

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 522**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/14** (2006.01)

**C12N 9/34** (2006.01)

**C12N 9/62** (2006.01)

**C12P 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2007 E 07731753 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1996695**

54 Título: **Complemento nutricional para medio de fermentación alcohólica**

30 Prioridad:

**17.03.2006 FR 0602398**

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

**19.02.2014**

73 Titular/es:

**ETABLISSEMENTS J. SOUFFLET (100.0%)  
QUAI DU GENERAL SARRAIL  
10400 NOGENT SUR SEINE, FR**

72 Inventor/es:

**BARET, JEAN-LUC y  
LABELLE, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 443 522 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

Complemento nutricional para medio de fermentación alcohólica.

- 5 La presente solicitud describe un complemento nutricional que favorece la producción industrial de etanol por fermentación alcohólica seguida en particular de un procedimiento de sacarificación-fermentación simultáneas, a partir de materia prima glucídica fermentable en etanol, eventualmente después de la sacarificación, tal como una materia prima amilácea en particular de cereales, en particular el trigo, y de subproductos (bagazo, salvado). La solicitud describe asimismo unos bagazos procedentes de este procedimiento y un procedimiento de fabricación de levadura en aerobiosis.
- 10
- 15 Se conoce producir etanol a partir de una materia prima amilácea mediante un procedimiento enzimático que comprende una etapa de licuefacción del almidón por una alfa-amilasa que tiene como objetivo solubilizar e hidrolizar el almidón en dextrinas. Esta etapa está seguida clásicamente de una etapa de sacarificación por una glucoamilasa, también denominada amiloglucosidasa, que tiene como objetivo hidrolizar las dextrinas en glucosa. El contenido en glucosa al final de sacarificación es entonces sustancialmente del 100% del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea. Dicho de otro modo, todo el potencial en glucosa de la materia amilácea utilizada se ha transformado en glucosa.
- 20 La glucosa se fermenta entonces durante una etapa de fermentación durante la cual se transforma en etanol mediante una levadura en condiciones anaeróbicas.
- 25 Un eje de búsqueda para mejorar este tipo de procedimiento enzimático consistió en intentar fusionar las etapas de fermentación y de sacarificación. Los investigadores han intentado así realizar la fermentación y la sacarificación simultáneamente durante una etapa única denominada "sacarificación-fermentación", en inglés "simultaneous saccharification and fermentation" o SSF. El contenido en glucosa del medio al principio de esta etapa única, es decir a la salida de licuefacción, es entonces típicamente inferior al 3% del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea.
- 30 Se han efectuado también unos ensayos para limitar la duración de la etapa de sacarificación de manera que el contenido en glucosa a la salida de esta etapa sea inferior al 100% del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea. La etapa de sacarificación se califica entonces de "pre-sacarificación" o de "sacarificación parcial".
- 35 Tal como se verá más en detalle en la continuación de la descripción, los procedimientos de fabricación de etanol que comprenden una etapa de sacarificación incompleta, incluso ninguna etapa de sacarificación, a continuación denominados "procedimientos de sacarificación incompleta", implican unas obligaciones específicas. Unas soluciones técnicas adoptadas en el marco de procedimientos convencionales con sacarificación completa antes de la fermentación no puede por lo tanto *a priori* ser utilizadas con estos procedimientos.
- 40 En el marco de los procedimientos de sacarificación incompleta, se denomina "medio de sacarificación-fermentación" un medio en el que se efectúa la fermentación y por lo menos una parte de la sacarificación.
- 45 El artículo de lin y Tanaka (2006) *Appl. Microbiol. biotechnol.* 69:627-642 describe la utilización de la sacarificación-fermentación simultánea en procedimientos de fermentación alcohólica. Sin embargo, la sacarificación-fermentación simultáneas se sugiere únicamente en procedimientos de fermentación a partir de materias primas celulósicas y no amiláceas.
- 50 La solicitud europea EP 1 022 329 describe un procedimiento de fabricación de etanol a partir de materias primas amiláceas que comprende una etapa de fermentación en presencia de un producto multienzimático, siendo dicho producto multienzimático introducido durante la etapa de hidrólisis del almidón, denominada "etapa de sacarificación", que es una etapa preliminar a la fermentación alcohólica por una levadura. No sugiere la utilización de este producto multienzimático durante una sacarificación-fermentación simultáneas.
- 55 Existe una necesidad permanente de mejorar el rendimiento en etanol de los procedimientos de producción de etanol, en particular de sacarificación incompleta.
- La presente invención tiene por objetivo responder a esta necesidad.
- 60 Según la invención, se alcanza este objetivo mediante un complemento nutricional para medio de sacarificación-fermentación en un procedimiento de fabricación de etanol por fermentación a partir de una materia prima amilácea que comprende, y preferentemente que está constituida por, un principio activo procedente de una fermentación con un enmohecimiento. Puede estar en forma líquida o sólida.
- 65 La presente invención se refiere así a la utilización de un complemento nutricional en la fabricación de etanol a partir de una materia prima amilácea por sacarificación-fermentación, siendo el complemento nutricional un complemento

para medio de fermentación alcohólica a partir de materias primas glucídicas, que comprende un principio activo, en forma bruta o extraída, procedente de la fermentación de salvado de trigo con un moho seleccionado de entre las cepas de *Aspergillus niger* ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 o entre las cepas de *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 y ATCC 42149.

Tal como se verá más en detalle en la continuación de la descripción, la presencia de un complemento nutricional de este tipo en un medio de sacarificación-fermentación fue particularmente para el crecimiento y la eficacia de la levadura. Resultó una mejora significativa del rendimiento del procedimiento de fabricación del etanol a partir de una materia prima amilácea.

Preferentemente, el procedimiento descrito en la solicitud comprende una, y más preferentemente varias, de las características opcionales siguientes:

- El complemento nutricional es una mezcla, sólida o líquida, de dicho principio activo y de por lo menos una enzima útil. La noción de enzima útil incluye en particular una o más enzimas que tienen una actividad amilásica, en particular glucoamilásica, proteolítica o xilanásica, y sus combinaciones.
- El principio activo presente en el complemento nutricional descrito en la presente memoria está en forma bruta, es decir que comprende el sustrato utilizado durante la fermentación con dicho moho, o extraído, es decir que está aislado de dicho sustrato. Está eventualmente en mezcla con unas enzimas adicionales. Preferentemente, el sustrato es salvado de trigo.
- El principio activo se selecciona de entre el grupo formado por el ergosterol, la N-acetilglucosamina, las vitaminas, en particular la vitamina B, los ácidos nucleicos, los aminoácidos y, preferentemente, sus mezclas. Entre los aminoácidos, se refiere en particular a uno o varios, preferentemente al conjunto de los aminoácidos siguientes: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, valina, leucina, ácido glutámico. Entre las vitaminas, se nota la presencia de diferentes vitaminas B, por ejemplo B1, B2, B3, B6 e inositol, vitamina E, entre otras.
- El complemento nutricional presenta, durante su introducción en el medio de sacarificación-fermentación, en particular debido a la elección apropiada de dicho moho, las actividades enzimáticas siguientes:
  - glucoamilásica: por lo menos 500 UG, preferentemente 750 UG, más preferentemente 1500 UG por gramo de materia seca, y/o preferentemente,
  - proteolítica: por lo menos 100 UP, preferentemente por lo menos 400 UP, por gramo de materia seca, y/o preferentemente,
  - xilanásica: por lo menos 100 UX, preferentemente por lo menos 400 UX, por gramo de materia seca.
- El complemento nutricional resulta de una fermentación, preferentemente en medio sólido, de un sustrato, preferentemente salvado de trigo, con un moho seleccionado de entre las cepas de *Aspergillus niger*, seleccionado preferentemente de entre las cepas ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 o de entre las cepas de *Aspergillus oryzae*, seleccionado preferentemente de entre las cepas ATCC 22788 y ATCC 42149.
- El complemento nutricional se obtiene mediante un procedimiento según la invención que comprende las etapas siguientes:
  - i) coger salvado de trigo,
  - ii) humidificar, acidificar a un pH comprendido entre 4 y 5, preferentemente con el ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) y tratar térmicamente dicho salvado de manera que se pasteuriza o esteriliza, siendo el tratamiento térmico preferentemente posterior a la humidificación,
  - iii) inocular el salvado de trigo resultante por una cepa de *Aspergillus niger*, seleccionada de entre ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112, o por una cepa de *Aspergillus oryzae* seleccionada de entre ATCC 22788 y ATCC 42149,
  - iv) hacer fermentar el salvado de trigo en el estado sólido en un reactor agitado periódicamente, a una temperatura de 28°C a 38°C, siendo la cantidad en humedad mantenida entre 45% y 65%, preferentemente entre 50% y 60% en peso, en condiciones de aeración propias para evitar una acumulación de dióxido de carbono permanente dentro del salvado de trigo, hasta que el producto de fermentación presente los valores mínimos siguientes de actividades enzimáticas:
    - glucoamilásica: por lo menos 500 UG, preferentemente 750 UG, más preferentemente 1500 UG por

gramo de materia seca, y preferentemente,

- proteolítica: por lo menos 100 UP, preferentemente por lo menos 400 UP, por gramo de materia seca,
- xilanásica: por lo menos 100 UX, preferentemente 300 UX, por gramo de materia seca.
- El complemento nutricional es un complejo enzimático obtenido según un procedimiento descrito en el documento US 2002 037342.

La solicitud describe asimismo un procedimiento de fabricación de etanol a partir de una materia glucídica, en particular amilácea, que comprende, después de una etapa de licuefacción, una etapa de sacarificación y después una etapa de fermentación, o después una etapa de licuefacción y eventualmente una etapa de pre-sacarificación, una etapa de sacarificación-fermentación en un medio de sacarificación-fermentación cuyo contenido en glucosa al inicio de la etapa de sacarificación-fermentación es como máximo igual al 95% del equivalente en glucosa que corresponde a la materia glucídica, en particular al almidón de dicha materia amilácea. El procedimiento descrito en la presente memoria es remarcable porque se introduce, en el medio de fermentación o de sacarificación-fermentación, un complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente. Esta introducción se puede efectuar directamente en el medio de fermentación o de sacarificación-fermentación, o durante una etapa aguas arriba.

