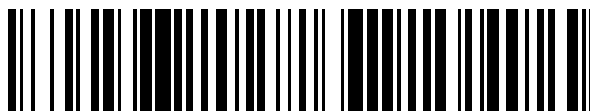


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 768**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/14** (2006.01)

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12C 12/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/US2013/043539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO2013181496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13728639 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2855686**

54 Título: **Procedimiento de fermentación alcohólica en presencia de una levadura de alta tolerancia al alcohol y una levadura positiva a la maltotriosa**

30 Prioridad:

**31.05.2012 EP 12004209**

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

**10.05.2017**

73 Titular/es:

**CARGILL, INCORPORATED (100.0%)  
15407 McGinty Road West, Mail Stop 24  
Wayzata, Minnesota 55391, US**

72 Inventor/es:

**MEURENS, NICOLAS ANDRE ALBERT;  
DE TROOSTEMBERGH, JEAN-CLAUDE MARIE  
PIERRE;  
HORBACH, BERNHARD y  
KRUSE, MICHAEL JOSEF CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 611 768 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 de fermentación alcohólica en presencia de una levadura de alta tolerancia al alcohol y una levadura positiva a la maltotriosa

### Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a un procedimiento de fermentación alcohólica en presencia de una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol y una o más levaduras positivas a maltotriosa.

### Fundamento de la invención

- 10 El etanol es un alcohol de 2 carbonos con la fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ . Es un importante producto industrial hoy en día y su importancia está creciendo. El etanol puede producirse mediante un procedimiento químico o por medio de procesos biológicos, por fermentación del sustrato que contiene glucosa mediante levadura. El último se denomina a menudo como bioetanol. Para facilitar la lectura, en la presente descripción se entiende que etanol es bioetanol, a menos que se especifique otra cosa.

- 15 El etanol encuentra diferentes aplicaciones industriales. En primer lugar, se usa en la industria alimentaria y de bebidas. El etanol puede producirse o bien "in situ" durante los procedimientos de fermentación como la producción de cerveza y de vino o pueden producirse como un producto final de un procedimiento de fermentación y añadirse posteriormente a bebidas para producir bebidas alcohólicas. Este etanol se denomina como etanol potable. En segundo lugar, el etanol se usa crecientemente como una fuente de energía alternativa a los combustibles fósiles. Este etanol se denomina como etanol combustible o biocombustible. Está menos purificado que el etanol potable pero el procedimiento de producción es esencialmente similar.

- 20 En algunas partes del mundo, el uso de materias primas para producir etanol combustible pone el uso de las mismas materias primas para la producción alimentaria bajo mucha presión. Además por esta razón, es importante aumentar el rendimiento de los procedimientos de producción de etanol actuales.

- 25 Hoy en día, la producción de etanol como un producto final usa cepas de levadura conocida como levadura del destilador. Algún trabajo de investigación se ha hecho en el campo para desarrollar cepas de levadura que tengan tolerancia aumentada al alcohol, para aumentar el rendimiento del procedimiento de producción de etanol. Se conoce también el uso de otras cepas de levadura que tengan una alta tolerancia al alcohol, es decir, capaces de producir altas cantidades de etanol, tal como la levadura de cerveza.

El documento DD253044A1 describe el uso de levadura de destilador y levadura de cerveza en la producción de etanol.

- 30 Hay una demanda siempre existente de la industria para proporcionar un procedimiento con rendimiento aumentado y velocidad aumentada de producción de etanol, sin costes aumentados de producción. La presente invención proporciona dicha solución.

### Compendio de la invención

- 35 La presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación alcohólica que comprende fermentar un sustrato que contiene carbohidrato en presencia de una o más levaduras con alta tolerancia al alcohol que tienen una tolerancia al alcohol de al menos 100 g/l y una o más levaduras positivas a la maltotriosa.

Además, la presente invención se refiere a un uso de una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol y una o más levaduras positivas a la maltotriosa en un procedimiento de fermentación alcohólica.

- 40 Además, la presente invención se refiere a una composición para usar en un procedimiento de fermentación alcohólica, caracterizado por que dicha composición comprende una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol y una o más levaduras positivas a la maltotriosa.

Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol y una o más levaduras positivas a la maltotriosa, caracterizada por que dicha composición es un subproducto del procedimiento de fermentación alcohólica según el primer aspecto de la presente invención.

### 45 Descripción detallada

El término "aproximadamente", como se usa en esta memoria cuando se refiere a un valor medible pretende abarcar variaciones de 5%, 4%, 3%, 2%, 0,5% o incluso 0,1% del valor especificado.

- 50 La presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación alcohólica que comprende fermentar un sustrato que contiene carbohidrato en presencia de una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol que tiene una tolerancia al alcohol de al menos 100 g/l y una o más levaduras positivas a la maltotriosa.

### Procedimiento de fermentación

La fermentación alcohólica es un procedimiento en donde la levadura convierte glucosa o maltosa y algunas levaduras maltotriosa, de un sustrato que contiene carbohidrato fermentable adecuado en etanol y dióxido de carbono. Así un procedimiento de fermentación alcohólica para el propósito de la presente invención es un procedimiento para la producción de etanol. Dicho procedimiento puede ser por ejemplo un procedimiento para la producción de etanol, producción de cerveza y producción de vino. En una realización preferida, el procedimiento es un procedimiento para la producción de etanol en donde el etanol es el producto final.

