser obtenidos de estas fuentes por procesos clásicos conocidos en la técnica, o, alternativamente, pueden ser producidos por tecnología de ADN recombinante. Un proceso de producción preferido comprende procesos de fermentación en el que se cultivan hongos, levadura o bacterias que producen los enzimas deseados, ya sea inherentemente o como un resultado de modificación genética (tecnología de ADN recombinante). Estos procesos son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, los enzimas son secretados por micro-organismos en el caldo de fermentación. Al final del proceso de fermentación, la biomasa celular es habitualmente separada y, dependiendo de la concentración de enzimas en el caldo, las últimas pueden ser concentradas más y opcionalmente lavadas por técnicas conocidas como la ultrafiltración. Opcionalmente, los concentrados de enzima o una mezcla de tales concentrados pueden ser secados por técnicas conocidas como el secado por aspersión.

20 [0042] Además, a pesar de que la invención contempla el uso de la mencionada preparación de SLY en fermentadores comerciales, no está tan limitada. La SLY puede ser añadida en cualquier paso del proceso, incluyendo los propagadores.

EJEMPLOS

25 *Muestras de almidón de maíz y de levadura*

30 [0043] Se usó pasta de maíz industrial en todas las pruebas de fermentación comparativa a escala de laboratorio. La pasta ya tenía el backset añadido. Es alrededor del 60% del líquido usado para hacer la pasta. La pasta fue hecha de maíz de Dakota del Sur y había sido cocinada a chorro a 130° C durante 2 minutos. La pasta de maíz fue recogida justo después de la licuefacción. No se añadieron glucoamilasa o urea en la pasta. Se determinó que los sólidos totales de la pasta de maíz eran de alrededor del 30%.

[0044] La levadura usada es una cepa de combustible de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* producida por Lallemand Inc y distribuida por Ethanol Technology. La levadura comprimida fue hecha de la misma cepa.

35 *Experimentos de fermentación de frascos de pasta*

40 [0045] Se usó el protocolo de fermentación de pasta de maíz de laboratorio estándar. Se dispensaron precisamente 100g de pasta de maíz industrial como se ha descrito anteriormente en frascos de Erlenmeyer de 125 ml. A cada frasco, se añadieron 20µm de glucoamilasa y 16 mM de urea. Para los experimentos, la tasa de pitcheo fue de 0,5 g/kg (as ls). Las muestras de levadura IDY fueron primero rehidratadas en agua corriente a 37° C durante 15 minutos antes de la inoculación. Tras inocular cada frasco, las fermentaciones de la pasta de maíz se llevaron a cabo en un agitador rotatorio a 35° C y 150 rpm. Todos los experimentos de frascos agitadores fueron realizados por triplicado.

45 [0046] El fundamento del método gravimétrico está basado en la pérdida de peso durante la fermentación de la pasta de maíz. Durante la fermentación se produce y se libera dióxido de carbono, resultando en una pérdida de peso en el tarro o frasco. Después la producción de etanol es determinada en base a la relación estequiométrica entre el dióxido de carbono y el etanol. Registrando la pérdida de peso a ciertos intervalos durante la fermentación, se pueden determinar la tasa y el rendimiento de producción de etanol. EL método gravimétrico proporciona un método fiable, conveniente y barato para la determinación del etanol.

Ejemplo 1: Test de Estabilidad: Comparación de la Vida Útil

55 [0047] La estabilidad y vida útil de la Levadura Líquida Estabilizada fue comparada con la de la Levadura Líquida tradicional y productos de Levadura Comprimida. La Actividad de Fermentación fue medida por el método gravimétrico. La levadura usada es una cepa de combustible de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* producida por Lallemand Inc. y distribuida por Ethanol Technology. La actividad fue medida por el método gravimétrico.

60 [0048] Como se muestra en la tabla siguiente y en la Figura 1, la preparación estabilizada tiene una mejor vida útil y no muestra signos de asentamiento.