La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de fabricación de etanol a partir de una materia glucídica que es una materia amilácea, que comprende una etapa de fermentación en presencia de un complemento nutricional, y que comprende, después de una etapa de licuefacción y eventualmente una etapa de pre-sacarificación, una etapa de sacarificación-fermentación en un medio de sacarificación-fermentación cuyo contenido en glucosa a principio de la etapa de sacarificación fermentación es como máximo igual al 95% del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea, en el que dicho complemento nutricional es un complemento nutricional, para un medio de fermentación alcohólica a partir de materias primas glucídicas, que comprende un principio activo, en forma bruta o extraída, procedente de la fermentación de salvado de trigo con un moho seleccionado de entre las cepas de *Aspergillus niger* ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 o de entre las cepas de *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 y ATCC 42149, caracterizado porque se introduce el complemento nutricional en el medio de sacarificación-fermentación.

De manera sorprendente, la presencia en el medio de fermentación o de sacarificación-fermentación, de un complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente, y en particular de salvado de trigo fermentado con un moho, fue particularmente favorable para aumentar la eficacia de la levadura. Ésta transforma entonces una cantidad más importante de glucosa en etanol con una cinética más favorable.

Preferentemente, el procedimiento según la invención comprende una, y más preferentemente varias, de las características opcionales siguientes:

- El contenido en glucosa al inicio de la etapa de sacarificación-fermentación es como máximo igual al 3%, preferentemente al 2%, más preferentemente como máximo igual al 1%, del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea. Dicho de otra manera, el procedimiento no comprende ni etapa de sacarificación ni etapa de pre-sacarificación.
- Como el complemento nutricional se introduce en forma bruta, la cantidad de dicho complemento nutricional es superior o igual a 4 kg de materia seca, preferentemente a 14 kg de materia seca y/o inferior o igual a 60 kg de materia seca, preferentemente a 34 kg de materia seca, más preferentemente inferior a 19 kg de materia seca por tonelada de almidón, preferentemente aproximadamente 17 kg de materia seca por tonelada de almidón.
- El complemento nutricional se prepara mediante fermentación de un sustrato idéntico a la materia glucídica a la cual se aplica el procedimiento de fabricación de etanol.
- La etapa de sacarificación-fermentación se realiza totalmente en ausencia de aportación de aire o de oxígeno (ninguna fase aerobia propiamente dicha).
- La etapa de sacarificación-fermentación comprende una fase inicial aeróbica.
- Se utiliza una levadura como agente de fermentación etanólica, en particular una levadura del género *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae*. Más preferentemente, la levadura es funcional a concentraciones en etanol superiores a 95 g/l.
- Durante el procedimiento, dicho complemento nutricional constituye la principal fuente nutricional para la levadura y/o la principal fuente de ergosterol y/o la principal fuente de nitrógeno y/o de aminoácidos y/o de fósforo y/o de azufre y/o de vitaminas. Preferentemente, constituye la única fuente de ergosterol y/o de

nitrógeno y/o de aminoácidos y/o de fósforo y/o de azufre y/o de vitaminas.

El procedimiento según la invención permite también fabricar bagazos de una calidad nutricional remarcable. La invención se refiere por lo tanto a bagazos procedentes de un procedimiento de fabricación de etanol según la invención y que comprende más de 5 g, preferentemente más de 20 g y/o menos de 100 g, preferentemente menos de 35 g, más preferentemente aproximadamente 30 g de ergosterol por tonelada de materias secas de bagazos.

Preferentemente, dichos bagazos comprenden también más del 40%, preferentemente más del 50% de proteínas brutas, en porcentaje sobre la base de la materia seca. Como se verá en la continuación de la descripción, dichos contenidos en proteínas son hechos posibles por el consumo de una parte de las hemicelulosas y de las fibras durante la prefermentación o la sacarificación-fermentación.

La solicitud describe por último, de manera general, la utilización de un complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente, para favorecer una fermentación alcohólica destinada a la fabricación de etanol o una prefermentación destinada a la fabricación de una levadura.

Otras características y ventajas de la presente invención aparecerán también a la luz de la descripción siguiente y con el examen del dibujo adjunto en el que la figura 1 representa un esquema de una parte de un procedimiento de fabricación de etanol según la invención.

Unos procedimientos de fabricación de etanol por fermentación de materias glucídicas, en particular amiláceas son bien conocidos por el experto en la materia, y podrán ser adaptados para estar de acuerdo con la invención. El experto en la materia es por lo tanto apto para precisar, llegado el caso, algunos puntos de la descripción siguiente.

El procedimiento descrito a continuación se refiere a la fabricación de etanol a partir de trigo, pero se puede aplicar a cualquier tipo de materia amilácea, en particular a cualquier extracto de cereales. Los modos de realización descritos a continuación no por lo tanto solamente unos ejemplos y se podrían modificar, en particular por sustitución de equivalentes técnicos, sin apartarse por ello del marco de la invención.

Un procedimiento de fabricación de etanol de trigo según la invención puede, a título de ejemplo, comprender las etapas siguientes:

- a) una etapa de acondicionamiento de un trigo de manera que se prepara una trituración de almidón de trigo,
- b) una etapa de licuefacción del almidón, en particular en presencia de una alfa-amilasa, de manera que se hidroliza el almidón en dextrinas,
- c) opcionalmente, una etapa de pre-sacarificación, en particular por un conjunto de enzimas, de manera que se hidrolizan las dextrinas en azúcares fermentables (glucosa, maltosa, maltotriosa) y los constituyentes no amiláceos, y
- d) una etapa de sacarificación-fermentación, en un medio de sacarificación-fermentación que contiene las dextrinas y/o dichos azúcares fermentables y una levadura, de manera que se produce etanol.

Estas diferentes etapas están representadas en la figura 1.

La etapa a) consiste en preparar una trituración de almidón de trigo, por ejemplo una harina, por acondicionamiento de dicho trigo.

La harina de trigo se mezcla entonces en una mezcladora con agua, opcionalmente vinaza, ácido y una enzima de licuefacción, de manera que se forma un "mosto empastado".

El mosto empastado contiene típicamente del 25 al 35% en masa de materias secas, preferentemente del 30 al 35%. El porcentaje de materias secas se determina para limitar los consumos energéticos conservando al mismo tiempo una fluidez satisfactoria. Por preocupaciones económicas, el porcentaje de materia seca es lo más elevado posible con el fin de limitar los costes de la evaporación de las vinazas en la continuación del procedimiento. La cantidad de harina aportada a la mezcladora se ajusta o bien por un dosificador, o bien por una cinta pesadora.

Según la enzima de licuefacción utilizada, el pH se debe ajustar con una solución de ácido, por ejemplo ácido sulfúrico. Según las enzimas utilizadas, clásicamente alfa-amilasas bacterianas, en particular termoestables, se puede utilizar eventualmente una sal de calcio. El caudal de ácido se ajusta mediante una sonda de pH instalada en la mezcla agua/vinazas antes del empastador. El pH puede variar clásicamente entre 5 y 6,5, según las enzimas utilizadas.

La licuefacción (etapa b)) se realiza entonces a una temperatura comprendida entre 80°C y 95°C. El mosto empastado puede ser llevado a esta temperatura por medio de una inyección directa de vapor en el recipiente de

licuefacción por tuberías o por un "jet-cooker". En el segundo caso, el mosto empastado se lleva durante algunos segundos a una temperatura comprendida entre 100°C y 150°C mediante una inyección de vapor en una tubería antes de ser enfriado rápidamente entre 80°C y 95°C. Los recipientes de licuefacción pueden ser agitados.

5 Las características preferidas de la etapa de licuefacción son las siguientes:

- Temperatura: 80°C a 90°C
- pH: 5,5-6,5
- Materia seca: 30% a 35%
- 10 ○ Tiempo de estancia: 30 minutos a 2 horas.

La etapa b) conduce a la hidrólisis del almidón en dextrinas.

15 En caso de pre-sacarificación (etapa c)), el mosto licuado se enfría en intercambiadores térmicos de tipo intercambiadores a placas o intercambiadores tubulares a una temperatura comprendida entre 50°C y 60°C.

En algunos casos, se puede efectuar una dilución del mosto licuado con un diluyente tal como agua o vinazas de reciclaje o las flemas que provienen de la destilería.

20 En la etapa c), etapa opcional, el mosto licuado se pone preferentemente en presencia de un complejo enzimático que presenta las actividades enzimáticas deseadas.

25 Los caudales de las enzimas dependen preferentemente del caudal de mosto entrante, a la concentración en glucosa producida y al contenido en almidón restante. El objetivo de esta dependencia es preparar una solución desprovista de almidón al final de fermentación.

Las características preferidas de la etapa c) de pre-sacarificación son las siguientes:

- Temperatura: 50°C a 60°C
- 30 ○ pH: 4 a 5
- Tiempo de estancia: hasta obtener el contenido en glucosa buscado, generalmente inferior a 24h.

35 Los recipientes de pre-sacarificación están sometidos a una agitación mecánica que permite una buena homogeneización del mosto durante la sacarificación y por lo tanto una puesta en contacto facilitada entre las enzimas y las dextrinas a hidrolizar.

40 La utilización del complejo enzimático procedente de la fermentación de salvado de trigo por un moho permite reducir ventajosamente la viscosidad del mosto sacarificado y aumentar la concentración en nitrógeno en dicho mosto.

45 Según la invención, la sacarificación no continúa hasta la hidrólisis total de las dextrinas en glucosa, sino que se interrumpe mientras que la hidrólisis es sólo parcial. Según la invención, el porcentaje de glucosa al final de la etapa de pre-sacarificación es inferior al 95%. Preferentemente inferior al 50%, más preferentemente inferior al 5%. La hidrólisis continúa por lo tanto durante la etapa de sacarificación-fermentación.

50 Si el procedimiento según la invención no comprende ninguna etapa de sacarificación parcial, o "pre-sacarificación", el contenido en glucosa al inicio de la etapa d) de sacarificación-fermentación es como máximo igual al 3%, preferentemente al 2%, más preferentemente como máximo igual al 1%, del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea.

En la etapa d), el mosto se pone en presencia de una levadura en el medio de sacarificación-fermentación.

55 Se pone asimismo en presencia de un complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente. El orden de incorporación de la levadura y del complemento no tiene importancia.

El conjunto se agita durante toda la etapa d).