Un procedimiento de fermentación para la producción de etanol puede llevarse a cabo o bien como un procedimiento de sacarificación directa o como un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneas (procedimiento SFS). Preferiblemente, el procedimiento de la presente invención es un procedimiento SFS.

Tradicionalmente, el método para la producción de etanol, típicamente a partir de cereales, es el denominado procedimiento de sacarificación directa. En este procedimiento, la sacarificación del macerado se hace antes de la fermentación. Las etapas en un procedimiento de sacarificación directa convencional, donde la materia prima comprende almidón, incluyen:

- Licuefacción o dextrinización: conversión del almidón a dextrinas por adición de una enzima alfa-amilasa al macerado, por lo que el macerado se convierte en un denominado "macerado licuado";

- Sacarificación completa: conversión de las maltodextrinas en el macerado licuado a glucosa mediante adición de una enzima amiloglucosidasa o glucoamilasa, por lo que el macerado licuado se convierte en un "macerado totalmente sacarificado". Esto se hace preferiblemente en condiciones óptimas de pH y temperatura para la enzima usada, como se sabe en la técnica y/o se indica por los productores de la enzima.

- Fermentación: inoculación del macerado totalmente sacarificado (es decir, inoculación del medio de fermentación) con levadura, conversión de la glucosa y maltosa en el macerado totalmente sacarificado en etanol y dióxido de carbono a través de la acción de una levadura adecuada para la producción de etanol, tal como levadura de destilador. El macerado totalmente sacarificado se convierte en un macerado fermentado.

Hoy en día, con mucha frecuencia, la fermentación alcohólica para la producción de etanol es como un procedimiento SFS. En dicho procedimiento SFS, al menos parte de la etapa de sacarificación y la etapa de fermentación se hacen de forma simultánea en vez de en etapas posteriores.

Para el propósito de la presente invención, la etapa de sacarificación y las etapas de fermentación pueden hacerse en etapas separadas, posteriores. Preferiblemente, para el propósito de la presente invención, toda la etapa de sacarificación y toda la etapa de fermentación se hacen de forma simultánea. Después de la licuefacción, como se describe anteriormente, el "macerado licuado" se enfría a temperatura de fermentación (de aproximadamente 20 a aproximadamente 50°C). Se añaden una o más enzimas amiloglucosidasa o glucoamilasa, el pH se ajusta al valor óptimo para la glucoamilasa (pH típicamente alrededor de 4,5) y al mismo tiempo, la inoculación del macerado se hace de manera que la fermentación pueda comenzar.

De forma alternativa, parte de la etapa de sacarificación se hace de forma simultánea con la etapa de fermentación. En este caso, la sacarificación del macerado licuado se hace hasta que una cierta cantidad del macerado se convierte a glucosa y la inoculación del medio de fermentación se hace hasta que se obtiene la total sacarificación, de manera que parte de la sacarificación tiene lugar a la vez que la fermentación.

El procedimiento de fermentación de la presente invención puede ser un procedimiento de una carga, una carga de alimentación o continuo. Suministrar el sustrato y/o la levadura puede estar así en carga, carga de alimentación o continuo.

En un procedimiento SFS, los azúcares fermentables liberados por la glucoamilasa se consumen directamente por la levadura. Típicamente en SFS, una concentración de 20 g/l o más, preferiblemente 30 g/l o más, más preferiblemente 40 g/l o más, incluso más preferiblemente 50 g/l o más, y lo más preferiblemente 60 g/l o más de maltosa se mide en el macerado, mientras está típicamente cerca de cero en un macerado totalmente sacarificado donde esencialmente toda la maltosa se ha convertido en glucosa. El uso de maltosa por la levadura necesita la presencia de dos proteínas: una permeasa de maltosa que permite la entrada del azúcar en la célula de levadura y una maltasa intra-celular que escinde la maltosa en dos moléculas de glucosa. La maltosa es así un azúcar significativo en una regulación del procedimiento SFS porque no es solo un sustrato para la glucoamilasa en la sacarificación, sino también para la levadura en fermentación. Por consiguiente, una cepa de levadura es capaz de consumir maltosa en presencia de fermentos de glucosa más rápido en el procedimiento SFS. Preferiblemente incluso, una cepa de levadura capaz de consumir maltosa más rápido es ventajosa en el procedimiento de la presente invención. Este es el caso de la levadura de panadero, que es capaz también de consumir maltotriosa. Típicamente para la levadura de panadero, la maltotriosa puede estar presente en el medio en una cantidad de 20 a 40 g/l.

