



(51) МПК  
*C12N 1/14* (2006.01)  
*C12N 9/36* (2006.01)  
*C12N 9/62* (2006.01)  
*C12P 7/06* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: **2008141128/10, 16.03.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**16.03.2007**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
**17.03.2006 FR 0602398**

(43) Дата публикации заявки: **27.04.2010** Бюл. № 12

(45) Опубликовано: **20.10.2013** Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 2002037342 A1, 28.03.2002. CN 1661024 A, 31.08.2005. WO 8704465 A1, 30.07.1987. WO 2004046333 A2, 03.06.2004. RU 2136746 C1, 10.09.1999. LIN YAN ET AL. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 69:627-642. LABELLE P. ET AL. Comparative study of wheat flour saccharification (см. прод.)**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **17.10.2008**

(86) Заявка РСТ:  
**FR 2007/050937 (16.03.2007)**

(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2007/113417 (11.10.2007)**

Адрес для переписки:

**109012, Москва, ул.Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", пат.пов. И.В.Павлюченко, рег.№ 1179**

(72) Автор(ы):

**БАРЕ Жан-Люк (FR),  
 ЛАБЕЙ Пьер (FR)**

(73) Патентообладатель(и):

**ЭТАБЛИССМАН Ж. СУФФЛЕ (FR)**

**(54) ПИТАТЕЛЬНАЯ ДОБАВКА ДЛЯ СРЕДЫ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ**

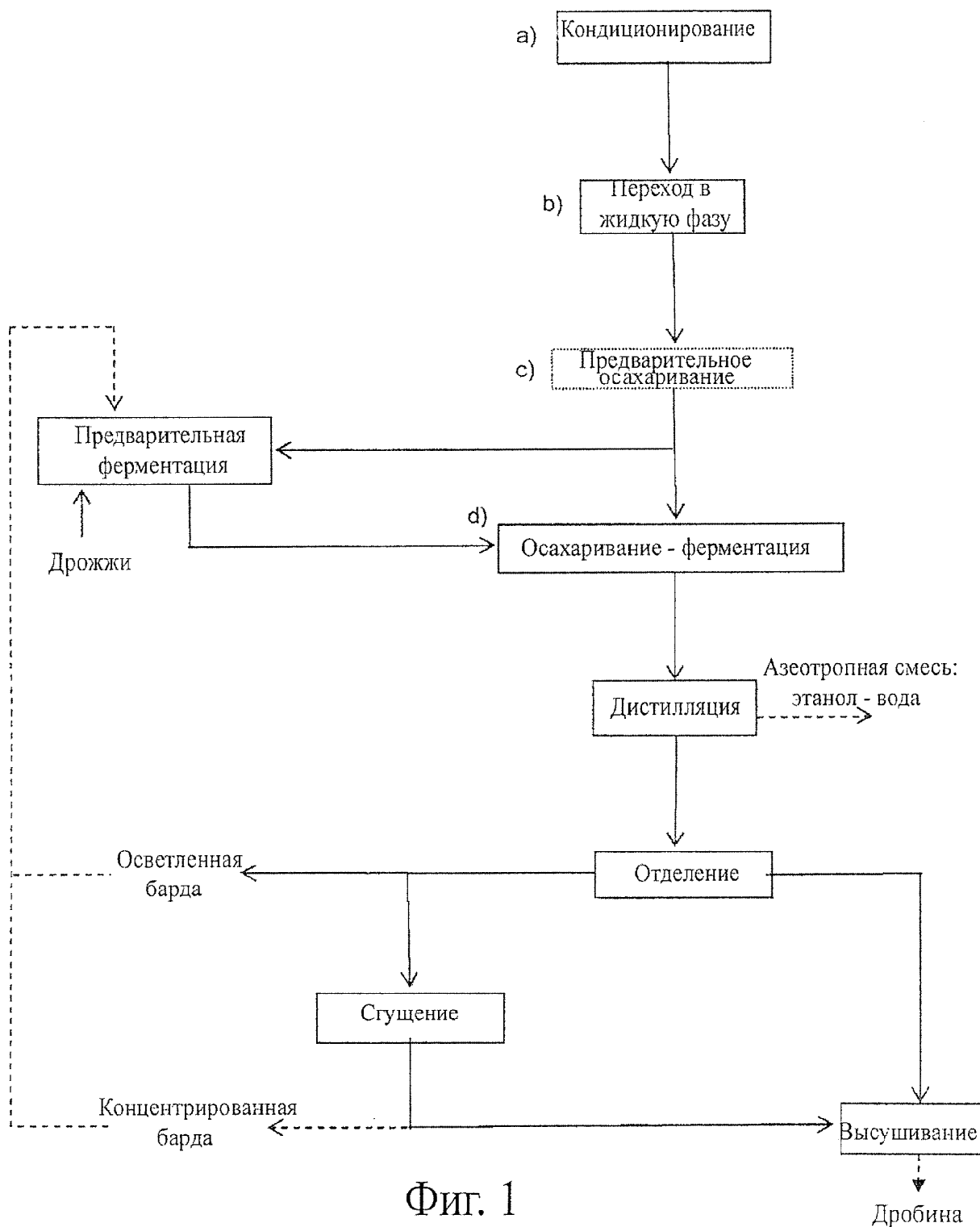
(57) Реферат:

