

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 922**

51 Int. Cl.:
C12P 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07815126 .3**
96 Fecha de presentación: **01.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2069515**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Procedimiento para producir eritritol utilizando cepas de Moniliella tomentosa en presencia de nitratos inorgánicos como fuente de nitrógeno**

30 Prioridad:
03.10.2006 AT 16462006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.08.2012

73 Titular/es:
**JUNGBUNZLAUER AUSTRIA AG
SCHWARZENBERGPLATZ 16
1010 WIEN, AT**

72 Inventor/es:
**EDLAUER, Robert y
TRIMMEL, Stefan**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 385 922 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir eritritol utilizando cepas de *Moniliella tomentosa* en presencia de nitratos inorgánicos como fuente de nitrógeno.

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la producción de eritritol mediante la recuperación de un medio de cultivo de un cultivo de un microorganismo.

Técnica anterior

Existen numerosos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de eritritol por microorganismos, especialmente levaduras, en los que se utilizan varias fuentes de nitrógeno. El documento JP-A 47-41549, por ejemplo, describe la utilización de hidrolizado de caseína como fuente de nitrógeno para cepas de las especies *Trigonopsis* y *Candida*. El documento JP-A 51-21072 da a conocer la utilización de extracto de levadura y urea para diferentes cepas de levadura.

Los documentos JP-A 60-110295 y JP-A 1-199584 describen cada uno la utilización de *Moniliella tomentosa* var. *pollinis* para la producción de eritritol. Como se sabe que esta variedad presenta una elevada demanda de nutrientes, el medio de cultivo conocido para la utilización en ella presenta normalmente un contenido elevado de fuentes complejas de nitrógeno como extracto de levadura, peptona, licor de maíz fermentado o sustancias similares con alto contenido de proteínas de origen vegetal o animal. Por consiguiente, en el licor de maíz fermentado de JP-A 60-110295 y JP-A 1-199584, la urea y el extracto de levadura se utilizan como fuentes de nitrógeno.

Sin embargo, estas fuentes complejas de nitrógeno no sólo constituyen un factor decisivo del coste sino también una purificación complicada del eritritol formado y reduce el rendimiento después de la cristalización. Por consiguiente, se han emprendido considerables esfuerzos para reducir la porción de fuentes complejas de nitrógeno en la medida de lo posible. Esto se puede conseguir utilizando fuentes orgánicas de nitrógeno como urea o sales inorgánicas como el sulfato de amonio. Puesto que durante la fermentación del eritritol se forman cantidades considerables de etanol, la utilización de urea crea problemas debido a la posible formación de carbamato de etilo, que está catalogado como cancerígeno (G. Hasselbeck, W. Henke; Erbsloeh-Weinkompndium Enzyme; Erbsloeh Geisenheim Getraenketehnologie; D-65366 Geisenheim; p. 14).

Por consiguiente, el documento EP 0.845.538 B1 y su traducción alemana DE 697 20 379 T2, que se ocupa de este problema, da a conocer la utilización combinada de sulfato de amonio, una sal inorgánica y licor de maíz fermentado, en la que el primero se denomina "fuente principal de nitrógeno" y constituye del 50 al 85% de las fuentes de nitrógeno, mientras que el último constituye del 15 al 50% restante. Las cepas de levadura indicadas además de la *Moniliella* (también "*Moniliella pollinis*") son miembros de las especies *Yarrowia* y *Trichosporonoides*. Un etapa del procedimiento descrita es el ajuste del pH a valores entre 3 y 7 (ver también la reivindicación 12 en el presente documento). Una utilidad opcional del nitrato de potasio como fuente de nitrógeno está indicada en una tabla como ejemplo general.

Por supuesto, desde 1985 se sabe por el documento EP 0.136.802 A que la formación de polirol por *Moniliella tomentosa* var. *pollinis* rinde de forma deseable a un pH dentro de un intervalo de 3 a 6, preferentemente un pH dentro de un intervalo de 4 a 5. Los efectos del valor del pH en el rendimiento del polirol se describen en 1972 por L. Hanssens, A. Van Regenmortel y H. Verachtern (Applied Microbiology, Nov. 1972, p. 831-833).