Tabla 1: comparación de la Vida Útil

Tiempo (días)	Levadura Líquida Estabilizada	Levadura Líquida (Crema)	Levadura Comprimida
Actividad Fermentativa (%)			
0	100	100	100
15	95	90	85
30	92	80	75
45	88	70	65
60	85	65	55
75	82	45	40
90	83	38	30

Ejemplo 2: Rendimiento Comparativo de la producción de Etanol de la levadura SLY

- 5 **[0049]** Se realizó una comparación de la capacidad de producción de etanol de la levadura seca activa, la levadura comprimida y la levadura líquida estabilizada. Como se ha mencionado anteriormente, toda la levadura usada en este experimento es una cepa de combustible de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* producida por Lallemand Inc. y distribuida por Ethanol Technology. La actividad fue medida por el método gravimétrico descrito anteriormente. La levadura líquida estabilizada probada comprendía 3,2 % (w/v) de 95% de Glicerol y 0,1 % (w/v) de goma Xantana.
- 10 **[0050]** La levadura fue incubada con pasta de maíz y la producción de etanol fue medida a intervalos de 2 horas durante 12 horas. La Tabla 2 y la Figura 2 muestran que la LSY tenía un rol de fermentación más rápido que la levadura comprimida o que la levadura seca activa.
- 15 **[0051]** La pasta de maíz es de origen industrial, contiene un 60% de backset y ya ha sido tratada con alfa-amilasa. Ver más arriba. Ilustra como el glicerol contribuye a estabilizar la vitalidad de la levadura “muy activa” que a su vez se traduce en una fase de retraso más corta. A pesar de que la invención cubre la levadura en todos los estados fisiológicos (fase exponencial de crecimiento, fase estacionaria de crecimiento, etc.), el término levadura “muy activa” supone levadura con más del 3% de células en germinación o/y levadura con contenido de proteínas (N x 6,25) mayor del 40%) y con/o un contenido de fosfato (como el P205) mayor del 2%. Esta fase de retraso más corta
- 20 también contribuye a reducir el impacto de la contaminación bacteriana inherente que viene con la pasta y permite al productor de combustible de etanol evitar el paso de propagación y añadir la levadura (paso de pitcheo) directamente a los fermentadores. También puede contribuir a reducir el uso de antibióticos usados comúnmente en esta industria.

Tabla 2. Rendimiento Comparativo de la levadura SLY durante las primeras 12 horas de fermentación

	2H		4H		6H		8H		10H		12H							
	pe so (g)	EIOH Produ cido (g)	pe so (g)	EIOH Produ cido (g)	pe so (g)	EIOH Produ cido (g)	pe so (g)	EIOH Produ cido (g)	pe so (g)	EIOH Produ cido (g)	pe so (g)	EIOH Produ cido (g)						
Levadura Seca	21	0.0	0.020	213	0.06	0.0627	212.	0.32	0.3344	212	1.02	1.0659	211.	2.09	2.1840	209.	3.46	3.6157
	3.1	3.1	2	.06			8			1			03		5	66		
	2																	
	21	0.0	0.020	216	0.08	0.0836	216.	0.35	0.3657	215.	1.07	1.1181	214.	2.15	2.2467	212.	3.52	3.6784
6.3	6.3	2	.29			02		5	3		5	22		5	85			
7																		
21	0.0	0.041	219	0.08	0.0836	218.	0.34	0.3553	218.	1.01	1.0554	217.	2.09	2.1840	215.	3.5	3.6575	
9.1	9.1	4	.1			84			17		5	09		5	68			
8																		
SLY	21	0.0	0.031	216	0.09	0.0940	216.	0.42	0.4389	215.	1.25	1.3062	214.	2.46	2.5707	212.	3.89	4.0650
	6.5	6.4	3	.43		5.	1		27		5	06				63		5
	2																	
	21	0	0	213	0.03	0.0313	213.	0.4	0.418	212.	1.27	1.3271	211.	2.51	2.6229	209.	3.91	4.0859
3.9	3.9		.87		5	5		63		5	39		5	5	99		5	
21	0.0	0.031	214	0.11	0.1149	214.	0.46	0.4807	213.	1.34	1.4003	212.	2.58	2.6961	210.	3.97	4.1486	
4.8	4.7	3	.71		5	36			48			24			85		5	
2																		
Comprimida	21	0.0	0.031	215	0.07	0.0731	214.	0.36	0.3762	213.	1.15	1.2017	212.	2.29	2.3930	211.	3.74	3.9083
	5.0	5.0	3	.01		5	72		93		5	79		5	34			
	8																	
	21	0.0	0.020	215	0.07	0.0731	214.	0.37	0.3866	214.	1.16	1.2122	212.	2.33	2.4348	211.	3.76	3.9292
5.3	5.2	2	.23		5	93		14				97		5	54			
8																		
21	0.0	0.020	213	0.07	0.0731	213.	0.38	0.3971	212	1.17	1.2226	211.	2.35	2.4557	209.	3.8	3.971	
3.7	3.7	2	.66		5	35			56		5	38		5	93			
3																		