Típicamente, en un procedimiento de fermentación alcohólica, la levadura se añade a un medio de fermentación que

comprende un sustrato que contiene carbohidrato fermentable adecuado. La una o más levadura de alta tolerancia al alcohol puede añadirse de forma separada y/o posterior a la una o más levadura positiva a la maltotriosa, o viceversa. También es posible añadir ambos tipos de levaduras de forma simultánea. Además también es posible mezclar las levaduras primero, y después usar la mezcla, rehidratada si se necesita, para la inoculación. La mezcla de las levaduras puede alcanzarse por ejemplo por mezcla sencilla, especialmente cuando se usan levaduras secas. El medio de fermentación tiene típicamente una sustancia seca de 10% en peso (% en peso) a 50% en peso, más preferiblemente de 15% en peso a 40% en peso, incluso más preferiblemente de 20% en peso a 35% en peso. La fermentación se lleva a cabo a temperaturas en el intervalo de 20°C a 50°C, más preferiblemente de 25°C a 45°C, incluso más preferiblemente de 30°C a 40°C. Al final del procedimiento de fermentación la levadura se desactiva por ejemplo mediante temperatura y el producto final se recupera mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Si el producto final es etanol, puede recuperarse por destilación por ejemplo.

#### Levadura

Durante la fermentación alcohólica, la levadura convierte glucosa de un sustrato adecuado que contiene carbohidrato fermentable en etanol y dióxido de carbono. Diferentes levaduras se usan para diferentes propósitos, dependiendo de sus características.

Las levaduras se caracterizan entre otras cosas por su tolerancia al alcohol, es decir, el nivel de alcohol en el medio por encima del cual la levadura comienza a morir. Varias levaduras con una alta tolerancia al alcohol se han seleccionado y desarrollado a lo largo de los años, y se usan típicamente con el propósito de producir etanol. Ejemplos típicos de dichas levaduras son: levadura de cerveza, levadura de destilador, levadura de vino. Las levaduras de alta tolerancia al alcohol tienen típicamente una tolerancia al alcohol de por encima de 100 g de alcohol por litro de medio en donde la levadura está comprendida (g alcohol/l de medio). Otras levaduras tienen una menor tolerancia al alcohol, y por lo tanto no se usan típicamente con el propósito de producir etanol por la baja eficiencia y productividad que tendría el procedimiento. Las levaduras de baja tolerancia al alcohol tienen típicamente una tolerancia al alcohol de 100 g de alcohol/l o inferior. Un ejemplo de dicha levadura es la levadura de panadero.

Las levaduras se caracterizan además por su capacidad para crecer en maltotriosa, debido a la presencia de un gen. La maltotriosa es un trisacárido, compuesto por tres moléculas de glucosa unidas con enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos (Grado de polimerización 3, DP3). La levadura que es capaz de crecer en maltotriosa (es decir, en un medio que tiene solo maltotriosa como fuente de carbohidrato), siendo así capaz de fermentar la maltotriosa en etanol, es positiva a la maltotriosa. La levadura que no es capaz de crecer en un medio que tiene solo maltotriosa como fuente de carbohidratos, es negativa a la maltotriosa, es decir no es capaz de fermentar maltotriosa en etanol.

La mayoría de levaduras son capaces de convertir maltosa (DP2) en etanol y dióxido de carbono. Sin embargo, ciertas cepas de levadura se han desarrollado específicamente a lo largo de los años por su capacidad para convertir rápidamente la maltosa y además convertir la maltosa incluso en presencia de glucosa.

Las levaduras de alta tolerancia al alcohol comprenden levadura del destilador, levadura de cerveza y levadura de vino. La levadura de destilador por ejemplo se caracteriza por una tolerancia al alcohol de alrededor de 110-120 g de alcohol/l. Además, es ventajoso en el procedimiento de la presente invención que la levadura de alta tolerancia al alcohol sea negativa a la maltotriosa. La levadura del destilador por ejemplo es negativa a la maltotriosa. Además, la levadura del destilador por ejemplo tiene una preferencia a usar glucosa libre (DP1) en vez de maltosa (DP2) cuando ambas están presentes; de manera que la levadura usará maltosa solo una vez que se ha usado esencialmente toda la glucosa libre disponible. La levadura del destilador puede ser de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Preferiblemente las levaduras naturales, no-GMO, se usan para el propósito de la presente invención. Así, para el propósito de la presente invención, la levadura de alta tolerancia al alcohol puede ser levadura de destilador, levadura de cerveza, levadura de vino o una combinación de dos o más de las mismas.

Las levaduras positivas a la maltotriosa comprenden levadura de panadero. La levadura de panadero es así capaz de producir etanol cuando crece en maltotriosa. La levadura de panadero se caracteriza además en que es una levadura de baja tolerancia al alcohol, tiene una tolerancia al alcohol de alrededor de 90-100 g de alcohol/l. No tiene preferencia en usar glucosa o maltosa como sustrato. La levadura de panadero se caracteriza también por que puede usar maltosa más rápidamente que otras levaduras. La levadura de panadero puede ser de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras preferiblemente naturales, no GMO se usan para el propósito de la presente invención. La levadura positiva a la maltotriosa para el propósito de la presente invención así tiene preferiblemente también una baja tolerancia al alcohol y preferiblemente es capaz además de consumir maltosa rápidamente. Por ejemplo, la levadura de panadero puede usar maltosa más rápidamente que la levadura de destilador.