Por consiguiente, la utilización de sulfato de amonio descrita en el documento EP 0.845.538 B1, que es una sal de un ácido dibásico muy fuerte ($pK_A = -3$ y $1,9$) y una base débil en comparación ($pK_B = 4,75$, es decir, $pK_A = 9,25$), requiere categóricamente una regulación del valor del pH, si no la liberación de ácido sulfúrico hace disminuir el pH a un valor inferior a 3, a veces incluso inferior a 2, lo que es desfavorable para el crecimiento y la producción. El documento EP 0.845.538 B1 soluciona este problema repartiendo automáticamente un 35% de hidróxido sódico, lo que requiere unas medidas de control adicionales considerables y puede conducir al completo fracaso de la fermentación en el caso de un mal funcionamiento.

Otro aspecto en relación a la fermentación para la obtención de eritritol se refiere a la supresión de productos secundarios como ribitol y glicerol. En este contexto, el documento EP 0.845.538 da a conocer que una proporción más elevada de fuentes complejas de nitrógeno (en este caso licor de maíz fermentado) estimula la formación de glicerol. Sin embargo, limitar las sustancias complejas promotoras de crecimiento siempre implica una reducción de las tasas de crecimiento y producción. El procedimiento según el documento EP 0.845.538, en el que, además del sulfato de amonio se utiliza hasta un 50% de licor de maíz fermentado como fuente de nitrógeno, soluciona este problema de la formación de productos secundarios de forma insuficiente, como se muestra en los ejemplos de ese documento debido a que la formación de glicerol no se puede suprimir completamente: la cantidad de glicerol formado varía entre aproximadamente un 1,9% (Ejemplo 5) y un 50,2% (Ejemplo 12) de la cantidad de eritritol.

En la publicación Biotechnology and Bioengineering del 5 de agosto de 2006, p. 889-908, Diano et. al. investigaron sobre los efectos de varios parámetros, por ejemplo, las fuentes de nitrógeno amonio y nitrato, en el metabolismo de

Aspergillus niger. El valor del pH se situó inicialmente en 3 y después se aumentó gradualmente hasta 4,5. Los resultados mostraron que el nitrato, al contrario que el amonio, presenta un impacto positivo en la producción de algunos alcoholes, por ejemplo eritritol, por *Aspergillus*.

5 El documento US 6.030.820 A describe un procedimiento para la producción de eritritol cristalino de gran pureza a partir de una solución de un cultivo microbiano como material de partida. Un posible microorganismo descrito para obtener el material de partida es la *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*, y una posible fuente de nitrógeno indicada es nitrato de amonio. Ni éste ni el valor del pH durante el cultivo están descritos con detalle.

10 Además, el documento EP 0.327.342 A2 da a conocer un procedimiento para la producción de eritritol mediante el cultivo de microorganismos produciendo lo mismo, en el que la concentración celular en el tanque de fermentación se regula continuamente reciclando una parte del caldo de cultivo a través de un separador celular externo. El nitrato de amonio se menciona como ejemplo general de una posible fuente de nitrógeno. El único ejemplo proporcionado para el microorganismo es *Aureobasidium* sp. *SN-G42*, y sólo en el último ejemplo se proporciona un valor del pH (pH 4,2) para el medio de cultivo, pero no se indica a excepción de ahí.