Изобретение относится к применению питательной добавки, используемой на стадии одновременного осахаривания-ферментации при производстве этанола из крахмалистого сырья. Указанную добавку получают из пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами. Активным началом

добавки являются по меньшей мере один фермент и смесь питательных ингредиентов для дрожжей: эргостерол, N-ацетилглюкозамин, витамины, нуклеиновые кислоты и аминокислоты. Указанную добавку используют также для активации спиртового брожения или предварительной ферментации, предназначенной для приготовления дрожжей

в аэробных условиях. Группа изобретений обеспечивает сокращение времени стадии одновременного осахаривания-ферментации в

процессе производства этанола, увеличения роста и эффективности дрожжей. 4 н. и 17 з.п. ф-лы, 2 ил., 4 табл., 4 пр.



Фиг. 1

(56) (продолжение):

and ethanol production with two glucoamylase preparations. // Industrial Crops and Products, 6, 1997, 291-295.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/14* (2006.01)  
*C12N 9/36* (2006.01)  
*C12N 9/62* (2006.01)  
*C12P 7/06* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008141128/10, 16.03.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**16.03.2007**

Priority:

(30) Convention priority:  
**17.03.2006 FR 0602398**

(43) Application published: **27.04.2010 Bull. 12**

(45) Date of publication: **20.10.2013 Bull. 29**

(85) Commencement of national phase: **17.10.2008**

(86) PCT application:  
**FR 2007/050937 (16.03.2007)**

(87) PCT publication:  
**WO 2007/113417 (11.10.2007)**

Mail address:

**109012, Moskva, ul.П'inka, 5/2, ООО  
"Sojzpatent", pat.pov. I.V.Pavljuchenko,  
reg.№ 1179**

(72) Inventor(s):

**BARE Zhan-Ljuk (FR),  
LABEJ P'er (FR)**

(73) Proprietor(s):

**EhTABLISSMAN Zh. SUFFLE (FR)**

RU 2 495 926 C2

RU 2 495 926 C2

(54) **NUTRITIONAL ADDITIVE FOR ALCOHOL FERMENTATION MEDIUM**

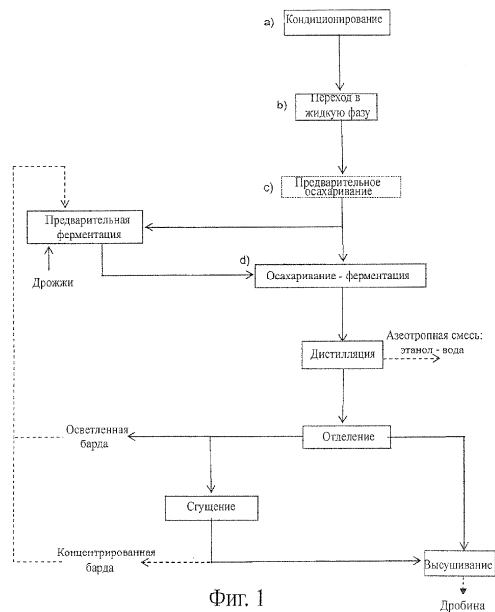
(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: additive is produced from wheat offal fermented with mould fungi. The additive agents are at least one ferment and a mixture of nutritional ingredients for yeast: ergosterol, N-acetylglucosamine, vitamins, nucleic acids and amino acids. The said additive is also used for activation of alcohol fermentation or pre-fermentation intended for preparation of yeast under aerobic conditions.