Ahora, se ha encontrado sorprendentemente por los inventores de la presente invención que el uso combinado de una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol, con una o más levaduras positivas a la maltotriosa durante el procedimiento de fermentación de la presente invención está influyendo inesperadamente y ventajosamente la producción de etanol, preferiblemente en el procedimiento SFS. En comparación con el uso de una o más levadura de alta tolerancia al alcohol sola, tal como levadura de destilador, el uso tanto de levadura de alta tolerancia al alcohol como levadura positiva a la maltotriosa aumenta significativamente el rendimiento del etanol, aumenta la

velocidad de la producción de etanol, es decir, la productividad del procedimiento, y aumenta el comienzo de la fermentación, es decir, la fermentación comenzará más rápidamente.

5 Cuando se usan ambos tipos de levaduras en el procedimiento de la presente invención, se da un efecto sinérgico por lo que el rendimiento de producción y la velocidad de producción de etanol se aumentan. Se cree que la alta tolerancia al alcohol de la levadura de alta tolerancia al alcohol la permite continuar la fermentación cuando la concentración de etanol en el medio (es decir título de etanol) es demasiado alto para la levadura positiva a la maltotriosa. En la etapa temprana de la fermentación, mientras la levadura con alta tolerancia al alcohol convierte la glucosa libre, la capacidad de la levadura positiva a la maltotriosa para convertir maltosa (DP2) y maltotriosa (DP3) al mismo tiempo es responsable de una mayor velocidad de fermentación y un mayor rendimiento del procedimiento.

10 A través del alto rendimiento y la mayor velocidad, menos subproductos, tal como isomaltosa, que no es fermentable por la levadura, se forman durante el procedimiento de fermentación. El aumento de rendimiento, preferiblemente el aumento de rendimiento en el procedimiento SFS, puede ser tan alto como de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15% de aumento en comparación a un procedimiento de fermentación similar donde solo se usa levadura con alta tolerancia al alcohol.

15 Preferiblemente para el propósito de la presente invención, la una o más levadura con alta tolerancia al alcohol comprende levadura de destilador, más preferiblemente, la una o más levadura con alta tolerancia al alcohol es levadura de destilador.

Más preferiblemente para el propósito de la presente invención, la una o más levadura positiva a la maltotriosa es de baja tolerancia al alcohol.

20 Más preferiblemente para el propósito de la presente invención, la una o más levadura positiva a la maltotriosa comprende levadura de panadero, más preferiblemente, la una o más levadura positiva a la maltotriosa es levadura de panadero.

Así preferiblemente, el procedimiento de fermentación de la presente invención es un procedimiento de fermentación para la producción de etanol, en presencia de levadura de destilador y levadura de panadero.

25 Preferiblemente, la una o más levadura de alta tolerancia al alcohol comprende levadura de cerveza y la una o más levadura positiva a la maltotriosa comprende levadura de panadero. En una realización adicional preferida, la una o más levadura de alta tolerancia al alcohol es levadura de cerveza y la una o más levadura positiva a la maltotriosa es levadura de panadero.

30 La cantidad mínima de levadura total, es decir, levadura de alta tolerancia al alcohol más levadura positiva a la maltotriosa en el medio de fermentación puede ser tan bajo como 0,005% en peso (% en peso) del medio de fermentación. Sin embargo, influirá la velocidad de fermentación, y preferiblemente la cantidad de levadura total es de 0,1% en peso a 5% en peso del medio de fermentación.

35 Preferiblemente, la relación de levadura de alta tolerancia al alcohol a levadura positiva a la maltotriosa, es decir, la relación de levadura activa de alta tolerancia a alcohol a la levadura activa positiva a la maltotriosa, es de 20:80 a 80:20, preferiblemente de 25:75 a 75:25, más preferiblemente de 30:70 a 70:30, incluso más preferiblemente de 40:60 a 60:40, aún incluso más preferiblemente de 45:55 a 55:45. Lo más preferiblemente, la relación de levadura de alta tolerancia al alcohol a levadura positiva a la maltotriosa es aproximadamente 50:50.

40 Las levaduras pueden usarse en cualquier forma adecuada tal como por ejemplo levadura fresca, levadura seca activa, que puede rehidratarse antes del uso o levadura seca instantánea, que no necesita rehidratación antes del uso y puede usarse como está. Sin embargo si una de las levaduras aplicadas se toma de una cierta forma, es conveniente tomar la otra levadura en la misma forma. Si uno elige tomar levaduras de diferentes formas, debería tenerse cuidado para asegurar que se respeta la relación de levadura activa. Así en la presente invención, la relación de levaduras significa la concentración de levadura activa de un tipo a levadura activa del otro tipo.