Ejemplo 3: Rendimiento de Etanol Mejorado de la Levadura Líquida Estabilizada

5 [0052] La Tabla 3 y la Figura 3 además ilustran como el proceso de estabilización permite a una preparación de levadura líquida rendir mejor (es decir, tiene un rendimiento de etanol mejor). La Levadura Líquida Estabilizada fue comparada con la levadura Comprimida para la misma cantidad de sólidos "tal cual". Se usó la misma composición de pasta de maíz que en el Ejemplo 2.

10 [0053] Como se ha mencionado anteriormente, toda la levadura usada en este experimento es una cepa de combustible de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* producida por Lallemand Inc. y distribuida por Ethanol Technology. La actividad fue medida por el método gravimétrico descrito anteriormente. La levadura líquida estabilizada probada comprendía 3,2 % (w/v) de 95% de Glicerol y 0,1 % (w/v) de goma Xantana.

15 [0054] Resulta aparente de los resultados que el proceso de estabilización permite que la levadura de un rendimiento de etanol mejor que la forma no estabilizada. La leve diferencia observada se traduce en una mejora impresionante en una escala industrial completa.

Tabla 3: Rendimiento de etanol mejorado de la levadura líquida estabilizada sobre la levadura comprimida

Muestra	Conc. (g/kg)	Cepa	Tiempo	0	15	19	23	39	43	47	63
1	0.25	SLY		215.12	209.56	208.53	207.63	204.96	204.70	204.54	204.36
2	0.25	SLY		216.50	211.03	209.90	209.06	206.45	206.16	205.96	205.66
3	0.25	SLY		219.46	213.89	212.79	211.93	209.35	209.11	208.91	208.70
4	0.25	Comprimida		213.98	208.60	207.29	206.32	204.01	203.85	203.72	203.53
5	0.25	Comprimida		203.66	198.36	197.12	196.20	193.81	193.59	193.44	193.18
6	0.25	Comprimida		219.01	213.78	212.55	211.63	209.27	209.06	208.91	208.61
MASA DE LOS FRASCOS											
1	0.25	SLY			5.56	6.59	7.49	10.16	10.42	10.58	10.76
2	0.25	SLY			5.47	6.6	7.44	10.05	10.34	10.54	10.84
3	0.25	SLY			5.57	6.67	7.53	10.11	10.35	10.55	10.76
4	0.25	Comprimida			5.38	6.69	7.66	9.97	10.13	10.26	10.45
5	0.25	Comprimida			5.3	6.54	7.46	9.85	10.07	10.22	10.48
6	0.25	Comprimida			5.23	6.46	7.38	9.74	9.95	10.1	10.4
PERDIDA DE PESO											
ETANOL PRODUCIDO											
1	0.25	SLY			5.8102	6.8866	7.8271	10.6172	10.8889	11.0561	11.2442
2	0.25	SLY			5.7162	6.8970	7.7748	10.5023	10.8053	11.0143	11.3278
3	0.25	SLY			5.8207	6.9702	7.8689	10.5650	10.8158	11.0248	11.2442
4	0.25	Comprimida			5.6221	6.9911	8.0047	10.4187	10.5859	10.7217	10.9203
5	0.25	Comprimida			5.5385	6.8343	7.7957	10.2933	10.5232	10.6799	10.9516
6	0.25	Comprimida			5.4653	6.7507	7.7121	10.1783	10.3978	10.5545	10.8680