15 En la publicación *Biotechnology and Bioengineering* 8(3), 173-178 (2003), Lee, Kwang-Jun et. al. describen la mejora de la productividad del eritritol mediante el cultivo de diferentes mutantes de *Penicillium*. Para uno de ellos se indica que el rendimiento del eritritol se puede aumentar considerablemente mediante la adición de carbonato de amonio, nitrato potásico y nitrato sódico. En el resumen CAS, un ejemplo de un estudio con 0,5% de extracto de levadura $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ (aparentemente oxalato de amonio), se proporcionan 0,1% de KNO_3 y 0,1% de NaNO_3 como fuentes de nitrógeno (es decir, entre las fuentes de nitrógeno, los dos nitratos corresponden a un porcentaje en peso inferior al 17% y una proporción de nitrógeno utilizable de aproximadamente un 15%).

25 **Objetivo de la invención**

Por consiguiente, el objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento económico mejorado para la producción de eritritol con rendimiento y pureza elevados, y que este procedimiento por lo menos reduzca o incluso elimine completamente los problemas indicados anteriormente en relación al valor del pH del medio de cultivo y la

30 **Descripción de la invención**

Este objetivo se consigue mediante la nueva utilización de por lo menos un nitrato inorgánico en un procedimiento de fermentación para la producción de eritritol que utiliza una cepa de levadura de la especie *Moniliella tomentosa* como microorganismo que produce eritritol, en el que se utiliza simultáneamente por lo menos un nitrato inorgánico como fuente principal de nitrógeno y como regulador de pH en el medio de cultivo, así como mediante un procedimiento mejorado para la producción de eritritol. En un procedimiento según la invención, se hace crecer mediante un procedimiento conocido una cepa de levadura de la especie *Moniliella tomentosa* en un medio de cultivo que contiene una o más fuentes de carbono y una o más fuentes de nitrógeno, en el que se utiliza por lo menos un nitrato inorgánico como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, y el eritritol se recupera del medio. De forma análoga a la nueva utilización, el procedimiento de la invención se caracteriza por el hecho que se utiliza por lo menos un nitrato inorgánico simultáneamente como fuente principal de nitrógeno y como regulador del pH en el medio de cultivo. El nitrato inorgánico que por lo menos se debe utilizar se selecciona preferentemente de entre nitrato de potasio, nitrato de sodio y nitrato de amonio, especialmente de nitrato de potasio y nitrato de sodio.

Utilizando por lo menos un nitrato inorgánico como fuente principal de nitrógeno permite de esta forma, por una parte, la omisión de las etapas del proceso de ajuste del pH puesto que el valor del pH se regula seleccionando apropiadamente el tipo y la cantidad de nitrato y siempre permanece dentro de un intervalo óptimo durante la fermentación sin reajustes. Por otra parte, la formación de otros alcoholes, como el glicerol, como productos secundarios se suprime fuertemente y puede, en unas formas de realización preferidas, eliminarse completamente. Los nitratos inorgánicos utilizados según la presente invención son –en contraposición a la urea- aditivos alimentarios aprobados (E251, E252), que además se degradan completamente durante los primeros 2 ó 3 días de fermentación.

55 En la presente memoria, “fuente principal de nitrógeno” significa uno que proporciona por lo menos 20% del nitrógeno utilizable. Sin embargo, las ventajas de la invención se aprecian principalmente cuando se utiliza por lo menos un nitrato inorgánico en una cantidad de entre 30 a 85%, más preferentemente de 45 a 65%, del contenido total de nitrógeno utilizable, en el que las cantidades óptimas respectivas dependen también de la basicidad del catión.

60 Según la invención, se pueden utilizar una o más fuentes de nitrógeno orgánico, por ejemplo, licor de maíz fermentado, extracto de levadura y sus mezclas, además del nitrato inorgánico, incluso en proporciones relativamente elevadas, sin que conduzca a la formación de cantidades no deseadas de productos secundarios. Contrariamente a los hallazgos anteriores, se ha descubierto que el aumento de las concentraciones de licor de maíz fermentado conducen a una reducción de la proporción de productos secundarios. Cuando se utilizan nitratos

inorgánicos según la presente invención, la proporción de la fuente compleja de nitrógeno se puede adaptar óptimamente a los requerimientos de la fermentación, es decir, productividad y rendimiento los más elevados posibles, así como los referentes a productos de aislamiento, por ejemplo, tan pocos componentes interferentes y productos secundarios como sea posible.