#### Sustrato fermentable

45 La levadura convierte la glucosa en alcohol y dióxido de carbono. Cualquier sustrato que sea una fuente de glucosa que pueda hacerse disponible a la levadura es un sustrato adecuado para el propósito de la presente invención. Preferiblemente, el sustrato comprende maltosa y más preferiblemente también comprende maltotriosa. Dicho sustrato puede derivarse de cereales tales como trigo, maíz, cebada, avena, centeno, arroz; de patata, frutas, desechos de fruta, pulpa de madera y dichas biomasas que pueden fermentarse mediante levadura. El sustrato preferido sin embargo se deriva de almidón, tal como un almidón parcialmente hidrolizado. El almidón puede ser de cualquier fuente, tal como cereales, frutas como el plátano, raíces de plantas como mandioca o patata, guisantes y similares. Preferiblemente, el almidón es de uno o más cereales. El uno o más cereales puede ser trigo, maíz, cebada, avena, centeno, arroz y similares. En una realización preferida, el cereal comprende trigo. En una realización más preferida, el cereal es trigo. Puede usarse cualquier tipo de trigo, tal como trigo duro, trigo blando, variedades que contienen alto y bajo contenido en amilosa y variedades genéticamente modificadas de las mismas.

55

Un almidón hidrolizado parcial puede obtenerse por cualquier método conocido en la técnica, tal como una etapa de

licuefacción como se describe anteriormente.

Preferiblemente, el procedimiento de la presente invención comprende además las etapas de recuperar el etanol y el residuo acuoso completo. Así preferiblemente, el procedimiento SFS comprende además las etapas de:

5 - Destilación: separación de etanol de la fase acuosa. La lechada restante que consiste en fase acuosa y sólidos se denomina "residuo acuoso completo". La fracción de etanol resultante puede además deshidratarse para eliminar el agua residual, o refinarse más de otra forma.

- Centrifugado: separación del residuo acuoso completo en una fracción sólida, denominada "granos húmedos de destiladores", y una fracción soluble, denominada "residuo acuoso fino".

10 - Evaporación: concentración del residuo acuoso fino para obtener un denominado "residuo acuoso fino condensado" o "compuestos solubles de destiladores condensados".

- Secado: secar los granos húmedos de destiladores para obtener "grano seco de destiladores" o secar una mezcla de granos húmedos de destiladores y compuestos solubles de destiladores condensados para obtener "granos y compuestos solubles secos de destiladores".

15 El residuo acuoso completo y todos los productos derivados de él, tal como los granos húmedos de destiladores, el residuo acuoso fino, el residuo acuoso fino condensado, grano seco de destiladores, granos y compuestos solubles secos de destiladores son así subproductos del procedimiento de fermentación de la presente invención. Estos subproductos pueden usarse como son o pueden tratarse adicionalmente y usarse como pienso para animales, algunos de ellos pueden quemarse para recuperar energía calórica.

20 Una ventaja adicional de la presente invención es que la fermentación es más completa ya que menos azúcares residuales permanecen en el residuo acuoso completo y así en todos los productos derivados de él. Esto es ventajoso porque hay menos riesgo de fermentación láctica durante el almacenaje del residuo acuoso completo o cualquier producto derivado de él. Así el procedimiento de la presente invención tiene un impacto positivo en la estabilización del residuo acuoso completo y cualquier producto derivado de él. Además, si el residuo acuoso completo o cualquier producto derivado de él, se usan en aplicación de pienso para animales, la menor cantidad de  
25 azúcar residual en el pienso puede ser beneficioso para la salud del animal. Además, el residuo acuoso completo o cualquier producto derivado de él contiene extractos de la una o más levadura de alta tolerancia al alcohol y de la una o más levadura positiva a la maltotriosa usada para la fermentación y que se ha desactivado/destruido durante la destilación o durante otra etapa del tratamiento provocando la desactivación de la levadura. Por lo tanto, el  
30 residuo acuoso completo o cualquier producto derivado de él contiene nutrientes beneficiosos tales como vitaminas, proteína de levadura y similares, que son beneficiosas para la salud del animal alimentado con el residuo acuoso completo o cualquier producto derivado de él.

Así además, la presente invención se refiere a una composición que comprende levadura de alta tolerancia al alcohol y levadura positiva a la maltotriosa y/o extractos de levadura de alta tolerancia al alcohol y levadura positiva a la maltotriosa caracterizada por que dicha composición es un subproducto del procedimiento de fermentación.  
35 Dicho subproducto puede ser el residuo acuoso completo o cualquier producto derivado de él, tal como granos húmedos de destiladores, residuo acuoso fino, residuo acuoso fino condensado, grano seco de destiladores, granos y compuesto soluble seco de destiladores.

Además, la presente invención se refiere a una composición de pienso que comprende el residuo acuoso completo o cualquier producto derivado de él, obtenible por el procedimiento de la presente invención.

40 Además, la presente invención se refiere a un uso de una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol y una o más levaduras positivas a la maltotriosa en un procedimiento para la producción de etanol. La una o más levadura de alta tolerancia al alcohol puede añadirse de forma separada y/o posteriormente a la una o más levadura positiva a la maltotriosa, o viceversa. También es posible añadir ambos tipos de levaduras de forma simultánea. Además también es posible mezclar las levaduras primero, y después usar la mezcla, rehidratada si se necesita, para la inoculación.  
45 La mezcla de las levaduras puede alcanzarse por ejemplo por mezcla simple, especialmente cuando se usan levaduras secas.