60 Se pueden utilizar todas las levaduras utilizadas para la producción de etanol, en particular levaduras del género *Saccharomyces*. Habitualmente, la levadura se introduce en el medio de sacarificación-fermentación en condiciones aeróbicas. Durante esta fase, la levadura cumple un cierto número de divisiones celulares. La levadura no transforma entonces la glucosa en etanol, pero al contrario consume glucosa para su crecimiento. Para mejorar este crecimiento celular, se conoce aportar al medio de sacarificación-fermentación unos complementos nutricionales. Por otra parte, con el fin de limitar el crecimiento celular, cuyo consumo de glucosa aferente disminuye el rendimiento de producción de etanol, es preferible inocular el medio de sacarificación-fermentación con una cantidad de levadura tal que la producción de etanol por las levaduras permita rápidamente alcanzar 65 concentraciones de etanol en el medio de cultivo que se opongan al crecimiento celular de la levadura.

Según una primera modalidad, la etapa d) empieza en aerobiosis el tiempo necesario para una multiplicación suficiente de la levadura.

- 5 El medio de sacarificación-fermentación se dispone después bajo condiciones anaeróbicas. La levadura transforma entonces la glucosa en etanol.

Según una segunda modalidad, la etapa d) se conduce totalmente en anaerobiosis. La presencia del complemento nutricional según la invención permite librarse de la fase inicial aeróbica.

- 10 Las características preferidas de la etapa d) de sacarificación-fermentación son las siguientes:

- o Temperatura: de 30°C a 35°C
- 15 o pH: ajustado al inicio de la etapa d) con ácido (por ejemplo ácido sulfúrico) entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 5, preferentemente entre aproximadamente 3,8 y aproximadamente 5, más preferentemente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5, mejor aún entre aproximadamente 4 y aproximadamente 4,5.
- 20 o Después del ajuste del pH al inicio de la etapa d), gracias al efecto tampón del complemento nutricional, no se prevé ninguna regulación del pH durante la continuación de la etapa d).
- o Inóculo de levadura: aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $5 \cdot 10^8$  UFC de levadura (unidades que forman colonias) por ml de medio de sacarificación-fermentación, preferentemente aproximadamente  $10^7$  UFC de levadura por ml de medio de sacarificación-fermentación.
- 25 o 20% a 35%, en particular 20% a 30% de MS
- o Tiempo de estancia: 20 horas a 72 horas, en particular 20 horas a 60 horas. El tiempo de estancia aumenta con la MS.
- 30

El medio de sacarificación-fermentación según la invención contiene un complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente. Este complemento puede ser introducido en el medio de sacarificación-fermentación o durante una etapa aguas arriba. De manera sorprendente, la adición en el medio de sacarificación-fermentación de dicho complemento nutricional, en particular de salvado de trigo fermentado con un moho, fue particularmente favorable para aumentar la eficacia de la levadura. Ésta transforma entonces una cantidad más importante de glucosa en etanol con una cinética más favorable. Además, el complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente permite reducir la duración de la fase aeróbica en principio de etapa de sacarificación-fermentación, incluso suprimirla. Ventajosamente, el rendimiento se encuentra mejorado. Más ventajosamente, el complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente permite disminuir la mortalidad celular con respecto a un cultivo idéntico llevado en ausencia de dicho complemento nutricional. Por último, su presencia tiene un efecto tampón que evita la necesidad de regular el pH.

Según la invención, preferentemente, el medio de sacarificación-fermentación contiene inicialmente, para 1000 kg de almidón introducidos inicialmente, entre 2,5 kg y 35 kg de complemento nutricional, en particular salvado de trigo fermentado, en particular entre 8 y 10 kg de complemento nutricional, en particular salvado de trigo fermentado por 1000 kg de almidón.

La presencia en el medio de sacarificación-fermentación del salvado de trigo fermentado permite por lo tanto reducir considerablemente el tiempo de sacarificación-fermentación.

Parece que este complemento nutricional aporta unos nutrimentos perfectamente adaptados a la levadura, en proporciones y formas óptimas, en particular para los cultivos anaeróbicos.

55 Sin estar vinculado por una teoría, los inventores explican estos resultados de la siguiente manera. Han descubierto la presencia, en el complemento nutricional utilizado según la invención, de aminoácidos necesarios para la levadura. Estos aminoácidos contribuirían así a la nutrición nitrogenada de la levadura de manera muy eficaz, en particular mucho más eficaz que las simples sales de amonio utilizadas hasta ahora, reduciendo además la síntesis de subproductos fermentados tales como el glicerol y mejorando así el rendimiento en etanol.

60 La presencia de vitaminas en el complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente permitiría asimismo explicar una mejor eficacia de la levadura.

65 Por último, los inventores han descubierto que el complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente contiene ergosterol y N-acetilglucosamina, que son unos constituyentes importantes de la levadura. Su presencia en el medio de sacarificación-fermentación ayuda al crecimiento y al buen funcionamiento de la levadura en

anaerobiosis completa. En estas condiciones, su síntesis es en efecto imposible por la levadura. La presencia de ergosterol permite por lo tanto reducir ventajosamente, incluso suprimir, la fase aeróbica en principio de sacarificación-fermentación.

5 Los ensayos de la tabla 1 siguiente han demostrado sin embargo que la adición de los nutrimentos identificados no conduce a una mejor sacarificación-fermentación con tan buen rendimiento como la adición de un complemento nutricional según la invención. Por lo tanto, es efectivamente la combinación del conjunto de los constituyentes de este complemento nutricional, en las proporciones que resultan de la fermentación con un moho, y preferentemente su presentación en forma de un salvado de trigo, lo que está en el origen de los rendimientos excepcionales  
10 obtenidos.

El complemento nutricional puede no presentar actividades enzimáticas particulares o actividades enzimáticas óptimas. Son entonces necesarias unas adiciones enzimáticas.

15 Sin embargo, preferentemente, el complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente, presenta también unas actividades enzimáticas útiles en el marco del procedimiento de fabricación del etanol. En particular, es preferible que el complemento nutricional presente una actividad glucoamilásica superior a 500 UG por gramo de materia seca. Más preferentemente, el complemento nutricional presenta una actividad proteolítica superior a 100 UP por gramo de materia seca y/o una actividad xilanásica de por lo menos 100 UX por gramo de materia seca.  
20

Así, a pesar de que se puede considerar la utilización de otras enzimas tales como enzimas purificadas o complejos de enzimas purificadas, es preferible, según la invención, utilizar un complemento nutricional fermentado en condiciones que le permita presentar dichas actividades enzimáticas. Preferentemente, este complemento nutricional se introduce entonces en la etapa d), y/o, llegado el caso, en la etapa c), como complejo enzimático.  
25

Preferentemente, el complemento nutricional es un salvado de trigo fermentado preparado o susceptible de ser obtenido según el procedimiento según la invención siguiente:

30 i) coger salvado de trigo,

ii) humidificar y tratar térmicamente dicho salvado de manera que se pasteuriza o esteriliza, siendo el tratamiento preferentemente posterior a la humidificación,

35 iii) inocular el salvado de trigo resultante por una cepa de *Aspergillus niger*, seleccionada de entre ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112, preferentemente de entre ATCC 76061 y NRRL 3112, más preferentemente la cepa ATCC 76061 o de entre las cepas de *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 y ATCC 42149.

40 iv) hacer fermentar el salvado de trigo en el estado sólido, preferentemente en forma de una cepa de más de 10 cm de grosor, en un reactor agitado periódicamente, a una temperatura de 28°C a 38°C, siendo el contenido en humedad mantenido entre 45% y 65%, preferentemente entre 50% y 60% en peso, en condiciones de aeración propias para evitar una acumulación permanente de dióxido de carbono dentro del salvado de trigo, hasta que el producto de fermentación presente los valores de actividades enzimáticas mínimas siguientes:

45 - glucoamilásica: por lo menos 500 UG, preferentemente 750 UG, más preferentemente 1500 UG por gramo de materia seca y, preferentemente

50 - proteolítica: por lo menos 100 UP, preferentemente 400 UP por gramo de materia seca, y más preferentemente,

- xilanásica: por lo menos 100 UX, preferentemente 400 UX por gramo de materia seca.

55 En la etapa i), el salvado de trigo se selecciona preferentemente de manera que tenga una proporción de por lo menos 40% en masa de partículas inferiores a 1 mm.

En la etapa ii), el salvado de trigo debe ser humidificado y tratado térmicamente con vistas a pasteurizarlo o esterilizarlo. Es ventajoso que el tratamiento térmico no preceda a la humidificación, ya que se han observado unos resultados de fermentación mediocres en el caso en el que se trata el salvado térmicamente antes de humidificarlo.  
60

El tratamiento térmico puede consistir en un calentamiento, por ejemplo en una autoclave. Un tratamiento en autoclave de 20 minutos entre 120 y 121°C ha resultado muy satisfactorio. También resultan convenientes unas condiciones menos severas de pasteurización a 105°C, durante 15 minutos en una estufa. Es posible también realizar el tratamiento térmico del salvado inyectando vapor de agua, lo cual permite realizar simultáneamente la humidificación del salvado.  
65

Preferentemente, se ajusta el pH, preferentemente con ácido nítrico, durante la humidificación en un intervalo de 4 a 5,5, con el fin de mejorar el efecto de pasteurización deseado. La utilización de ácido nítrico es particularmente ventajosa, siendo el ácido nítrico utilizado también como fuente de nitrógeno para el moho.

5 Además de su función de esterilización, el tratamiento térmico tiene por efecto favorecer la gelatinización del almidón contenido en el salvado de trigo y, por lo tanto, la disponibilidad de este sustrato para los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, lo cual permite unas fermentaciones más eficaces.

10 La humidificación del salvado es importante ya que el contenido en agua influye sobre el rendimiento de la fermentación. Ésta se determina de manera que el contenido en agua del salvado esté, al inicio de la etapa iv) de fermentación, en el intervalo de 50-60%, preferentemente 50-55%, de la masa total del salvado y del agua.

15 En la etapa iii), la inoculación del salvado de trigo se puede realizar con cualquier inóculo apropiado. El experto en la materia conoce múltiples maneras de preparar un inóculo conveniente a partir de una cepa seleccionada. La dosis de inoculación es ventajosamente de por lo menos  $10^7$  esporas/gramo de materia seca inicial.

20 En la etapa iv), la fermentación se puede realizar en cualquier reactor apropiado. Unos ejemplos de reactores que se pueden utilizar son los descritos en el artículo de A. DURAND *et al.* publicado en *Agro-Food-Industry Hi-Tech* (mayo-junio de 1997, páginas 39-42).

25 La fermentación se debe realizar hasta que la actividad glucoamilásica sea de por lo menos 500 UG, preferentemente de por lo menos 750 UG, más preferentemente de por lo menos 1500 UG por gramo de materia seca de salvado, es decir normalmente durante un periodo de 1 a 3 días, preferentemente de 30 a 60 horas. En menos de 1 día, la fermentación es demasiado incompleta. Al cabo de 3 días, la fermentación está acabada o casi acabada de manera que no sería económico prolongarla más.