Ejemplo 4: Comparación del Rendimiento de fermentación tras almacenamiento de 8 semanas

5 [0055] Como se ha mencionado anteriormente, toda la levadura usada en este experimento es una cepa de combustible de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* producida por Lallemand Inc. y distribuida por Ethanol Technology. La actividad fue medida por el método gravimétrico descrito anteriormente. La levadura líquida estabilizada probada comprendía 3,2 % (w/v) de 95% de Glicerol y 0,1 % (w/v) de goma Xantana.

Tabla 4: Rendimiento de la fermentación tras almacenamiento de 8 semanas

Tiempo	Levadura de Bolsa Fresca	Levadura Líquida Estabilizada
6,5 Horas	0,630 g	0,664 g
8 Horas	1,341 g	1,393 g
10 Horas	2,633 g	2,710 g
24 Horas	8,012 g	8,085 g
32 Horas	9,712 g	9,868 g
48 Horas	11,007 g	11,234 g

Experimento 5: Actividad Tras Almacenamiento de 8 semanas

10 [0056] En este experimento, se usó la levadura de Panadería de Lallemand; la SLY fue producida usando 3,2% de 95% de glicerol y 0,1% de goma xantana (todos w/v). Bajo estrés normal la levadura fue probada en una formulación de pan blanco que contenía, entre otros ingredientes, 3,8% (w/w Vs harina) de azúcar, 1,7% (w/w) de sal de mesa (NaCl), y 181 g de agua por cada 275 g de harina. Bajo condiciones de estrés la levadura fue probada para su producción de gas en una masa que contenía 16,7% (w/w Vs harina) de azúcar (sacarosa), 16,7% (w/w Vs harina) de grasa (materia grasa), 2% (w/w) de sal y 147 g de agua por cada 300 g de harina.

15 [0057] La producción de gas fue evaluada poniendo una cantidad conocida de masa en el fermentografo, (SJA (Suecia) o Risograph (USA)) e incubándola durante una hora a 35 C. La misma cantidad de levadura fue usada en este ejemplo; es decir 4,7% (w/w Vs harina) de levadura comprimida o su equivalente de SLY para las condiciones de Estrés Normales y 5,0% de levadura comprimida o su equivalente de SLY bajo condiciones de Estrés Altas.

20 [0058] Este experimento muestra que la Levadura Líquida Estabilizada supera la levadura de bolsa fresca tras un periodo de almacenamiento extendido (8 semanas). También muestra que la LSY tiene unas características de fermentación significativamente mejoradas en situaciones de estrés altas.

Tabla 5: Resultados de la Prueba de Actividad tras almacenamiento de 8 semanas

Pruebas de Actividad	Levadura de Bolsa Fresca	Levadura Líquida Estabilizada
Estrés Alto	275 cc	360 cc
Estrés Normal	550 cc	575 cc