5 Según la invención, los microorganismos utilizados son miembros de la especie *Moniliella tomentosa*, preferentemente una cepa de la variedad *pollinis*, para obtener eritritol con un rendimiento y productividad lo más elevado posible debido al efecto especialmente beneficioso de la invención con estos hongos.

10 A continuación, la presente invención se describirá haciendo referencia a los ejemplos, que se proporcionan a título de ilustración.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

100 ml de un medio de precultivo que consiste en

15% de glucosa

20 0,4% de KNO₃

0,1% de extracto de levadura

25 0,6% de licor de maíz fermentado

10 ppm de MnSO₄.H₂O

30 2 ppm de Clorhidrato de tiamina

se ajustaron a un pH de 3,6 con ácido cítrico y se esterilizaron en un matraz de fondo redondo de 500 ml durante 20 minutos a una temperatura de 110°C. El matraz se enfrió a una temperatura de 30°C y se inoculó con *Moniliella tomentosa* var. *pollinis* de una placa de glicerol y se agitó durante 24 horas a una temperatura de 30°C y 200 min⁻¹.

35 1 ml de este precultivo se inoculó en 100 ml de un medio de producción que consiste en

35% de glucosa

40 0,35% de KNO₃

0,05% de extracto de levadura

0,40% de licor de maíz fermentado

45 0,025% de KH₂PO₄

5 ppm de MnSO₄.H₂O

50 3 ppm de clorhidrato de tiamina

Antes de la inoculación, el medio se ajustó a un pH de 3,6 con ácido cítrico en cuatro frascos de agitación de 500 ml, se esterilizó durante 20 minutos a una temperatura de 110°C y se ajustó a una temperatura de 30°C. Los frascos se agitaron durante 9 días a 200 min⁻¹. Durante la fermentación, se tomaron muestras estériles y se analizaron mediante HPLC. En este ejemplo, se añadió un 62% del contenido total de nitrógeno utilizable del medio en la forma de nitrato de potasio.

A continuación se muestran los resultados del análisis de HPLC de los cuatro frascos después de 0, 42, 116, 165 y 210 horas de la fermentación.

Frasco 1			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	27,86	0,36	5,24
116	12,11	7,06	4,25
165	4,23	12,80	3,95
210	0,00	13,71	4,00

Frasco 2			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	27,99	0,35	5,24
116	12,92	7,44	4,26
165	4,54	12,87	3,96
210	0,00	14,52	4,01

Frasco 3			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	27,86	0,37	5,22
116	12,90	7,59	4,27
165	4,29	13,04	3,97
210	0,00	15,25	4,04

Frasco 4			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	27,32	0,36	5,24
116	12,75	7,66	4,26
165	3,96	12,66	3,97
210	0,00	14,26	4,04

- 5 El contenido medio de eritritol de los cuatro frascos fue de 14,4%. El valor del pH se mantuvo dentro del intervalo óptimo de 3 a 6 durante toda la fermentación sin la adición de ninguna base.

Ejemplo comparativo 1

- 10 Se repitió el experimento del Ejemplo 1 con el medio de producción que contenía 0,23% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ en lugar de 0,35% de KNO_3 . La proporción de nitrógeno inorgánico se mantuvo igual en los dos experimentos a aproximadamente 0,05% y correspondía al 62% de la cantidad total de nitrógeno utilizable.