30 La temperatura del medio se mantiene entre 28°C y 38°C, preferentemente entre 32°C y 36°C, lo cual corresponde al campo de actividad óptimo conocido de las cepas utilizadas. Ventajosamente, con este fin, la temperatura del aire se ajusta entre 34°C y 38°C durante las primeras horas de la fermentación, para favorecer la germinación de las esporas, y después se reduce entre 28°C y 32°C para el resto de la fermentación, para contribuir a la regulación de la temperatura del medio.

35 El contenido en humedad del salvado de trigo está comprendido normalmente entre 50% y 60%. El porcentaje de humedad se puede desviar sin embargo en +/- 5 unidades en % del intervalo de 50-60% durante un periodo relativamente breve entre dos ajustes sucesivos del porcentaje de humedad o al final de fermentación. Conviene, en cualquier caso, no bajar por debajo de un porcentaje de humedad del 45%. El porcentaje de humedad del medio de cultivo tiende a bajar durante el cultivo por evaporación bajo el efecto del aumento de temperatura generada por el crecimiento fúngico, siendo dicho medio un mal conductor del calor. Por lo tanto, se debe mantener el contenido en humedad durante la fermentación, por ejemplo procediendo periódicamente a aportaciones de agua para compensar la pérdida en agua del medio. La cantidad de agua utilizada desempeña también un papel no despreciable. Se puede utilizar agua corriente de buena calidad o agua destilada.

40 El pH del medio de fermentación no está habitualmente regulado. Como se ha explicado anteriormente, se ajusta preferentemente inicialmente entre 4 y 5.

45 Si su valor de partida es próximo a 6,0-6,4, el pH baja a 3,8-4,2, durante el cultivo, y después vuelve a subir al final. Este retorno está generalmente correlacionado con la fase de esporulación del hongo. El seguimiento de la evolución del pH constituye un buen indicador del estado del cultivo.

50 El fermentador deber ser aireado, preferentemente en continuo, con el fin de aportar el oxígeno necesario a la fermentación y evitar la acumulación excesiva de dióxido de carbono producido por la fermentación. Además, la aireación participa en el control de la temperatura y de la humedad del medio de cultivo. El aire está, preferentemente, sustancialmente saturado en agua para limitar la tendencia a la desecación del medio. Es difícil dar indicaciones cuantitativas sobre el caudal de aireación, ya que intervienen múltiples variables, en particular el tamaño y la geometría del reactor, la cantidad del salvado cargado, etc. Unos simples ensayos de rutina permitirán, no obstante, al experto en la técnica, determinar fácilmente un caudal de aireación conveniente en cada caso práctico, generalmente un caudal de aire de 1 a 2 m<sup>3</sup>/h por kg de materia seca es apropiado, la presión excesiva está preferentemente entre 0,5 y 1 bar.

60 La carga de salvado en el fermentador debe ser periódicamente agitada durante la fermentación con la ayuda de medios de agitación tales como brazos agitadores, láminas o espátulas, o tornillos sinfín con vistas a evitar la formación de masas impermeables y con el fin de que la aireación alcance de la manera la más homogénea posible toda la masa del salvado. De manera sorprendente, las cepas utilizadas resisten a la agitación. Sin embargo, es necesario evitar una agitación demasiado vigorosa.

65 El salvado de trigo fermentado utilizado en el procedimiento según la invención se puede secar o congelar con vistas

a su conservación si se desea, o enfriar y utilizar sin transformación suplementaria.

El secado se realiza preferentemente a una temperatura moderada para no afectar a la actividad enzimática. Resultó apropiado un calentamiento en estufa a 40°C. A nivel industrial, se ventila preferentemente el aire seco entre 35 y 45°C, según el moho utilizado. La congelación, por su lado, se puede realizar sobre el producto húmedo a baja temperatura, por ejemplo a -20°C.

El documento 2002 037342 da a conocer un complejo enzimático con actividades glucoamilásica, proteolítica y xilanásica obtenido por fermentación de salvado de trigo con cepas de *Aspergillus*. Este complejo se puede utilizar como complemento nutricional según la invención.

De manera general, no se puede prever el efecto, en el marco de un procedimiento que comprende una etapa de sacarificación por lo menos en parte simultánea con la fermentación, de una enzima o de una composición multienzimática cuya utilización se conoce en el marco de un procedimiento de etapas de sacarificación y de fermentación separadas. Esto se verifica en particular cuando la adición de una composición implica, como la composición del documento US 2002 037342, la incorporación de sustancias tales como hemicelulosas susceptibles de aumentar la viscosidad durante la fermentación.

Este documento describe la utilización de esta composición con el fin de mejorar las condiciones de la etapa de sacarificación. No sugiere de ninguna manera que podría presentar un interés con un procedimiento que no comprende ninguna etapa de sacarificación, o sólo una etapa de pre-sacarificación.

En efecto, las condiciones óptimas para la sacarificación y para la fermentación son muy diferentes. En particular, la sacarificación se efectúa habitualmente a aproximadamente 60°C, es decir a una temperatura que no conviene a las levaduras utilizadas habitualmente durante la fermentación. Recíprocamente, como se ilustra en la tabla 7 del documento US 2002 037342, las enzimas de la composición del documento US 2002 037342 presentan una actividad enzimática óptima a las temperaturas de sacarificación, pero, contra toda previsión, presentaban una actividad enzimática degradada en caso de sacarificación-fermentación simultáneas.

Además, las enzimas de la composición del documento US 2002 037342 son conocidas por disminuir la viscosidad del medio de sacarificación a la temperatura de sacarificación (véase la tabla 8), pero el experto en la materia podría contar con que esta disminución de viscosidad no se produzca a la temperatura de fermentación, en cualquier caso en una medida que hace aceptable la viscosidad del medio de sacarificación-fermentación.

Por lo tanto, el experto en la materia no habría intentado utilizar la composición del documento US 2002 037342 en un procedimiento de fabricación de etanol que no comprende ninguna etapa de sacarificación, o sólo una etapa de pre-sacarificación. Tanto menos cuando la supresión de la sacarificación, o una limitación de su duración puede conducir a veces a un medio de sacarificación-fermentación contaminado de manera redhibitoria, salvo si se deben añadir grandes cantidades de agentes bacterioestáticos. En efecto, la temperatura de sacarificación permite una protección contra las contaminaciones bacterianas.

La solicitud describe por lo tanto también la utilización de un salvado de trigo obtenido según el procedimiento descrito anteriormente o de acuerdo con el salvado de trigo descrito en el documento US 2002 037342 para favorecer la fermentación alcohólica en un medio de sacarificación-fermentación. Preferentemente, más de 4 kg de este salvado están presentes en el medio de sacarificación-fermentación, al inicio de la etapa d) para 1000 kg de almidón.

Ventajosamente, en el modo de realización preferido de la invención, el complemento nutricional es un complejo multienzimático obtenido por fermentación de un salvado de trigo con un moho, y:

- constituye un medio de valorización de los salvados procedentes de la etapa a) de preparación de harina de trigo,
- aporta simultáneamente varias enzimas útiles, simplificando así el procedimiento, y
- es un excelente complemento nutricional para la levadura.

En este último caso, la cantidad en masa de complejo multienzimático debe no obstante ser mucho más elevada que según la técnica anterior.

La búsqueda actual tiende a fabricar unos complejos multienzimáticos cada vez más concentrados, con el fin de limitar las cantidades en masas introducidas. Así, los procedimientos se simplifican.

A contracorriente de esta tendencia, los inventores han descubierto que, por el contrario, la incorporación de más de 4 kg de materia seca, y preferentemente más de 14 kg de materia seca, más preferentemente de aproximadamente 19 kg de materia seca de salvado de trigo fermentado por tonelada de almidón, permite mejorar la eficacia global del

procedimiento de fabricación del etanol.

Al final de la etapa d), el mosto fermentado o "vino" que procede de la sacarificación-fermentación, tras el paso por un intercambiador térmico, alimenta unas columnas a destilar.

5 Las vinazas que salen al pie de columna son enviadas al taller de separación de los residuos para ser clarificadas mediante métodos clásicos, de tipo centrifugación, con el fin de separar unas materias solubles de las materias insolubles.

10 Los residuos húmedos obtenidos tras esta etapa de separación están compuestos por aproximadamente el 35% de materia seca, las vinazas clarificadas están compuestas por aproximadamente el 7% al 10% de materia seca.

15 Las vinazas clarificadas se concentran por evaporación al vacío para obtener un jarabe o "vinazas concentradas" con un porcentaje de materia seca próximo al 35%.

El jarabe obtenido puede entonces ser mezclado con los residuos húmedos. La mezcla se seca después y se obtienen aproximadamente 350 kg de residuos así secados por tonelada de trigo, siendo el porcentaje de materia seca de estos residuos de aproximadamente el 90%.

20 Los residuos obtenidos después del secado presentan unas características nutricionales remarcables, en particular para el ganado, y son también un objeto de la invención. Los 350 kg de residuos obtenidos según la invención comprenden en efecto entre 2 g y 35 g de ergosterol, preferentemente aproximadamente 10 g. Ahora bien, el ergosterol es un precursor de la síntesis de la vitamina D2 y presenta por lo tanto un interés para la salud así como un interés nutricional para las levaduras, en particular en anaerobiosis.

25 Además, en el caso en el que el complemento nutricional es un salvado de trigo fermentado según el procedimiento de acuerdo con la invención descrito anteriormente, los residuos obtenidos contienen un excedente de proteínas.

30 Los vapores de alcohol de las columnas se condensan en intercambiadores térmicos. La mezcla azeotrópica recuperada en cabeza de columna se seca mediante métodos clásicos, por ejemplo utilizando tamices moleculares.

35 El procedimiento según la invención permite obtener aproximadamente de 375 litros a 390 litros de etanol para una cantidad inicial de 1000 kg de trigo. Es decir, de manera remarcable, hasta el 91% del rendimiento estequiométrico de la transformación por fermentación de la glucosa en etanol para un trigo que contiene aproximadamente el 60% de almidón.

40 Sin estar vinculado por esta teoría, los inventores explican estos resultados por la sustitución de una aportación de nitrógeno exógeno, por ejemplo en forma de sulfato de amonio, por el nitrógeno aminado libre. Esta sustitución reduce ventajosamente la síntesis de subproductos de fermentación, en particular de glicerol y por lo tanto aumenta el rendimiento.