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de producción de etanol que comprende combinar una composición que comprende (a) levadura (b) una o más gomas y (c) uno o más compuestos de polihidroxi con una sustancia fermentable, en donde la levadura es de un género seleccionado de: Saccharomyces, Kluyveromyces y Torulaspora y está en forma de levadura en crema, la goma está presente en alrededor de ,03 a alrededor del 1% por peso y es seleccionada del grupo consistente de algarroba, tragacanto, goma arábica, guar y xantana, y el compuesto de polihidroxi está presente en alrededor de un 1 a un 5% por peso y es seleccionado del grupo consistente de glicerol, propilenglicol, monosacaridos no fermentables, oligosacáridos no fermentables, alcoholes de azúcar no fermentables, oligocarbhidratos solubles, carbhidratos poliméricos solubles y polietilenglicol, y mezclas de los mismos.
- 10 **2.** El método de la reivindicación 1, que comprende pitchear la composición directamente al fermentador de producción.
- 15 **3.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la crema en la composición está compuesta de alrededor del 15-24% de sólidos.
- 20 **4.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en done la levadura en la composición es Saccharomyces.
- 25 **5.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde le monosacárido no fermentable en la composición es xilosa.
- 30 **6.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el alcohol de azúcar no fermentable en la composición es seleccionado del grupo consistente de manitol y sorbitol.
- 30 **7.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el carbhidrato polimérico en la composición es seleccionado del grupo consistente de almidón hidrolizado, celulosa y agarosa.
- 30 **8.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la levadura en la composición es seleccionada del grupo que comprende levadura de alta actividad, levadura de alta germinación, levadura de nitrógeno alto y levadura de proteínas altas.
- 30 **9.** El método de la reivindicación 8, en donde la levadura es levadura de alta germinación.

LLE muestra una mejor vida útil que la levadura líquida normal y que la levadura comprimida

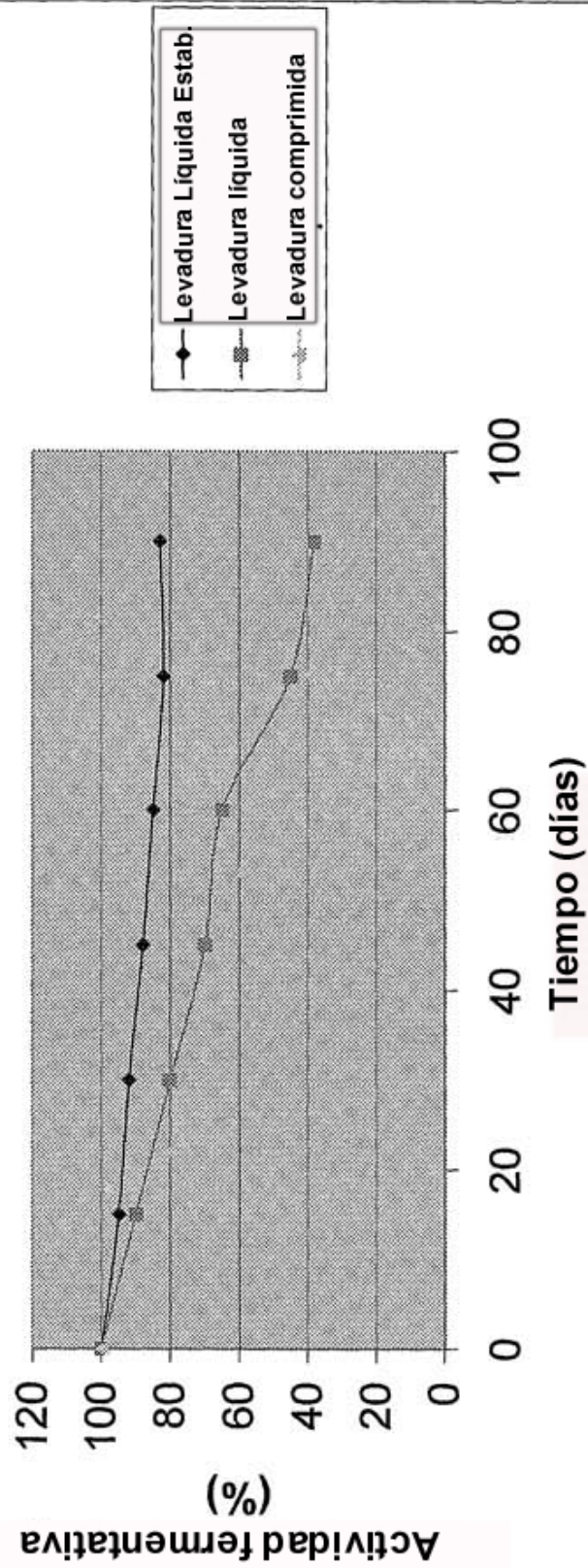


Fig. 1

LLE (■) muestra una velocidad de fermentación más rápida que la Levadura Comprimida (X) y que la levadura seca (◆)