Además, la presente invención se refiere a una composición para usar en un procedimiento para la producción de etanol, caracterizada por que dicha composición comprende una o más levadura de alta tolerancia al alcohol y una o más levadura positiva a la maltotriosa. La composición puede comprender levadura de alta tolerancia al alcohol y levadura positiva a la maltotriosa, es decir, levadura activa de alta tolerancia a alcohol y levadura activa positiva a la maltotriosa, en una relación de 20:80 a 80:20, preferiblemente de 25:75 a 75:25, más preferiblemente de 30:70 a 70:30, incluso más preferiblemente de 40:60 a 60:40, aún incluso más preferiblemente de 45:55 a 55:45. Lo más preferiblemente, la relación de levadura de alta tolerancia al alcohol a levadura positiva a la maltotriosa es aproximadamente 50:50. La composición puede comprender levadura fresca, levadura seca activa o levadura seca instantánea, cualquier forma de levadura es adecuada. Preferiblemente, la composición comprende levadura seca activa. Adicionalmente a los dos tipos de levadura, la composición puede comprender además vitaminas, minerales, sales y similares.

**Ejemplos**

La presente invención se ilustrará con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

5 Se usa macerado de trigo al 33,0% de sustancia seca. El 90% en peso/peso de la sustancia seca total del macerado es almidón licuado.

El macerado tiene la siguiente composición:

Tabla 1: composición de macerado de trigo

| Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) |
|---------------|-----------|-----------|
| 25,2          | 71,5      | 39,8      |

10 El pH del macerado se ajusta de 5,0 a 4,5 con ácido sulfúrico concentrado. La glucoamilasa Deltazym LE-5 se añade a dosis de 0,05% en sustancia seca y la enzima que reduce la viscosidad Shearzyme plus se añade a dosis de 0,02% en sustancia seca.

Parte del macerado de trigo se somete a sacarificación, a 60°C durante 24 horas, para determinar el contenido fermentable. Después de la sacarificación, el macerado de trigo tiene la siguiente composición:

Tabla 2: composición de macerado de trigo después de la sacarificación completa

| Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) |
|---------------|-----------|-----------|
| 255,7         | 12,3      | 10,7      |

15 El resto del macerado de trigo se usa para el ensayo. La sacarificación se hace de forma simultánea a la fermentación.

20 La levadura de destilador seca activa (Thermosacc de Lallemand) "T" y la levadura de panadero seca activa (de Bruggeman) "B" se rehidratan de forma separada en agua desmineralizada durante 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) a un factor de dilución 6.

Un fermentador de 2 litros se llena con 1 litro de volumen de trabajo. La inoculación del medio de fermentación se hace entonces con 50 ml de levadura hidratada. Se hacen varios ensayos:

- Inoculación con 50 ml de levadura de destilador hidratada
- Inoculación con 50 ml de levadura de panadero hidratada
- 25 - Inoculación con 50 ml de una mezcla 50:50 (v:v) de levadura de destilador hidratada y levadura de panadero hidratada.
- Inoculación con 50 ml de una mezcla 25:75 (v:v) de levadura de destilador hidratada y levadura de panadero hidratada.

30 Cada ensayo se hace por duplicado. Las fermentaciones se realizan a 32°C y la agitación a 200 rpm. Las muestras se toman después de 48 y 72 horas de fermentación.

La composición de las cervezas después de 48 horas de fermentación se da en la tabla 3.

Tabla 3: composición de las cervezas después de 48 horas de fermentación

| Relación T-B | Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) | Etanol (g/l) | Glicerol (g/l) | Rendimiento de etanol (%) |
|--------------|---------------|-----------|-----------|--------------|----------------|---------------------------|
| 0:100        | 50,5          | 7,7       | 10,0      | 95,6         | 7,1            | 68,5                      |
| 25:75        | 23,6          | 7,0       | 10,2      | 106,9        | 7,4            | 76,5                      |
| 50:50        | 18,4          | 7,0       | 10,7      | 108,7        | 7,5            | 77,8                      |
| 100:0        | 26,2          | 16,2      | 10,9      | 94,8         | 7,0            | 67,9                      |

La composición de las cervezas después de 72 horas de fermentación se da en la tabla 4. La glucosa residual en el cultivo 100% Bruggeman y el etanol eran aún de valor similar que los de después de 48 horas de fermentación. La mezcla 50:50 que alcanza 119,5 g/l fue más productiva que la mezcla 75:25.

- 5 Tabla 4: composición de las cervezas después de 72 horas de fermentación

| Relación T-B | Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) | Etanol (g/l) | Glicerol (g/l) | Rendimiento de etanol (%) |
|--------------|---------------|-----------|-----------|--------------|----------------|---------------------------|
| 0:100        | 53,8          | 7,5       | 8,3       | 96,0         | 7,0            | 68,7                      |
| 25:75        | 10,4          | 6,2       | 7,6       | 116,3        | 7,6            | 83,2                      |
| 50:50        | 5,4           | 5,3       | 7,5       | 119,5        | 7,6            | 85,5                      |
| 100:0        | 17,9          | 6,5       | 10,1      | 111,0        | 7,6            | 79,4                      |

### Ejemplo 2

Se usa macerado de trigo al 33,0% de sustancia seca. El 90% en peso/peso de la sustancia seca total del macerado es almidón licuado.