45 La solicitud describe asimismo un procedimiento de fabricación de levadura en aerobiosis, o "propagación de levadura", que se puede utilizar en particular en prefermentación con el fin de preparar una levadura utilizada en un medio de fermentación o en un medio de sacarificación-fermentación de un procedimiento de fermentación alcohólico de la glucosa en etanol.

50 En este marco, la etapa de prefermentación tiene generalmente como objetivo aumentar la concentración en levadura en el medio de prefermentación de aproximadamente  $10^6$ - $10^7$  UFC por ml hasta por lo menos aproximadamente  $10^8$  UFC por ml de medio de prefermentación, preferentemente por lo menos aproximadamente  $5 \cdot 10^8$  UFC por medio de prefermentación.

55 La prefermentación se efectúa en pre-fermentadores en los que la temperatura está rigurosamente controlada y regulada, por ejemplo mediante un sistema de placas de enfriamiento por las que circula un líquido enfriamiento en el interior o exterior de la cubas de prefermentación. Cualquier multiplicación de microorganismos conlleva en efecto una elevación de temperatura que puede resultar inhibitoria para la propagación de las levaduras. La temperatura en los pre-fermentadores se mantiene clásicamente entre 30°C y 35°C.

60 Una aportación en oxígeno, por ejemplo en forma de aire comprimido, es indispensable para la propagación de la levadura.

Con el fin de favorecer el desarrollo de las levaduras, se conoce añadir en el medio nutritivo:

- nitrógeno, aportado en diversas formas tales como urea, amoniaco, sales de amonio,
- fósforo, aportado en diversas formas tales como ácido fosfórico, fosfatos,
- azufre, aportado en diversas formas tales como ácido sulfúrico, sulfatos,
- minerales esenciales.

5 Según la técnica anterior, se añade asimismo al medio nutritivo un mosto que sale de la etapa de licuefacción, de sacarificación o de pre-sacarificación. Este mosto aporta así azúcares fermentables pero conduce a una disminución del rendimiento global de la fermentación alcohólica. Por lo tanto, existe una necesidad de un procedimiento de fabricación de levadura en aerobiosis que pueda ser utilizado en pre-fermentación con el fin de preparar una levadura utilizada en un medio de fermentación o en un medio de sacarificación-fermentación de un procedimiento de fermentación alcohólica de la glucosa en etanol, y que limitaría esta disminución de rendimiento.

10 Como se describe en la presente memoria, este objetivo se alcanza añadiendo en los pre-fermentadores por lo menos una parte de las vinazas clarificadas, es decir obtenidas al final de la etapa de separación, y/o vinazas concentradas obtenidas durante la realización de un procedimiento de fabricación de etanol por fermentación alcohólica a partir de materias primas glucídicas, en particular amiláceas y/o según la invención.

15 Las vinazas pueden resultar de un procedimiento de fabricación de etanol que comprende una etapa de sacarificación-fermentación o en el que las etapas de sacarificación y de fermentación están completamente separadas.

20 Preferentemente, las vinazas resultan de un procedimiento de fabricación de etanol según la invención, en el que se ha introducido un complemento nutricional, tal como se ha descrito anteriormente.

La presente solicitud se refiere asimismo a un procedimiento de fabricación de levadura en aerobiosis en un pre-fermentador, caracterizado porque se ajustan en dicho pre-fermentador unas vinazas obtenidas durante la realización de un procedimiento de fabricación de etanol según la invención.

25 Así, la invención se refiere asimismo a un procedimiento de fabricación de etanol tal como se ha definido anteriormente, en el que se utiliza, para la fermentación etanólica, unas levaduras obtenidas por un procedimiento de fabricación de levadura tal como se ha definido anteriormente, procedimiento que utiliza unas vinazas que proceden de dicho procedimiento de fabricación de etanol.

30 La utilización de las vinazas que resultan de un procedimiento de fabricación de etanol según la invención, en el que se ha introducido un complemento nutricional según la invención, para la producción de levadura dentro de los pre-fermentadores, es particularmente ventajosa ya que esto permite separar la producción de etanol por las levaduras por un lado y el crecimiento celular de las levaduras por otro. En efecto, las vinazas que resultan de un procedimiento de fabricación de etanol según la invención constituyen un medio nutricional que permite hacer crecer las levaduras hasta un nivel combatible con una inoculación elevada del medio de fermentación o de sacarificación-fermentación, lo cual conlleva una utilización por las levaduras de los azúcares fermentables presentes en el medio de fermentación o de sacarificación-fermentación principalmente para la producción de etanol, y no para el crecimiento celular, como se ha señalado anteriormente. Así, los azúcares fermentables que proceden del sustrato glucídico de partida se utilizan principalmente para la producción de etanol, mientras que son principalmente unos azúcares no fermentables los que sirven para el crecimiento celular. El rendimiento global de producción etanólica a partir del sustrato glucídico de partida está por lo tanto mejorado con respecto a los procedimientos en los que los azúcares fermentables son utilizados por las levaduras al mismo tiempo para la producción de etanol y para el crecimiento celular.

35 40 45 Un modo de realización particular de tal procedimiento está descrito en la figura 2.

Preferentemente, la mezcla nutritiva de pre-fermentación contiene vinazas y no contiene productos intermedios obtenidos durante la realización de un procedimiento de fabricación de etanol por fermentación alcohólica a partir de materias primas amiláceas, en particular las vinazas no están mezcladas con un mosto procedente de las etapas intermedias de un procedimiento de fabricación de etanol por fermentación alcohólica a partir de materias primas amiláceas.

50 Según otro modo de realización preferido, el medio nutritivo de pre-fermentación se compone de, o comprende, una mezcla de vinazas y de mosto licuado, eventualmente agua.

55 Según también otro modo de realización preferido, el medio nutritivo de pre-fermentación se compone de, o comprende, una mezcla de vinazas y de complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente, en particular salvado de trigo fermentado, eventualmente agua.

60 Por último, se puede formar también un medio nutritivo compuesto por, o que comprende, el conjunto de los elementos citados anteriormente.

65 El medio nutritivo de pre-fermentación según la invención contiene preferentemente una cantidad de materia seca tal que la agitación y/o la aireación del medio es suficiente para sostener una producción óptima de etanol, por ejemplo del 15% al 20% de materia seca.

Para el procedimiento de fabricación de levadura según la invención, el complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente puede ser un salvado de trigo fermentado. Las vinazas procedentes del medio de fermentación o de sacarificación-fermentación presentan una composición, y en particular un contenido en azúcares utilizables por la levadura en aerobiosis, en particular favorable para el desarrollo de la levadura en los pre-fermentadores. El medio de prefermentación puede ser completado por elementos nutritivos exógenos como glicerol o soluciones de glicerol así como por hidrolizados obtenidos a partir de residuos húmedos. Esto permite ventajosamente ahorrar glucosa del mosto según la invención y por lo tanto limitar dicha bajada de rendimiento.

Preferentemente, por lo menos una parte de las vinazas está reciclada por incorporación en el medio nutritivo de prefermentación. Es preferible asimismo reciclar las vinazas después de la concentración con el fin de limitar la dilución del medio nutritivo del pre-fermentador.

Preferentemente, las vinazas presentes en el medio nutritivo de prefermentación son sustituidas completamente por el mosto que sale de la etapa de licuefacción, de sacarificación o de pre-sacarificación. Esta sustitución puede sin embargo ser solamente parcial.

La adición de un complemento nutricional tal como se ha descrito anteriormente, en particular de salvado de trigo fermentado, permite también mejorar la pe-fermentación, en particular por enriquecimiento del medio nutritivo en:

- nitrógeno, aportado en forma de aminoácidos,
- fósforo,
- azufre,
- vitaminas y minerales esenciales,
- proteínas.

Esta adición se puede efectuar directamente en el medio nutritivo de prefermentación, o después de la mezcla con un mosto que sale de la etapa de licuefacción, siendo esta mezcla añadida, después de una eventual dilución, en el pre-fermentador.

La utilización de levaduras pre-fermentadas a partir de vinazas procedentes de un procedimiento de fabricación de etanol según la invención permite también ventajosamente enriquecer considerablemente en proteínas los residuos secados obtenidos al final del procedimiento de fabricación de etanol según la invención. Dichos residuos pueden entonces comprender más del 40% de proteínas y preferentemente por lo menos 50% de proteínas, en base a la masa de materia seca.

Las diversas actividades enzimáticas citadas en la descripción y las reivindicaciones se han medido mediante los métodos siguientes:

#### Actividad glucoamilásica.

La acción de una preparación de glucoamilasa (GA) sobre una solución de almidón soluble provoca la liberación de azúcares reductores. Calentados a 100°C en presencia de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), estas composiciones adquieren un color marrón medido con espectrofotómetro (Kontron Instruments, Milano, Italia) a 540 nm.

El medio de reacción contiene:

- o Solución de almidón al 1,5% en el caso de *Aspergillus niger* y al 2% en el caso de *Aspergillus oryzae* 1000 µl
- o Tampón citrato 0,1 M a pH 4,5 900 µl
- o Solución enzimática: 100 µl

La reacción se desarrolla durante 20 minutos a 60°C en el caso de *Aspergillus niger*, durante 5 minutos a 50°C en el caso de *Aspergillus oryzae*. Se realizan unas extracciones de 100 µl de medio de reacción cada 4 minutos en el caso de *Aspergillus niger* y cada minuto en el caso de *Aspergillus oryzae*, se mezclan con 500 µl de DNS y 400 µl de tampón citrato a pH 4,5. El conjunto se calienta después durante 5 minutos a 100°C, se enfría rápidamente y después se dosifica a 540 nm frente a un blanco de una mezcla de 500 µl de DNS y de 500 µl de tampón citrato a pH 4,5.

Estas condiciones de dosificación se han establecido tras estudiar la influencia de la temperatura y del pH sobre la actividad de las preparaciones de GA. Se ha utilizado almidón soluble Merck (Darmstadt, Alemania) como sustrato de esta hidrólisis enzimática. El DNS se prepara según el protocolo propuesto por P. Bernfeld, Methods in enzymology, 1, 149-158 (1955) que es el siguiente:

- ♦ Disolver previamente:
  - o 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico,

- 200 ml de sosa 2 molares,
- 200 ml de agua destilada.

5

◆ Añadir a continuación:

- 300 g de tartrato doble de sodio potásico,

◆ Completar el volumen hasta 1 litro con agua destilada después de la disolución total.