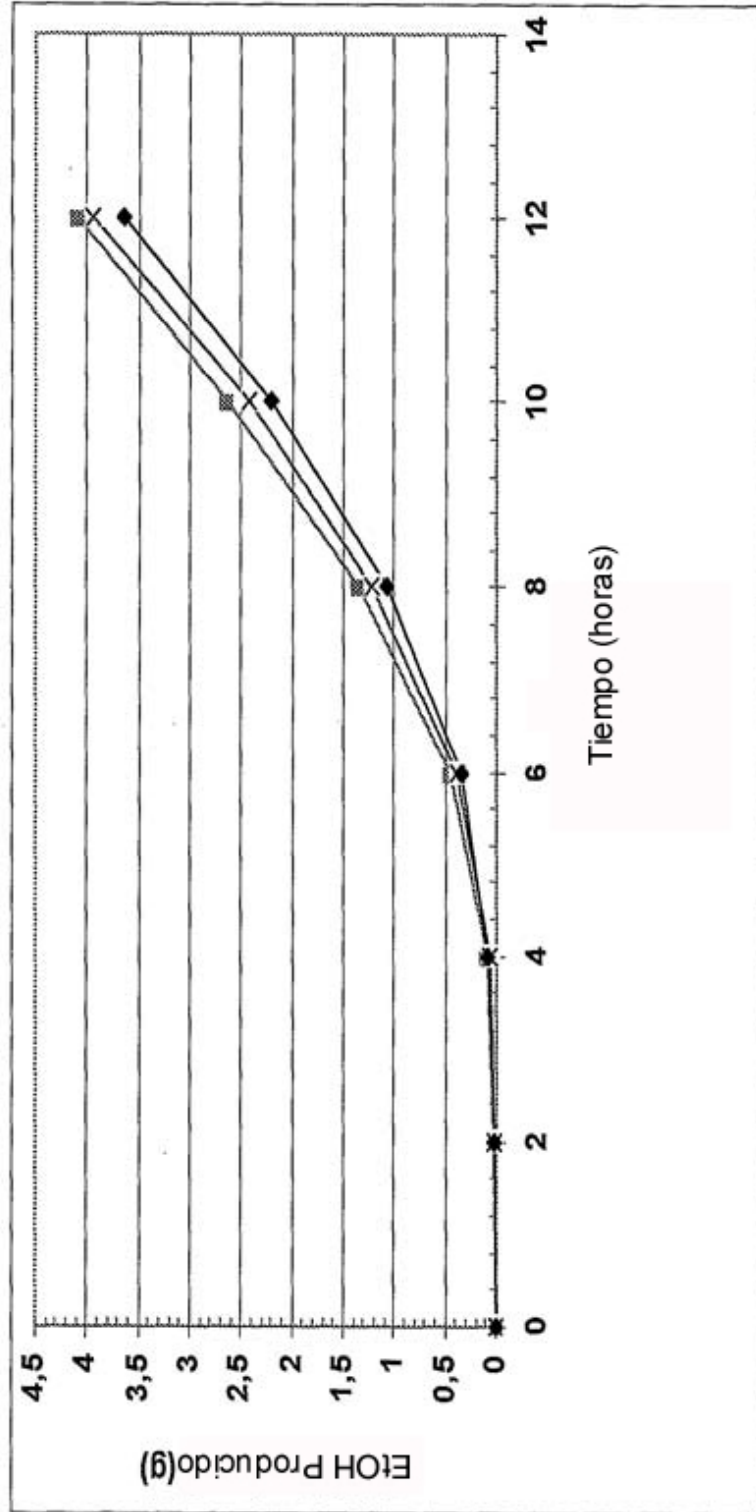


Fig. 2

Mejor rendimiento del Etanol con LLE(*)contra Levadura Comprimida(■)