- 10 El macerado tiene la siguiente composición:

Tabla 1: composición de macerado de trigo

| Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) |
|---------------|-----------|-----------|
| 25,2          | 71,5      | 39,8      |

- 15 El pH del macerado se ajusta de 5,0 a 4,5 con ácido sulfúrico concentrado. Se añade la glucoamilasa Deltazym LE-5 a dosis de 0,05% en sustancia seca y la enzima que reduce la viscosidad Shearzyme plus se añade a la dosis de 0,02% en sustancia seca.

Parte del macerado de trigo se somete a sacarificación, a 60°C durante 24 horas, para determinar el contenido fermentable. Después de la sacarificación, el macerado de trigo tiene la siguiente composición:

Tabla 2: composición de macerado de trigo después de la sacarificación completa

| Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) |
|---------------|-----------|-----------|
| 248,5         | 11,6      | 10,4      |

- 20 El resto del macerado se usa para el ensayo. La sacarificación se hace de forma simultánea a la fermentación.

La levadura de destilador seca activa (Ethanol Red) "ER" y la levadura de panadero seca activa (Saf Instant Red) "SR" se rehidratan de forma separada en agua desmineralizada durante 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) a un factor de dilución 6.

- 25 Un fermentador de 2 litros se llena con 1 litro de volumen de trabajo. La inoculación del medio de fermentación se hace entonces con 50 ml de levadura hidratada. Varios ensayos se hacen:

- Inoculación con 50 ml de levadura de destilador hidratada
- Inoculación con 50 ml de levadura de panadero hidratada
- Inoculación con 50 ml de una mezcla 50:50 (v:v) de levadura de destilador hidratada y levadura de panadero hidratada

- 30 - Inoculación con 50 ml de una mezcla 25:75 (v:v) de levadura de destilador hidratada y levadura de panadero hidratada

Cada ensayo se hizo por duplicado. Las fermentaciones se realizan a 32°C y la agitación a 200 rpm. Se tomaron



muestras después de 24 y 72 horas de fermentación.

La composición de las cervezas después de 24 horas de fermentación se da en la tabla 3.

Tabla 3: composición de las cervezas después de 24 horas de fermentación

| Relación ER-SR | Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) | Etanol (g/l) | Glicerol (g/l) | Velocidad de producción de etanol (g/l/h) |
|----------------|---------------|-----------|-----------|--------------|----------------|---|
| 0:100          | 31,4          | 29,3      | 7,7       | 83,1         | 6,8            | 3,5                                       |
| 25:75          | 29,2          | 16,9      | 7,8       | 91,5         | 7,1            | 3,8                                       |
| 50:50          | 34,8          | 18,6      | 7,9       | 88,2         | 7,0            | 3,7                                       |
| 100:0          | 35,0          | 45,3      | 7,6       | 71,4         | 6,3            | 3,0                                       |

- 5 La composición de las cervezas después de 72 horas de fermentación se da en la tabla 4. La glucosa residual en el cultivo SR al 100% es muy alto, indicando que la fermentación estaba bloqueada. Confirmó que la tolerancia al etanol de la levadura de panadero SR es menor que la de la levadura de destilador ER. La mezcla 50:50 que alcanza 130,9 g/l de etanol fue más productiva que la mezcla de 75:25, que alcanza 127,8 g/l de etanol.

Tabla 4: composición de las cervezas después de 72 horas de fermentación

| Relación ER-SR | Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) | Etanol (g/l) | Glicerol (g/l) | Rendimiento de etanol (%) |
|----------------|---------------|-----------|-----------|--------------|----------------|---------------------------|
| 0:100          | 42,5          | 6,7       | 6,7       | 109,0        | 7,5            | 75,9                      |
| 25:75          | 6,7           | 5,6       | 5,8       | 127,8        | 8,2            | 89,1                      |
| 50:50          | 5,2           | 4,8       | 5,5       | 130,9        | 8,2            | 91,2                      |
| 100:0          | 7,3           | 5,7       | 6,7       | 127,1        | 7,8            | 88,6                      |

10

Ejemplo 3: ejemplo comparativo

Se usa el macerado de trigo a 28% de sustancia seca. El 90% en peso/peso de la sustancia seca total es almidón licuado. El macerado tiene la siguiente composición:

Tabla 1: composición del macerado de trigo

| Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) |
|---------------|-----------|-----------|
| 20,1          | 42,6      | 32,8      |

15

El pH del macerado se ajusta de 5,0 a 4,5 con ácido sulfúrico concentrado. Se añade la glucoamilasa Deltazym LE-5 a la dosis de 0,05% en sustancia seca y la enzima que reduce la viscosidad Shearzyme plus se añade a la dosis de 0,02% en sustancia seca.

- 20 Parte del macerado de trigo se somete a sacarificación, a 60°C durante 24 horas, para determinar el contenido fermentable. Después de la sacarificación, el macerado de trigo tiene la siguiente composición:

Tabla 2: composición de macerado de trigo después de la sacarificación completa

| Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) |
|---------------|-----------|-----------|
| 210,0         | 13,3      | 6,8       |

El resto del macerado se usa para el ensayo. La sacarificación se hace de forma simultánea a la fermentación.