10 Una vez preparado, este reactivo se debe conservar fuera de la luz. Las curvas de calibración se establecieron con glucosa como producto de referencia para la dosificación de la actividad glucoamilasa o para el seguimiento de las reacciones de licuefacción-sacarificación, y con xilosa para medir la actividad xilanasas.

15 Una unidad de actividad glucoamilasa (UG) corresponde a la cantidad de enzima necesaria para la liberación de un micromol de extremos reductores por minuto en las condiciones de dosificación con glucosa como referencia. La actividad glucoamilasa, calculada con la ayuda de la fórmula indicada a continuación, se añade a la cantidad de materia seca inicial (MSI):

$$A = \frac{P \times V_{ferm}}{V_{enz} \times M_{ferm}}$$

20

◆ A corresponde a la actividad GA expresada en  $UG \cdot gMSI^{-1}$  ( $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot gMSI^{-1}$ ),

◆ P corresponde a la velocidad de liberación de equivalentes glucosa en  $\mu mol \cdot min^{-1}$ ,

25

◆  $V_{enz}$  representa el volumen de la solución de enzimas dosificada en ml,

◆  $V_{ferm}$  es el volumen total de agua destilada utilizada para extraer la solución de enzimas en ml,

30

◆  $M_{ferm}$ , expresada en g de MSI, corresponde a la masa inicial de producto seco de la cual se ha extraído la solución de enzimas.

#### Actividad proteasa.

35 Esta dosificación se ha realizado sobre la azocaseína según el método de Béinon, descrito en el documento "Proteins Purification Methods - a Practical Approach", Harris E.L.V. y Angal, S (editores), IRL-Press, Oxford University Press, 1-66 (1989). La degradación de este sustrato por proteasas provoca la liberación de grupos azo que absorben en UV a 340 nm. La evolución de la absorbancia durante la cinética de hidrólisis de esta proteína indica la importancia de la reacción.

40 El medio de reacción contiene:

- Solución de azocaseína al 1%, pH 5,0: 1000  $\mu l$
- Solución enzimática: 200  $\mu l$

45 La azocaseína (Sigma, Saint-Louis, Estados Unidos) se disuelve en un tampón acetato  $0,1 mol \cdot l^{-1}$  a pH 5,0. Se han dosificado las actividades proteasas a este pH ya que la azocaseína es insoluble en el tampón acetato a pH inferiores. La reacción enzimática se realiza a  $60^{\circ}C$ . Se realizan unas extracciones cada 5 minutos durante 20 minutos y se mezclan con ácido tricloroacético (TCA) al 5% para detener la reacción.

50 Una unidad de actividad proteasa (UP) corresponde a la cantidad de enzimas necesaria para el aumento de 0,01 unidades  $A_{340 nm}$  por minuto, generada por la liberación de grupos azo en las condiciones citadas anteriormente. Esta actividad, calculada según la fórmula indicada a continuación, se añade a la materia seca inicial ( $UP \cdot gMSI^{-1}$ ) o a la actividad glucoamilasa ( $UP \cdot UG^{-1}$ ):

$$A = \frac{P \times V_{ferm}}{V_{enz} \times M_{ferm}}$$

55

◆ A corresponde a la actividad proteasa expresada en  $UP \cdot gMSI^{-1}$ ,

60

◆ P corresponde a la velocidad de liberación de los grupos azo expresada en incremento de 0,01 unidades  $A_{340 nm} \cdot min^{-1}$ ,

- ◆  $V_{enz}$  representa el volumen de la solución de enzimas dosificada en ml,
- ◆  $V_{ferm}$  es el volumen total de agua destilada utilizada para extraer la solución de enzimas en ml,
- ◆  $M_{ferm}$ , expresada en g de MSI, corresponde a la masa inicial de producto seco de la cual se ha extraído la solución de enzimas.

#### Actividad xilanasa

Para poner en evidencia esta actividad enzimática, se ha hecho actuar las preparaciones de GA sobre una solución de xilano soluble y se han medido los azúcares reductores liberados mediante el método con DNS.

El medio de reacción está compuesto por:

- Una solución de xilano al 2%, pH 4,5: 1900  $\mu$ l
- Una solución enzimática: 100  $\mu$ l

La solución de xilano de alerce (Sigma al 1%) se prepara en un tampón citrato 0,1 M a pH 4,5, y la reacción se desarrolla a 60°C en el caso de *Aspergillus niger* y a 50°C en el caso de *Aspergillus oryzae*. Se efectúan unas extracciones de 200  $\mu$ l de medio de reacción cada 2 minutos durante 10 minutos, y se mezclan con 500  $\mu$ l de DNS y 300  $\mu$ l de tampón citrato a pH 4,5. El conjunto se calienta después durante 5 minutos a 100°C, se enfría rápidamente y después se dosifica a 540 nm frente a un blanco de una mezcla de 500  $\mu$ l de DNS y de 500  $\mu$ l de tampón citrato a pH 4,5.

Una unidad de actividad xilanasa (UX) corresponde a la cantidad de enzimas necesaria para la liberación de un micromol de azúcares por minuto. Esta actividad se añade a la materia seca inicial ( $UX \cdot gMSI^{-1}$ ) o a la actividad glucoamilasa ( $UX \cdot UG^{-1}$ ). Para calcular esta actividad, se ha vuelto a usar la fórmula definida para el cálculo de las actividades GA en la que:

- ◆ A corresponde a la actividad xilanasa expresada en  $UX \cdot gMSI^{-1}$  ( $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot gMSI^{-1}$ ),
- ◆ P corresponde a la velocidad de liberación de equivalentes xilosa en  $\mu mol \cdot min^{-1}$ ,
- ◆ Los otros términos de la fórmula no se modifican.

Los ensayos no limitativos siguientes se proporcionan con el objetivo de ilustrar la invención, en particular la ventaja que procura la utilización de un salvado de trigo fermentado según la invención en el caso de un procedimiento de sacarificación-fermentación simultáneas.

#### **Ejemplo 1: Efecto de una complementación nitrogenada**

Se estudió de manera comparativa la cantidad de etanol producida durante una etapa de sacarificación-fermentación, introduciendo una preparación enzimática comercial (Spirizyme<sup>®</sup> Fuel), o bien la misma preparación enzimática con una complementación no limitativa en nitrógeno, o bien un complemento nutricional según la invención.

En estos ensayos, los inventores han preparado 750 g de mosto de harina de trigo al 32% de materia seca en un reactor de 1 litro agitado. Después de 2h de licuefacción a 85°C y pH 5,5, el mosto se reparte en 3 matraces Erlenmeyer de 0,5 litros que contienen cada uno 200 g de mosto y se complementa con isoactividad glucoamilasa de la siguiente manera:

- > Matraz 1: Spirizyme<sup>®</sup> Fuel (solución de glucoamilasa purificada, Novozymes);
- > Matraz 2: Spirizyme<sup>®</sup> Fuel y complementación nitrogenada, es decir fosfato y sulfato diamónico: 3 g/l de cada producto;
- > Matraz 3: salvado de trigo fermentado por una cepa de *Aspergillus niger* ATCC 76061, según el procedimiento descrito en el documento US 2002 037 342.

El pH inicial de los mostos en los tres matraces se ajustó a 4,5 y la temperatura a 32°C.

La incorporación de los productos nitrogenados en el matraz 2 genera una alcalización del pH 6,2 que necesita la aportación suplementaria de ácido clorhídrico concentrado para llevar el pH inicial del mosto a 4,5 para la sacarificación-fermentación. Los mostos son inoculados con  $10^7$  UFC de levadura por ml de mosto. La levadura utilizada en los ejemplos es *Saccharomyces cerevisiae*.

La concentración máxima en glucosa teórica en el mosto es de 303 g/l después de la hidrólisis enzimática total del almidón.

5 Como se muestra en la tabla 1, la mejor producción de etanol se obtiene con el salvado de trigo fermentado en 72 horas. La utilización de Spirizyme® Fuel, incluso con un complemento nitrogenado genera como máximo solamente el 59% de etanol en 96 horas. En ausencia de incorporación de nitrógeno, la producción de etanol es muy baja y se observa una concentración muy elevada en glucosa.

10 Por lo tanto, tiene una ventaja significativa utilizar salvado de trigo fermentado por un moho para la producción de etanol de trigo, incluso a la temperatura del reactor de sacarificación-fermentación simultáneas. La comparación con el Spirizyme Fuel indica que una complementación no limitativa con nitrógeno explica sólo parcialmente la mejora de los rendimientos.

Tabla 1

15

Duración SSF (h)	Etanol producido/etanol final con el salvado fermentado (%)			Glucosa producida/glucosa final con el salvado fermentado (%)		
	Spirizyme	Spirizyme +N	Salvado fermentado	Spirizyme	Spirizyme + N	Salvado fermentado
0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,1	16,1
1	0,0	0,0	0,0	18,0	29,2	51,3
4	0,8	0,6	1,1	71,8	56,8	119,5
8	2,7	1,2	6,9	143,6	130,1	144,9
11	4,6	4,2	17,5	197,5	170,8	119,9
15	6,2	16,1	30,9	269,3	110,2	89,8
20	8,6	32,0	51,0	359,1	66,5	55,1
24	9,9	37,0	57,1	430,9	3,4	38,6
30	13,4	45,0	73,6	538,6	2,8	50,0
36	13,4	48,2	81,3	646,4	7,6	74,2
48	16,4	53,6	94,7	861,8	10,6	71,6
72	18,4	57,3	99,3	1292,7	133,9	81,8
96	16,9	59,0	100,0	1723,6	239,0	100,0

Estos ensayos confirman la adecuación del salvado de trigo fermentado para la producción de etanol de trigo mediante un procedimiento de sacarificación-fermentación simultáneas.

20 **Ejemplo 2: Efecto tampón del complemento nutricional según la invención.**

Este ejemplo ilustra las ventajas de la utilización del complemento nutricional según la invención para favorecer una sacarificación-fermentación alcohólica. Este ejemplo se refiere en particular al efecto tampón del complemento nutricional según la invención sobre el medio de sacarificación-fermentación.