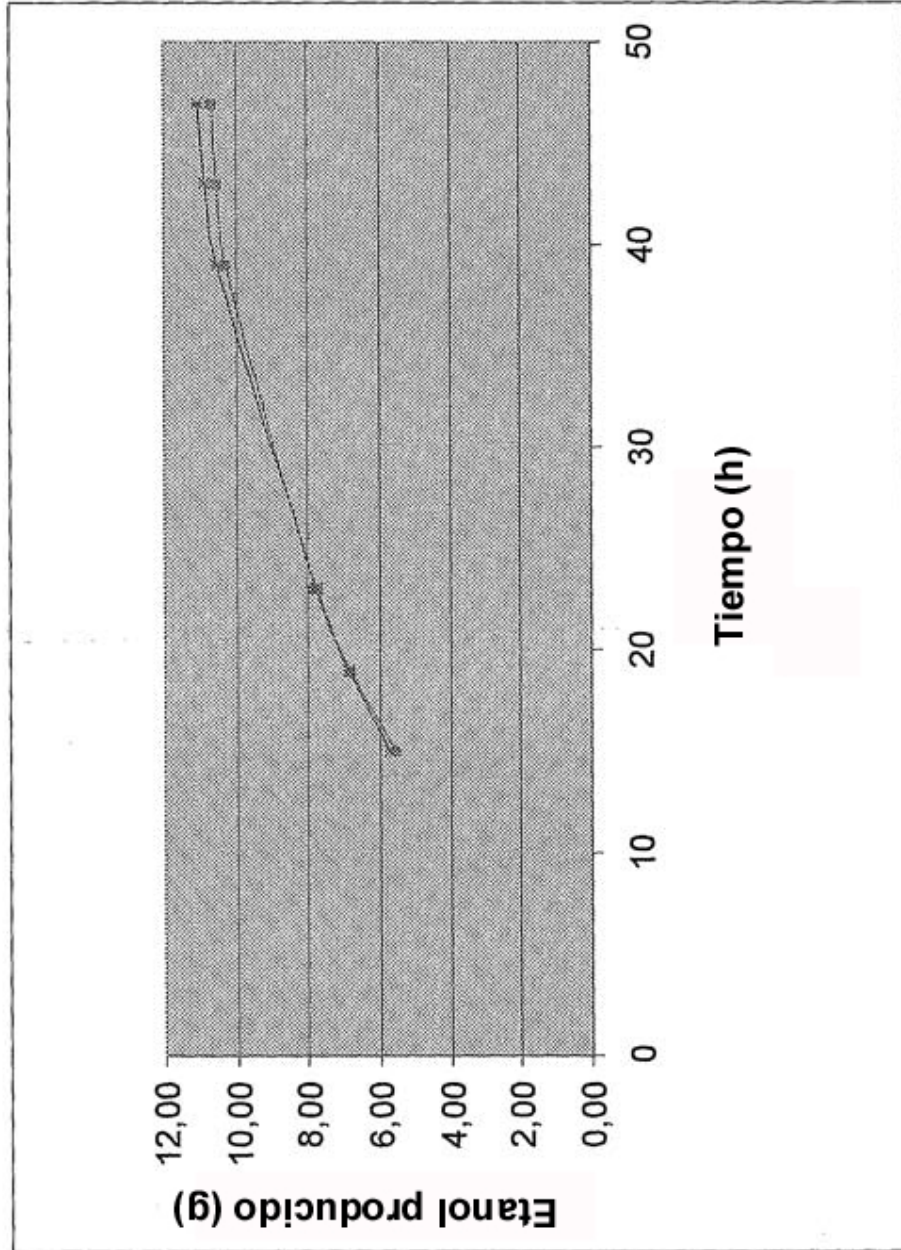


Fig. 3