EFFECT: reduction of the simultaneous saccharification-fermentation stage time in the process of ethanol production, increase of yeast growth and efficiency.

21 cl, 2 dwg, 4 tbl, 4 ex



Фиг. 1

Изобретение относится к питательной добавке, создающей благоприятные условия при промышленном производстве этанола путем спиртового брожения, более конкретно, способом одновременного осахаривания и сбраживания в спирт ферментируемого углеводного сырья, такого как крахмалистое сырье, в частности зерно, более конкретно, пшеница и отходы производства (дробина, отруби), в случае необходимости, после осахаривания. Изобретение также относится к дробине, полученной при осуществлении этого способа, и к способу изготовления дрожжей в аэробных условиях.

Известен процесс производства этанола из крахмалистого сырья ферментативным способом, включающим этап перехода крахмала в жидкую фазу с помощью альфа-амилазы, который предназначен для солубилизации и гидролиза крахмала и превращения его в декстрины. В классическом способе для превращения декстринов в глюкозу за этим этапом следует этап осахаривания с помощью глюкоамилазы, которая также называется амилоглюкозидазой. Таким образом, содержание глюкозы в конце осахаривания составляет почти 100% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству крахмала в вышеупомянутом крахмалистом материале. Иными словами, весь глюкозный потенциал используемого крахмалистого материала преобразуется в глюкозу.

Затем глюкоза сбраживается в течение этапа ферментации, во время которого она превращается в этиловый спирт под воздействием дрожжей в анаэробных условиях.

Направление исследования по усовершенствованию этого ферментативного способа состояло в попытке объединения этапов ферментации и осахаривания. В связи с этим ученые попытались осуществить ферментацию и осахаривание одновременно во время единого этапа, называемого этап «осахаривания-ферментации», по-английски “simultaneous saccharification and fermentation” (ООФ). Содержание глюкозы в среде на начальной стадии этого единого этапа, т.е. после завершения перехода в жидкую фазу, обычно составляет менее 3% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству крахмала в вышеупомянутом крахмалистом материале.

Также были проведены опыты с целью ограничения продолжительности этапа осахаривания таким образом, чтобы содержание глюкозы после завершения этого этапа было ниже 100% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству крахмала в вышеупомянутом крахмалистом материале. В таком случае этап осахаривания определялся как «предварительное осахаривание» или «частичное осахаривание».

Как будет более подробно показано в описании ниже, способы получения этанола, включающие этап неполного осахаривания, и даже не предусматривающие этапа осахаривания, именуемые ниже «способы с неполным осахариванием», предполагают существование определенных ограничений. Следовательно, технические решения, принятые для традиционных способов производства с полным осахариванием перед ферментацией, а priori не могут быть использованы для этих способов.

В условиях способов с неполным осахариванием среда, в которой происходит ферментация и, по меньшей мере, часть процесса осахаривания, называется «средой осахаривания-ферментации».

Существует постоянная потребность в повышении выхода этанола в способах производства этанола, более конкретно, при неполном осахаривании.

Задача настоящего изобретения состоит в удовлетворении этой потребности.

Согласно изобретению эта задача решается с помощью питательной добавки для среды осахаривания-ферментации в условиях способа изготовления этанола путем ферментации крахмалистого сырья, которая включает и предпочтительно состоит из

активного природного вещества, полученного в результате ферментации плесневыми грибами. Она может быть в жидкой или твердой форме.

Как будет более подробно показано в описании ниже, присутствие такой питательной добавки в среде осахаривания-ферментации очень благоприятно сказывается на росте и эффективности дрожжей. В результате отмечается значительное увеличение выхода продукции при осуществлении способа изготовления этанола из крахмалистого сырья.

Предпочтительно способ по изобретению включает один и более предпочтительно несколько следующих факультативных признаков:

- Питательная добавка является твердой или жидкой смесью вышеупомянутого активного природного вещества и, по меньшей мере, одного полезного фермента. Понятие полезного фермента включает, более конкретно, один или несколько ферментов, обладающих амилазной активностью, а именно, глюкоамилазной, протеолитической или ксиланазной активностью или сочетанием таковых.

- Активное природное вещество, присутствующее в питательной добавке по изобретению, находится в неочищенном виде, т.е. содержит субстрат, используемый во время ферментации вышеупомянутыми плесневыми грибами, или в виде вытяжки (экстракта), т.е. отделено от вышеназванного субстрата. При необходимости оно находится в смеси с дополнительными ферментами. Предпочтительно, субстратом являются пшеничные отруби.