25

En estos ensayos, los inventores han preparado 750 g de mosto de harina de trigo al 32% de materia seca en un reactor de 1 litro bajo agitación. Después de 1h 30 de licuefacción a 85°C y pH 5,5 y bajo agitación a 250 rpm, el mosto se reparte en 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml. Cada matraz contiene 100 g de mosto licuado al 32% de materia seca y 40 g de agua esterilizada para obtener un mosto al 23% de materia seca. Después, se añade en cada mosto:

30

> Matraz 1: 0,5 de salvado de trigo fermentado por una cepa de *Aspergillus niger* ATCC 76061, según el procedimiento descrito en el documento US 2002 037 342;

35

> Matraz 2: 16,7 µl de Spirizyme® Fuel (solución de glucoamilasa purificada, Novozymes);

El pH inicial de los mostos en los dos matraces se ajusta a 4. Los mostos son inoculados con 5x10<sup>6</sup> UFC de levaduras Ethanol Red® (Lesaffre) por ml de mosto.

40

En el matraz 2, se añade el nitrógeno exógeno, en forma de amoníaco en una cantidad de 1 gramo de nitrógeno por kilogramo de trigo.

Durante todo el tiempo de los ensayos, los mostos se mantienen a una temperatura de 30°C y bajo agitación a 100 rpm.

45

La concentración deseada en etanol es de 87 g de etanol por litro de mosto (11% v/v), lo cual corresponde a un rendimiento de conversión almidón en etanol del 81%.

La tabla 2 muestra la evolución de la concentración en etanol en el mosto y el pH del mosto en función de la

duración de la sacarificación-fermentación.

De la misma manera que la tabla 1, la tabla 2 ilustra que la utilización de un complemento nutricional según la invención en el medio de sacarificación-fermentación permite obtener una mayor concentración en etanol en un tiempo inferior que las enzimas convencionales a pesar de una aportación de nitrógeno exógeno.

Además, la tabla 2 ilustra que la incorporación de amoníaco en el matraz 2 provoca un descenso del pH alrededor de 2,8.

Para obtener un mejor rendimiento en etanol, es importante que el pH del mosto permanezca entre 3,5 y 5. En efecto, siendo la sacarificación-fermentación realizada a aproximadamente 30°C, un pH demasiado elevado, en particular superior a 5, provoca un riesgo de contaminación del mosto. Un valor del pH demasiado bajo, en particular inferior a 3,5, conlleva una disminución del rendimiento de la fermentación alcohólica.

La utilización de una preparación enzimática a la que se añade una fuente de nitrógeno exógeno en un medio de sacarificación-fermentación necesita un dispositivo de regulación del pH, de manera que se mantenga un valor de pH entre 3,5 y 4,5.

Tabla 2

Duración SSF (h)	Concentración en etanol (g/l)		pH	
	Salvado fermentado	Spirizyme + NH <sub>3</sub>	Salvado fermentado	Spirizyme + NH <sub>3</sub>
0	0	0	4	4
19	56,6	33,8	3,7	2,9
28	72,7	48		
43	82	63,9	3,8	2,7
47	82,6	71		
67	88	77,9	3,8	2,8

El complemento nutricional según la invención tiene un efecto tampón sobre el pH del mosto de sacarificación-fermentación y por lo tanto, ventajosamente, permite librarse de un dispositivo de regulación del pH.

### 25 Ejemplo 3: Bio-estimulación

Este ejemplo pone en evidencia el efecto de una bio-estimulación del complemento nutricional según la invención. Los ensayos de este ejemplo ilustran que la complementación en nitrógeno y el efecto de estabilización del pH del mosto alrededor de 4, explica sólo parcialmente la mejora de los rendimientos de la levadura para la producción de etanol durante su introducción en el medio de sacarificación-fermentación.

En estos ensayos, los inventores han preparado un mosto de harina de trigo al 32% de materia seca. Después de 1h 30 de licuefacción a 85°C, a pH 5,5 y bajo agitación a 250 rpm, el mosto se reparte en 2 biorreactores de 4 litros. Cada biorreactor contiene 1,7 kg de mosto al 29,8% de materia seca. El mosto obtenido en cada biorreactor se obtiene mezclando el mosto al 32% de materia seca procedente de la licuefacción con unas vinazas al 27% de materia seca.

Las vinazas utilizadas para diluir el mosto son unas vinazas obtenidas al final de un procedimiento de fermentación alcohólica de trigo.

Los 1,7 kg de mosto al 29,8% de materia seca se completan de la siguiente manera:

- Biorreactor 1: 199 µl de Spirizyme® Fuel (solución de glucoamilasa purificada, Novozymes) y 59 µl de Viscozym Wheat® (Novozyme) (enzima deviscosificante);
- Biorreactor 2: 5,7 g de salvado de trigo fermentado por una cepa de *Aspergillus niger* ATCC 76061, según el procedimiento descrito en el documento US 2002 037 342.

El pH inicial de los mostos en los dos biorreactores se ajustó a 4,1 y la temperatura a 30°C, después los mostos son sometidos a una agitación a 100 rpm.

Los mostos son después inoculados con 5x10<sup>6</sup> UFC de levaduras (Ethanol Red®, Lesaffre), por ml de mosto.

Se añade en el biorreactor 1 nitrógeno exógeno, de manera fraccionada, en forma de amoníaco, para alcanzar un contenido de 1 gramo de nitrógeno por kilogramo de trigo.

Las vinazas procedentes de mosto de cereales fermentados contienen una cierta cantidad de fibras. Mezclándolas

con el mosto, se obtiene un efecto tampón del pH del mosto.

La concentración deseada en etanol es de 87 g de etanol por litro de mosto, lo cual corresponde a un rendimiento de conversión del almidón en etanol del 81%.

5 La tabla 3 muestra la evolución de la concentración en etanol en el mosto y el pH del mosto en función de la duración de la sacarificación-fermentación.

10 El fraccionamiento de la aportación en nitrógeno exógeno así como la utilización de las vinazas permite una estabilización del pH en el biorreactor 1 de aproximadamente 4.

15 Como se muestra en la tabla 3, la concentración deseada en etanol se alcanza casi en 28 horas en el biorreactor con un complemento nutricional según la invención, mientras que se necesita esperar 44 horas para alcanzar una concentración equivalente en el biorreactor con la preparación enzimática. Además, al cabo de 68 horas, la concentración en etanol es todavía más elevada en el biorreactor con el complemento nutricional según la invención que con la preparación enzimática.

20 La tabla 3 ilustra la ventaja significativa de la utilización de un complemento nutricional según la invención con respecto a las preparaciones enzimáticas clásicas. Los resultados de estos ensayos indican que una complementación en nitrógeno y un control del pH explican sólo parcialmente los rendimientos del complemento nutricional según la invención.

25 Estos ensayos ponen en evidencia un efecto de bioestimulación de las levaduras relacionado con la composición del complemento nutricional según la invención.

Tabla 3

Duración SSF (h)	Concentración en etanol (g/l)		pH	
	Salvado fermentado	Spirizyme + NH <sub>3</sub> + VW	Salvado fermentado	Spirizyme + NH <sub>3</sub> + VW
0	0	0	4,1	4,1
8	6,8	<4	4	4,1
20	69	35,5	3,9	3,75
24	73,5	48,8	4	3,8
28	82,5	58,5	4	3,9
44	85,6	82,6	4,1	3,8
48	93,6	88,9	4,1	3,85
68	97,1	91,3	4,2	4

30 **Ejemplo 4: Fermentación aerobia de las vinazas**

Los inventores han estudiado de manera comparativa la evolución de la concentración del medio de prefermentación en levadura en función del contenido en materia seca de dicho medio.

35 Estos ensayos se efectuaron sobre 100 g de medio de prefermentación en matraces con deflectores de 250 ml. Los medios de prefermentación se termostatan a 30°C, se colocan bajo agitación a 130 rpm y se inoculan con 2,5 x 10<sup>7</sup> levaduras (Ethanol Red<sup>®</sup>), por ml de medio. El pH inicial de los medios es de 4,2 a 4,4.

Cada medio de prefermentación se compone de la siguiente manera, en porcentaje en masa:

- 40
- Matraz 1: 1,2% de vinaza al 28 % de materia seca, y aproximadamente el 98,8% de agua;
  - Matraz 2: 10% de vinaza al 28% de materia seca, y aproximadamente el 90% de agua;
  - Matraz 3: 20% de vinaza al 28% de materia seca, y aproximadamente el 80% de agua;
  - Matraz 4: 40% de vinaza al 28% de materia seca, y aproximadamente el 60% de agua;
  - Matraz 5: medio control (glucosa y extracto de levadura).
- 45

Los matraces son agitados de manera que se oxigena el medio y se permite la propagación de la levadura.

Los inventores han medido la evolución de la concentración en levadura en cada medio de prefermentación.

50 Las composiciones de los medios en los matraces y las evoluciones de las concentraciones en levadura se recapitulan en la tabla 4 siguiente:

Tabla 4

Duración del cultivo (h)	Recuento (levaduras/ml)				
	1,2% vinazas	10% vinazas	20% vinazas	40% vinazas	Control
0	2,50E+07	2,50E+07	2,50E+07	2,50E+07	2,50E+07
5	3,30E+07	4,90E+07	1,54E+08	4,15E+08	4,90E+07
7	3,00E+07	2,50E+08	3,10E+08	4,50E+08	6,00E+07
24	3,30E+07	1,90E+08	3,50E+08	5,50E+08	2,00E+08

5 Como se muestra en la tabla 4, un medio de prefermentación compuesto por el 40% en masa de vinaza al 28% en masa de materia seca, es decir un medio al 11,2% en masa de materia seca, permite una multiplicación de un factor 16,6 de la cantidad de levadura en 5 horas. A título comparativo, el factor multiplicativo sobre el mismo periodo en el medio control es de aproximadamente 2.

10 Después de 24 horas de cultivo aerobio, la concentración en levadura en el medio compuesto por el 40% en masa de vinaza es más de 2,5 veces la concentración de levadura en el medio control.

15 Sin estar vinculado por una teoría, los inventores explican estos resultados por la presencia en la materia seca de las vinazas de fuentes de carbono, diferente de la glucosa, asimilables por la levadura. Los inventores han demostrado que la materia seca de las vinazas contiene aproximadamente el 10% de azúcares fermentables, esencialmente en forma de glucosa o de almidón residual. La concentración inicial en levadura corresponde a aproximadamente 13,8 g de levadura por litro de medio. Por lo tanto, se ha formado aproximadamente 13,2 g de levadura por litro de medio, lo cual corresponde a un consumo de aproximadamente 26,4 g de glucosa. Ahora bien, en el matraz n° 4 la concentración inicial en glucosa es de aproximadamente 11,2 g por litro de medio. La cantidad de levadura obtenida está por lo tanto relacionada con otra fuente de carbono diferente de la glucosa, por ejemplo la presencia de glicerol en las vinazas.