La levadura de destilador seca activa (Thermosacc de Lallemand) "T" y la levadura de cerveza seca activa (CBC-1

## ES 2 611 768 T3

de Lallemand) "C" se rehidratan de forma separada en agua desmineralizada durante 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) a un factor de dilución 6.

Un fermentador de 2 litros se llena con 1 litro de volumen de trabajo. La inoculación del medio de fermentación se hace entonces con 10 ml de levadura hidratada:

- 5 - Inoculación con 10 ml de una mezcla 50:50 (v:v) de levadura de destilador hidratada y levadura de cerveza hidratada

El ensayo se hace por duplicado. La fermentación se realiza a 32°C y la agitación a 200 rpm. Las muestras se toman después de 24 y 72 horas de fermentación.

- 10 En otro ensayo se prueba la combinación de la levadura de destilador con una levadura positiva a la maltotriosa. La levadura de destilador seca activa (Thermosacc de Lallemand) "T" y la levadura activa positiva a la maltotriosa (Superstart de Lallemand) "S" se rehidratan de forma separada en agua desmineralizada durante 30 minutos a temperatura ambiente (20°C) a un factor de dilución 6.

Un fermentador de 2 litros se llena con 1 litro de volumen de trabajo. La inoculación del medio de fermentación se hace entonces con 10 ml de levadura hidratada:

- 15 - Inoculación con 10 ml de una mezcla 50:50 (v:v) de levadura de destilador hidratada y levadura positiva a la maltotriosa hidratada

El ensayo se hace por duplicado. La fermentación se realiza a 32°C y la agitación a 200 rpm. Las muestras se toman después de 24 y 72 horas de fermentación.

La composición de las cervezas después de 24 horas de fermentación se da en la tabla 3.

- 20 Tabla 3: composición de las cervezas después de 24 horas de fermentación

| Relación 50:50 | Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) | Etanol (g/l) | Glicerol (g/l) |
|----------------|---------------|-----------|-----------|--------------|----------------|
| T:C            | 17,1          | 50,3      | 5,8       | 56,1         | 5,0            |
| T:S            | 15,7          | 22,5      | 5,7       | 72,2         | 5,7            |

Después de 24 horas ya la cantidad de etanol en las cervezas es mucho mayor para la mezcla de levadura de destilador con levadura positiva a la maltotriosa en comparación con la mezcla de levadura de destilador con la levadura de cerveza típica.

- 25 La composición de las cervezas después de 72 horas de fermentación se da en la tabla 4.

Tabla 4: composición de las cervezas después de 72 horas de fermentación

| 50:50 | Glucosa (g/l) | DP2 (g/l) | DP3 (g/l) | Etanol (g/l) | Glicerol (g/l) | Rendimiento de etanol (%) |
|-------|---------------|-----------|-----------|--------------|----------------|---------------------------|
| T:C   | 2,5           | 6,5       | 5,5       | 104,0        | 6,6            | 94,9                      |
| T:S   | 1,6           | 5,4       | 3,7       | 106,6        | 6,8            | 97,2                      |

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la producción de etanol que comprende fermentar un sustrato que contiene carbohidrato en presencia de una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol que tiene una tolerancia al alcohol de al menos 100 g/l y una o más levaduras positivas a la maltotriosa.
- 5 2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende además las etapas de recuperar etanol y recuperar el residuo acuoso completo.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la una o más levadura de alta tolerancia al alcohol es negativa a la maltotriosa y/o en donde la una o más levadura positiva a la maltotriosa es de baja tolerancia al alcohol.
- 10 4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la una o más levadura positiva a la maltotriosa tiene la capacidad de fermentar maltosa más rápido que la levadura de alta tolerancia al alcohol.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la una o más levadura de alta tolerancia al alcohol es levadura de destilador.
- 15 6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la una o más levadura de alta tolerancia al alcohol es levadura de cerveza.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la una o más levadura positiva a la maltotriosa comprende levadura de panadero.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el sustrato comprende maltosa y maltotriosa, preferiblemente el sustrato se deriva de almidón.
- 20 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la relación de levadura de alta tolerancia al alcohol y levadura positiva a la maltotriosa es 75:25 a 25:75.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en donde la relación de levadura de alta tolerancia al alcohol y levadura de baja tolerancia al alcohol es aproximadamente 50:50.
- 25 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que es un procedimiento simultáneo de sacarificación y fermentación.
12. El uso de una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol y una o más levaduras positivas a la maltotriosa en un procedimiento para la producción de etanol.
13. El uso según la reivindicación 12, caracterizada por que el procedimiento es un procedimiento para hacer cerveza.
- 30 14. Una composición para usar en un procedimiento para la producción de etanol caracterizada por que dicha composición comprende una o más levaduras de alta tolerancia al alcohol y una o más levaduras positivas a la maltotriosa.
- 35 15. Una composición que comprende una o más levadura de alta tolerancia al alcohol y/o extractos de la misma, y una o más levadura positiva a la maltotriosa y/o extractos de la misma, caracterizada por que dicha composición es un subproducto del procedimiento de fermentación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.