- Активное природное вещество выбрано из группы веществ, в которую входят эргостерол, N-ацетилглюкозамин, витамины, в частности витамин В, нуклеиновые кислоты, аминокислоты и, предпочтительно, их смеси. В числе аминокислот желателно присутствие одной или нескольких, предпочтительно, совокупности следующих аминокислот: аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, валил, лейцин, глутаминовая кислота. В числе витаминов отмечается в числе прочих присутствие различных витаминов группы В, например, В1, В2, В3, В6 и инозита, витамина Е.

- Питательная добавка при ее введении в среду осахаривания-ферментации проявляет следующую ферментативную активность, которая в частности, обусловлена соответствующим подбором вышеупомянутых плесневых грибов:

- глюкоамилазную: по меньшей мере, 500 единиц глюкоамилазной активности, предпочтительно, 750 единиц глюкоамилазной активности, более предпочтительно, 1500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ и/или предпочтительно,

- протеолитическую: по меньшей мере, 100 единиц протеолитической активности, предпочтительно, по меньшей мере, 400 единиц протеолитической активности на грамм сухих веществ и/или предпочтительно,

- ксиланазную: по меньшей мере, 100 единиц ксиланазной активности, предпочтительно, по меньшей мере, 400 единиц ксиланазной активности на грамм сухих веществ.

- Питательная добавка получена в результате ферментации, предпочтительно, в твердой среде, субстрата, предпочтительно, пшеничных отрубей с плесневыми грибами, более конкретно, выбранными из числа штаммов *Aspergillus niger*, предпочтительно из числа штаммов ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 или из числа штаммов *Aspergillus* опте, предпочтительно из числа штаммов ATCC 22788 и ATCC42149.

- Питательная добавка получена с помощью способа по изобретению,

включающего следующие этапы:

i. Обеспечение пшеничных отрубей,

ii. Увлажнение их, подкисление до уровня pH от 4 до 5, предпочтительно, азотной кислотой (HNO<sub>3</sub>) и температурная обработка отрубей таким образом, чтобы пастеризовать или стерилизовать их, при этом температурная обработка предпочтительно должна проводиться после увлажнения,

iii. Засев полученных пшеничных отрубей штаммом *Aspergillus niger*, выбранным из числа штаммов ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 или штаммом *Aspergillus oryzae*, выбранным из числа штаммов ATCC 22788 и ATCC42149,

iv. Ферментация пшеничных отрубей в твердом состоянии в ферментере с периодическим перемешиванием при температуре от 28°C до 38°C при влажности от 45% до 65%, предпочтительно, от 50% до 60% по массе в условиях аэрации, достаточной для предотвращения постоянного накопления углекислого газа в толще пшеничных отрубей, до того момента, когда продукт ферментации будет иметь следующие минимальные значения ферментативной активности:

- глюкоамилазная: по меньшей мере, 500 единиц глюкоамилазной активности, предпочтительно, 750 единиц глюкоамилазной активности, более предпочтительно, 1500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ и/или предпочтительно,

- протеолитическая: по меньшей мере, 100 единиц протеолитической активности, предпочтительно, 400 единиц протеолитической активности на грамм сухих веществ,

- ксиланазная: по меньшей мере, 100 единиц ксиланазной активности, предпочтительно, 300 единиц ксиланазной активности на грамм сухих веществ.

- Питательная добавка является ферментным комплексом, полученным способом, который описан в заявке US 2002 037342.

Изобретение также относится к способу изготовления этанола из углеводного материала, более конкретно, из крахмалистого материала, включающему после этапа перехода в жидкую фазу этап осахаривания и затем этап ферментации, или после этапа перехода в жидкую фазу и при необходимости этапа предварительного осахаривания этап осахаривания-ферментации в среде осахаривания-ферментации, содержание глюкозы в которой в начале этапа осахаривания-ферментации составляет не более 95% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству углеводного материала, более конкретно, крахмала в вышеупомянутом крахмалистом материале. Способ по изобретению характеризуется тем, что в ферментационную среду или в среду осахаривания-ферментации вводят питательную добавку по изобретению. Это введение может проводиться непосредственно в ферментационную среду или в среду осахаривания-ферментации или во время предыдущего этапа.