Frasco 1			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	28,75	0,31	2,15
116	26,19	1,13	2,00
165	25,18	1,26	2,01
210	26,77	1,47	1,99

Frasco 2			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	30,62	0,29	2,11
116	25,13	0,90	1,96
165	25,18	0,93	1,97
210	22,82	0,85	1,95

Frasco 3			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	26,41	0,28	2,12
116	25,69	0,98	1,96
165	28,37	1,07	1,98
210	21,50	0,84	1,96

Frasco 4			
Tiempo (h)	% de glucosa	% de eritritol	pH
0	35,00	0,00	3,60
42	30,93	0,31	2,12
116	24,52	0,95	1,94
165	26,83	1,06	1,98
210	26,90	1,06	1,93

- 15 Tal como se muestra en los resultados anteriores, el valor del pH disminuye hasta valores de aproximadamente 2 o inferior durante la fase de crecimiento debido a la asimilación de amonio. Por consiguiente, la producción sin la regulación del pH no es posible. Las cantidades de eritritol formadas son en la misma medida bajas y ascienden hasta aproximadamente 1/10 de las del nuevo Ejemplo 1 en el mejor de los casos.

20 **Ejemplo 2**

- 25 Se repitió el Ejemplo 1 con las cantidades de licor de maíz fermentado (CSL) (0,40%) y nitrato de potasio (0,35%) del Ejemplo 1 mantenidas cada una igual, el doble y también a la mitad. Después de 10 días, se determinaron las concentraciones de glicerol y ribitol así como el rendimiento del eritritol, en relación a la glucosa utilizada. Cada experimento se realizó por duplicado y los valores medios se muestran a continuación.

Glicerol (%)			
KNO_3/CSL	0,20%	0,40%	0,80%
0,18%	6,63	4,68	0,00
0,35%	3,31	0,70	0,00
0,70%	0,78	0,00	0,00

Ribitol (%)			
KNO_3/CSL	0,20%	0,40%	0,80%
0,18%	3,66	3,88	0,80
0,35%	2,32	2,26	0,36
0,70%	0,16	0,15	0,16

Rendimiento del eritritol (%)			
KNO ₃ /CSL	0,20%	0,40%	0,80%
0,18%	26,0	38,1	49,8
0,35%	42,5	50,0	50,1
0,70%	42,3	45,7	44,0

Productividad (g/l.h)			
KNO ₃ /CSL	0,20%	0,40%	0,80%
0,18%	0,55	0,96	1,21
0,35%	0,88	1,06	1,38
0,70%	0,96	1,27	1,31

Es obvio que cuando se utiliza un nitrato inorgánico como fuente principal de nitrógeno, el aumento de las cantidades de licor de maíz fermentado permite una supresión de la formación del producto secundario y al mismo tiempo un aumento del rendimiento. Con el nuevo procedimiento novedoso, se puede evitar por completo que se forme el glicerol como producto secundario mientras que se puede mantener la cantidad de ribitol muy por debajo del 1%. Además, la productividad aumenta considerablemente cuando se añade más nitrógeno.

Ejemplo 3

Se inocularon 50 ml de un precultivo como el descrito en el Ejemplo 1 en 3 litros de fermentador con un medio que consiste en

34% de glucosa

0,20% de KNO₃

0,08% de NH₄NO₃

0,05% de extracto de levadura

0,30% de licor de maíz fermentado

0,025% de KH₂PO₄

3 ppm de MnSO₄.H₂O

3 ppm de clorhidrato de tiamina

La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 28°C sin regulación de pH. La aeración fue de 0,18 vvm a una velocidad de agitación rotacional de 500 rpm⁻¹. Después de que la glucosa se había consumido, se encontraron los resultados siguientes:

eritritol 16,11%

ribitol 0,26%

glicerol 0,00%

valor de pH 3,57

Por consiguiente, se probó que se puede reemplazar parte del nitrato de potasio por otros nitratos inorgánicos sin interferir con las ventajas de la invención descritas anteriormente tal como evidencian los valores de las mediciones.