20

Evidentemente, la presente invención no está limitada a los modos de realización descritos y representados proporcionados a título de ejemplos ilustrativos y no limitativos.

25

## REIVINDICACIONES

1. Utilización de un complemento nutricional en la fabricación de etanol a partir de una materia prima amilácea por sacarificación-fermentación, siendo dicho complemento nutricional un complemento nutricional para medio de fermentación alcohólica a partir de materias primas glucídicas, que comprende un principio activo, en forma bruta o extraída, procedente de la fermentación de un salvado de trigo con un moho seleccionado de entre las cepas de *Aspergillus niger* ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 o de entre las cepas de *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 y ATCC 42149.
2. Utilización de un complemento nutricional según la reivindicación 1, presentando dicho complemento nutricional por lo menos una de las actividades enzimáticas siguientes:
- glucoamilásica: por lo menos 500 UG por gramo de materia seca,
  - proteolítica: por lo menos 100 UP por gramo de materia seca,
  - xilanásica: por lo menos 100 UX por gramo de materia seca.
3. Utilización de un complemento nutricional según la reivindicación 1 o 2, siendo dicho complemento nutricional susceptible de ser obtenido mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:
- i) coger salvado de trigo,
  - ii) humidificar, acidificar a un pH comprendido entre 4 y 5, y tratar térmicamente dicho salvado de manera que se pasteuriza o se esteriliza,
  - iii) inocular el salvado de trigo resultante por una cepa de *Aspergillus niger*, seleccionada de entre ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112, o por una cepa de *Aspergillus oryzae* seleccionada de entre ATCC 22788 y ATCC 42149,
  - iv) hacer fermentar el salvado de trigo en el estado sólido en un reactor agitado periódicamente, a una temperatura de 28°C a 38°C, siendo la cantidad en humedad mantenida entre 45% y 65% en peso, en unas condiciones de aeración apropiadas para evitar una acumulación de dióxido de carbono permanente en el seno del salvado de trigo, hasta que el producto de fermentación presente los valores mínimos siguientes de actividades enzimáticas:
    - glucoamilásica: por lo menos 500 UG por gramo de materia seca, y eventualmente,
    - proteolítica: por lo menos 100 UP por gramo de materia seca,
    - xilanásica: por lo menos 100 UX por gramo de materia seca.
4. Utilización de un complemento nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la actividad glucoamilásica del complemento nutricional es de por lo menos 750 UG por gramo de materia seca.
5. Utilización de un complemento nutricional según la reivindicación 4, en la que la actividad glucoamilásica del complemento nutricional es de por lo menos 1500 UG por gramo de materia seca.
6. Utilización de un complemento nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho complemento nutricional ergosterol, n-acetilglucosamina, vitaminas, ácidos nucleicos y aminoácidos.
7. Utilización de un complemento nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo dicho complemento nutricional vitamina B.
8. Utilización de un complemento nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicho complemento nutricional uno o unos aminoácidos seleccionados de entre: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, valina, leucina, ácido glutámico.
9. Procedimiento de fabricación de etanol a partir de una materia glucídica que es una materia amilácea, que comprende una etapa de fermentación en presencia de un complemento nutricional, y que comprende, después de una etapa de licuefacción y eventualmente una etapa de pre-sacarificación, una etapa de sacarificación-fermentación en un medio de sacarificación-fermentación cuyo contenido en glucosa al inicio de la etapa de sacarificación-fermentación es como máximo igual al 95% del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea,
- en el que dicho complemento nutricional es un complemento nutricional, para medio de fermentación alcohólica a partir de materias primas glucídicas, que comprende un principio activo, en forma bruta o extraída, procedente de la fermentación de un salvado de trigo con un moho seleccionado de entre las cepas de *Aspergillus niger* ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 o de entre las cepas de *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 y ATCC 42149,

caracterizado porque se introduce el complemento nutricional en el medio de sacarificación-fermentación.

5 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho procedimiento no comprende ninguna etapa de pre-sacarificación y el contenido en glucosa al inicio de la etapa de sacarificación-fermentación es como máximo igual al 3% del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea.

10 11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el contenido en glucosa al inicio de la etapa de sacarificación-fermentación es como máximo igual al 3% del equivalente en glucosa que corresponde al almidón de dicha materia amilácea.

15 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, siendo el complemento nutricional introducido en forma bruta, en el que la cantidad de dicho complemento nutricional es superior o igual a 4 kg de materia seca y/o inferior o igual a 60 kg de materia seca por tonelada de almidón.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que dicho complemento nutricional constituye la principal fuente nutricional para la levadura del medio de sacarificación-fermentación y/o la principal fuente de ergosterol y/o la principal fuente de nitrógeno y/o aminoácidos y/o de azufre y/o de vitaminas.

20 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que la sacarificación-fermentación se realiza totalmente en ausencia de aportación de aire o de oxígeno.

25 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que la sacarificación-fermentación comprende una fase inicial aerobia.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que la sacarificación-fermentación se lleva a cabo en las condiciones siguientes:

- 30 - temperatura: de 30°C a 35°C,
- pH: ajustado al inicio de la etapa de sacarificación-fermentación entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 5,
- 35 - inóculo de levadura: aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $5 \cdot 10^8$  UFC de levadura por ml de medio de sacarificación-fermentación,
- 20% a 35% de MS,
- 40 - tiempo de estancia: 20 horas a 72 horas.

17. Residuos procedentes de un procedimiento de fabricación de etanol según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, que comprenden más de 5 g de ergosterol por tonelada de materias secas de residuos.

45 18. Residuos según la reivindicación 17, que comprenden más del 40%, preferentemente más del 50% de proteínas en bruto, en porcentajes en base a la materia seca.

19. Residuos según la reivindicación 17, que comprenden más del 50% de proteínas en bruto, en porcentaje en base a la materia seca.

50 20. Procedimiento de fabricación de levadura en aerobiosis en un pre-fermentador, caracterizado porque se añade en dicho prefermentador unas vinazas obtenidas durante la realización de un procedimiento de fabricación de etanol según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16.

55 21. Procedimiento de fabricación de levadura según la reivindicación 20, en el que las vinazas añadidas son unas vinazas clarificadas y/o unas vinazas concentradas.

60 22. Procedimiento de fabricación de etanol según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, en el que se utilizan, para la fermentación etanólica, unas levaduras obtenidas mediante un procedimiento de fabricación de levadura según la reivindicación 20 o 21, utilizando el procedimiento unas vinazas que proceden de dicho procedimiento de fabricación de etanol.

23. Procedimiento de fabricación de etanol según la reivindicación 22, en el que dichas vinazas son unas vinazas clarificadas y/o unas vinazas concentradas.

Fig. 1

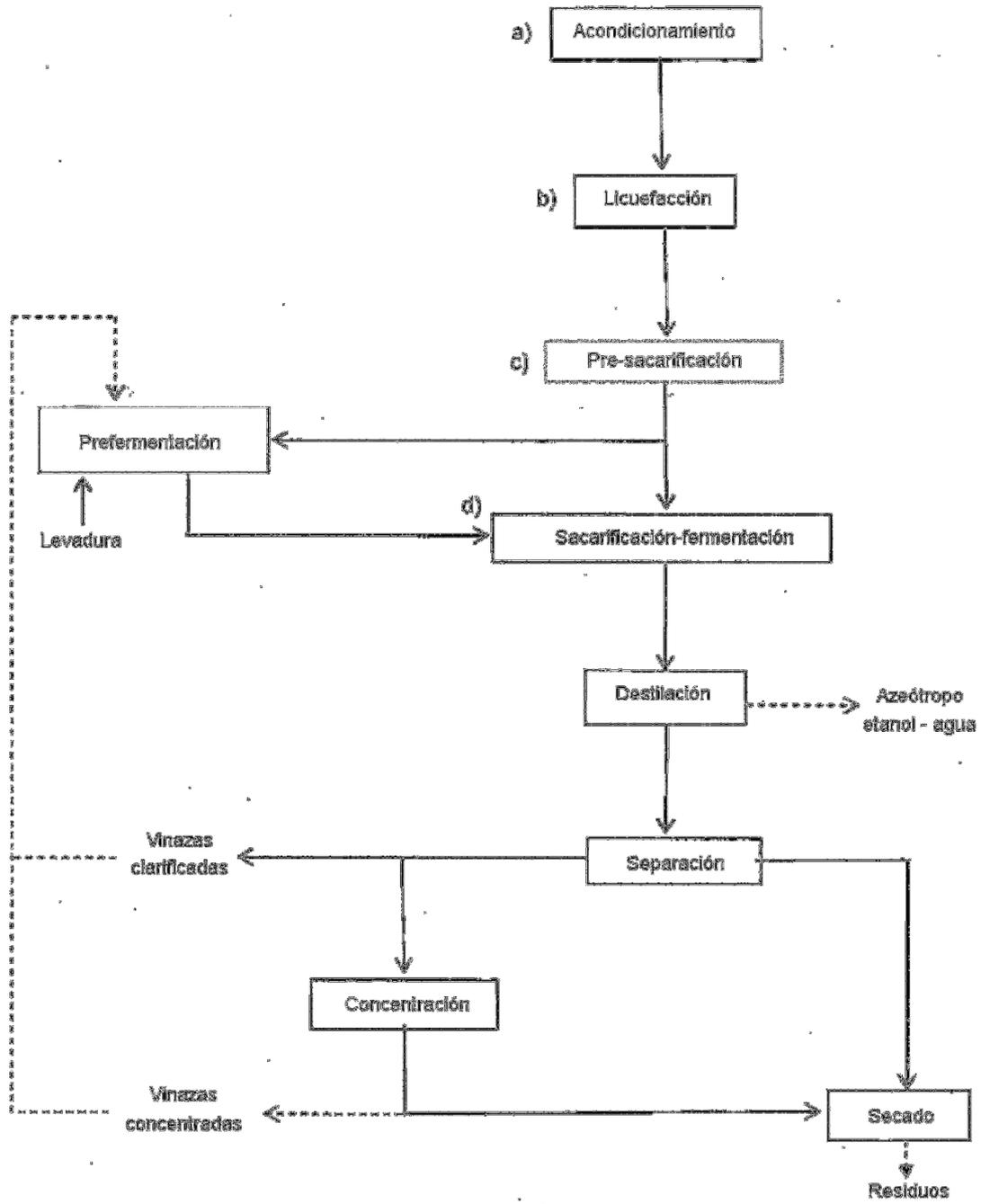


Fig. 2