Удивительным образом, присутствие в ферментационной среде или в среде осахаривания-ферментации питательной добавки по изобретению и, более конкретно, пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами, очень благоприятно для повышения эффективности дрожжей. При этом последние превращают в этанол большее количество глюкозы с более предпочтительной кинетикой.

Предпочтительно способ по изобретению включает один и более предпочтительно несколько следующих факультативных признаков:

- Содержание глюкозы в начале этапа осахаривания-ферментации составляет не более 3%, предпочтительно, 2%, и наиболее предпочтительно не более 1% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству крахмала в вышеупомянутом крахмалистом

материале. Иными словами, способ не включает ни этапа осахаривания, ни этапа предварительного осахаривания.

- Если питательная добавка вводится в неочищенной форме, то количество этой питательной добавки выше или равно 4 кг сухих веществ, предпочтительно 14 кг сухих веществ и/или меньше или равно 60 кг сухих веществ, предпочтительно 34 кг сухих веществ, более предпочтительно меньше 19 кг сухих веществ на тонну крахмала, наиболее предпочтительно около 17 кг сухих веществ на тонну крахмала.

- Питательная добавка готовится путем ферментации субстрата, идентичного углеводному материалу, используемому в способе изготовления этанола.

- Этап осахаривания-ферментации полностью проводится без подачи воздуха или кислорода (отсутствует аэробная фаза в собственном смысле).

- Этап осахаривания-ферментации включает начальную аэробную фазу.

- В качестве агента этаноловой ферментации используются дрожжи, в частности, дрожжи рода *Saccharomyces*, более конкретно *Saccharomyces cerevisiae*. Более предпочтительно, чтобы дрожжи работали при концентрации этанола выше 95 г/л.

- В условиях этого способа вышеуказанная питательная добавка представляет собой основной источник питания для дрожжей и/или основной источник эргостерола и/или основной источник азота и/или аминокислот и/или фосфора и/или серы и/или витаминов. Предпочтительно, чтобы она представляла собой единственный источник эргостерола и/или азота и/или аминокислот и/или фосфора и/или серы и/или витаминов.

Способ по изобретению позволяет также получать дробину, обладающую прекрасной питательной ценностью. Таким образом, изобретение также относится к дробине, полученной при осуществлении способа изготовления этанола по изобретению и содержащие более 5 г, предпочтительно более 20 г и/или менее 100 г, предпочтительно менее 35 г, наиболее предпочтительно около 30 г эргостерола на тонну сухих веществ дробины.

Предпочтительно вышеупомянутая дробина содержит также более 40%, предпочтительно более 50% сырого протеина, в пересчете на сухое вещество. Как будет показано в описании ниже, такое высокое содержание протеина стало возможным за счет использования части гемицеллюлозы и волокон во время предварительной ферментации или осахаривания-ферментации.

И, наконец, изобретение, в общем, относится к использованию питательной добавки по изобретению для содействия спиртовой ферментации при изготовлении этанола или предварительной ферментации при производстве дрожжей.

Другие характеристики и преимущества настоящего изобретения будут освещены в описании ниже и при рассмотрении приложенного чертежа, на котором фигура 1 представляет схему части способа изготовления этанола по изобретению.

Способы изготовления этанола путем ферментации углеводов материалов, в частности, крахмалистых материалов, хорошо известны специалистам, они могут быть адаптированы и приведены в соответствие со способом по изобретению. Так, специалист при необходимости в состоянии уточнить некоторые пункты описания ниже.

Описанный ниже способ относится к изготовлению этанола из пшеницы, но может быть применен к любому типу крахмалистого материала, в частности, к любому экстракту зерновых. Следовательно, описанные ниже способы осуществления являются только примерами, их можно модифицировать, в частности, путем замены технических эквивалентов, не выходя за рамки изобретения.

Способ изготовления этанола из пшеницы по изобретению может, например, включать следующие этапы:

а) Этап кондиционирования пшеницы для приготовления продукта помола пшеничного крахмала,

б) Этап перехода крахмала в жидкую фазу (разжижение), в частности, в присутствии альфа-амилазы для гидролиза крахмала и превращение его в декстрины,

в) Факультативный этап предварительного осахаривания, в частности, с помощью комплекса ферментов для гидролиза декстринов и превращения их в ферментируемые сахара (глюкозу, мальтозу, мальтотриозу) и некрахмалистые компоненты и

г) Этап осахаривания-ферментации в среде осахаривания-ферментации, содержащей декстрины и/или вышеупомянутые ферментируемые сахара и дрожжи для производства этанола.