Ejemplo 4

Se inocularon 80 litros de un precultivo como se ha descrito en el Ejemplo 1 en una columna de burbujeo de 3.000 litros con 2.600 litros de un medio que consiste en

23,01% de glucosa

17,25% de fructosa

0,35% de KNO₃

0,05% de extracto de levadura

0,40% de licor de maíz fermentado

0,025% de KH₂PO₄

5 ppm de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

3 ppm de clorhidrato de tiamina

5 La temperatura se ajustó a 30°C. La aeración se situó a 0,19 vvm. Después de que la glucosa se consumiera completamente, se encontraron los resultados siguientes:

eritritol 19,96%

10 ribitol 0,18%

glicerol 1,96%

15 valor del pH (media) 4,48

rendimiento de eritritol 49,4%

20 El valor del pH varió entre 4,35 y 4,62 y se situó por consiguiente dentro del intervalo óptimo sin ninguna regulación. En ningún momento durante la fermentación fue necesaria la adición de un agente antiespuma. Por consiguiente, este ejemplo muestra que se pueden utilizar otras fuentes de carbono además de glucosa con la misma eficacia en el procedimiento de la invención utilizando nitrógeno inorgánico como fuente principal de nitrógeno.

25 En resumen, utilizando por lo menos un nitrato inorgánico como fuente principal de nitrógeno así como regulador del pH, la presente invención proporciona de este modo procedimientos para la producción de eritritol, mediante mecanismos con los que se puede recuperar el producto deseado con rendimiento y pureza elevados así como de una forma económica; a) etapas del proceso para la regulación del valor del pH se pueden omitir por completo; b) se forman cantidades muy bajas de productos secundarios que interfieren, lo cual facilita enormemente el aislamiento del eritritol; c) se puede aumentar la productividad considerablemente; y d) los nitratos inorgánicos utilizados están disponibles comercialmente a precios bajos. Por consiguiente, no existe ninguna duda sobre la aplicabilidad industrial de la invención.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de por lo menos un nitrato inorgánico en un proceso de fermentación para la producción de eritritol utilizando una cepa de levadura de la especie *Moniliella tomentosa* como un microorganismo que produce eritritol, caracterizada porque utiliza simultáneamente dicho por lo menos un nitrato inorgánico como fuente de nitrógeno que proporciona por lo menos 20% del contenido de nitrógeno utilizable total y como regulador del pH en el medio de cultivo.
- 10 2. Procedimiento para la producción de eritritol, que comprende el crecimiento de una cepa de levadura de la especie *Moniliella tomentosa* en un medio de cultivo que contiene una o más fuentes de carbono y una o más fuentes de nitrógeno, en el que se utiliza por lo menos un nitrato inorgánico como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, así como recuperar eritritol del medio, caracterizado porque utiliza simultáneamente por lo menos un nitrato inorgánico como fuente de nitrógeno que proporciona por lo menos 20% del contenido de nitrógeno utilizable total y como regulador del pH en el medio de cultivo.
- 15 3. Utilización según la reivindicación 1 o procedimiento según la reivindicación 2, caracterizados porque dicho por lo menos un nitrato inorgánico se selecciona de entre nitrato de potasio, nitrato de sodio y nitrato de amonio.
- 20 4. Utilización o procedimiento según la reivindicación 3, caracterizados porque dicho por lo menos un nitrato inorgánico se selecciona de entre nitrato de potasio, nitrato de sodio.
- 25 5. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados porque dicho por lo menos un nitrato inorgánico se utiliza en una cantidad de 30 a 85% del contenido total del nitrógeno utilizable.
- 30 6. Utilización o procedimiento según la reivindicación 5, caracterizados porque dicho por lo menos un nitrato inorgánico se utiliza en una cantidad del 45 al 85% del contenido total del nitrógeno utilizable.
7. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados porque, además de dicho por lo menos un nitrato inorgánico, se utiliza una fuente de nitrógeno orgánico como fuente de nitrógeno adicional.
- 35 8. Utilización o procedimiento según la reivindicación 7, caracterizados porque son utilizados agua de maíz fermentado y/o extracto de levadura como fuentes de nitrógeno adicionales.
9. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizados porque se utiliza una cepa de la *Moniliella tomentosa* de la variedad *pollinis*.