Эти различные этапы представлены на фигуре 1.

Этап а) заключается в приготовлении продукта помола пшеничного крахмала, например, муки, путем кондиционирования вышеупомянутой пшеницы.

Затем пшеничную муку смешивают с водой в смесителе, факультативно с бардой, с кислотой и гидролитическим ферментом таким образом, чтобы образовалось «густое сусло».

Обычно густое сусло содержит от 25 до 35% сухих веществ по массе, предпочтительно от 30 до 35%. Содержание сухих веществ было установлено на этом уровне с целью ограничения расходов на электроэнергию при сохранении удовлетворительной текучести. Из экономических соображений содержание сухих веществ было повышено до максимально возможного уровня для ограничения затрат на испарение барды на последующих этапах способа производства. Количество муки, подаваемое в смеситель, регулируется либо с помощью дозирующего устройства, либо с помощью взвешивающего конвейера.

В зависимости от используемого гидролитического фермента необходимо скорректировать рН путем добавления раствора кислоты, например, серной кислоты. В зависимости от используемых ферментов, в классическом варианте бактериальных альфа-амилаз, более конкретно, термостойких, при необходимости можно применять соль кальция. Расход кислоты регулируется с помощью датчика рН, установленного в трубопроводе для смеси воды/барды перед сгустителем. рН в классическом варианте может варьироваться от 5 до 6,5 в зависимости от используемых ферментов.

После этого переход в жидкую фазу (этап б)) проводится при температуре от 80°C до 95°C. Густое сусло может быть доведено до этой температуры путем непосредственного введения пара в резервуар, где происходит переход в жидкую фазу, по трубам или из пароструйного котла. Во втором случае густое сусло за несколько секунд доводится до температуры от 100°C до 150°C за счет подачи пара в трубопровод перед быстрым охлаждением до температуры от 80 °C до 95 °C. Содержимое в резервуарах, где происходит переход в жидкую фазу, можно перемешивать.

Предпочтительно, материал на этапе перехода в жидкую фазу имеет следующие параметры:

- Температура: от 80°C до 90°C

- рН: 5,5-6,5

- Содержание сухих веществ: 30%-35%

- Время пребывания: от 30 мин. до 2 час.

Этап б) приводит к гидролизу крахмала и превращению его в декстрины. При



предварительном осахаривании (этап с)) жидкое сусло охлаждается в теплообменниках пластинчатого или трубчатого типа до температуры от 50°C до 60°C.

В некоторых случаях допускается разведение сусла разбавителем, таким как вода или обратная барда или флегма, образующаяся в перегонной установке.

На факультативном этапе с) в жидкое сусло предпочтительно вводится ферментный комплекс, обладающий требуемой ферментной активностью.

Количество подаваемых ферментов предпочтительно зависит от количества подаваемого сусла, полученной концентрации глюкозы и остаточного содержания крахмала. Цель такой регулировки соотношений заключается в приготовлении раствора, в котором в конце ферментации будет отсутствовать крахмал.

Предпочтительно, материал на этапе предварительного осахаривания с) имеет следующие параметры:

- Температура: от 50°C до 60°C

- pH: 4-5

- Время пребывания: до получения желаемой концентрации глюкозы, обычно менее 24 часов.

Содержимое резервуаров, в которых проводится предварительное осахаривание, подвергают механическому перемешиванию, которое обеспечивает достаточную гомогенизацию сусла во время осахаривания, а также способствует контакту между ферментами и декстринами, подвергаемыми гидролизу.

Использование ферментного комплекса, полученного в результате ферментации пшеничных отрубей плесневыми грибами, позволяет предпочтительно уменьшить вязкость осахаренного сусла и увеличить содержание азота в вышеупомянутом сусле.

По изобретению осахаривание не продолжается до полного гидролиза декстринов и превращения в глюкозу, а прерывается на стадии неполного гидролиза. По изобретению уровень глюкозы в конце этапа предварительного осахаривания ниже 95%, более предпочтительно ниже 50%, наиболее предпочтительно ниже 5%. В связи с этим гидролиз продолжается на этапе осахаривания-ферментации.

Если способ по изобретению не включает этап частичного осахаривания или «предварительного осахаривания», содержание глюкозы в начале этапа осахаривания-ферментации d) составляет не более не более 3%, предпочтительно, 2%, и наиболее предпочтительно не более 1% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству крахмала в вышеупомянутом крахмалистом материале.

На этапе d) сусло соединяют с дрожжами в среде осахаривания-ферментации. Его также соединяют с питательной добавкой по изобретению. Порядок введения дрожжей и добавки не имеет значения.

Смесь перемешивают в течение всего этапа d).

Можно использовать все дрожжи, используемые при производстве этанола, в частности дрожжи рода *Saccharomyces*. Обычно дрожжи вводят в среду осахаривания-ферментации в аэробных условиях. В течение этого этапа происходит некоторое число делений дрожжевых клеток. В этом случае дрожжи не преобразуют глюкозу в этанол, а, наоборот, используют глюкозу для своего роста. Известно, что для улучшения этого роста клеток следует ввести в среду осахаривания-ферментации питательные добавки. Вместе с этим, для ограничения роста клеток, потребляющих глюкозу и, тем самым, снижающих выход этанола, предпочтительно засеивать среду осахаривания-ферментации таким количеством дрожжей, чтобы наработанный этими дрожжами этанол быстро достигал такой концентрации в культуральной среде, которая

препятствует росту дрожжевых клеток.

По первому варианту этап d) начинается в аэробных условиях в течение времени, необходимого для достаточного размножения дрожжей.

5 Затем среда осахаривания-ферментации переводится в анаэробные условия. В это время дрожжи преобразуют глюкозу в этанол.

По второму варианту этап d) полностью проводится в анаэробных условиях. Присутствие питательной добавки по изобретению позволяет обойтись без первоначальной аэробной фазы.

10 Предпочтительно, материал на этапе осахаривания-ферментации d) имеет следующие параметры:

- Температура: от 30°C до 35°C

- pH: корректируется добавлением кислоты (например, серной кислоты) в начале этапа d) до уровня примерно от 3,5 до 5, предпочтительно примерно от 3,8 до 5, более  
15 предпочтительно примерно от 4 до 5 и наиболее предпочтительно примерно от 4 до 4,5.

- После корректировки pH в начале этапа d) благодаря буферному действию питательной добавки на последующих фазах этапа d) корректировка pH не  
20 предусматривается.

- Инокулят дрожжей: примерно от  $10^6$  до  $5 \cdot 10^8$  КОЕ дрожжей на мл среды осахаривания-ферментации, предпочтительно около  $10^7$  КОЕ дрожжей на мл среды осахаривания-ферментации.

25 - Содержание сухих веществ: от 20% до 35%, а именно от 20% до 30%.

- Время пребывания: от 20 до 72 часов, а именно от 20 до 60 часов. Время пребывания увеличивается с повышением содержания сухих веществ.

Среда осахаривания-ферментации по изобретению содержит питательную добавку по изобретению. Эта добавка может быть введена непосредственно в среду  
30 осахаривания-ферментации или во время предыдущего этапа. Удивительным образом, добавление в среду осахаривания-ферментации такой питательной добавки, более конкретно, пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами, очень благоприятно для повышения эффективности дрожжей. При этом последние  
35 превращают в этанол большее количество глюкозы с более предпочтительной кинетикой. Кроме того, питательная добавка по изобретению позволяет сократить продолжительность аэробной фазы в начале этапа осахаривания-ферментации или даже устранить ее. Предпочтительно, это приводит к повышению производительности процесса. Более предпочтительно, питательная добавка по изобретению позволяет  
40 снизить гибель клеток по сравнению с такой же культурой, культивируемой в отсутствие вышеназванной питательной добавки. И, наконец, ее присутствие оказывает буферное действие, что позволяет исключить необходимость корректировки pH.

По изобретению предпочтительно среда осахаривания-ферментации первоначально  
45 содержит на 1000 кг крахмала, введенного первоначально в среду, от 2,5 кг до 35 кг питательной добавки, более конкретно, ферментированных пшеничных отрубей, в частности от 8 до 10 кг питательной добавки, более конкретно, ферментированных пшеничных отрубей на 1000 кг крахмала.

50 Таким образом, присутствие в среде осахаривания-ферментации ферментированных пшеничных отрубей позволяет значительно сократить время осахаривания-ферментации.

По-видимому, эта питательная добавка вносит в оптимальном соотношении и в

оптимальной форме питательные элементы, которые прекрасно подходят для дрожжей, в частности, для анаэробных культур.

Без привязки к теории изобретатели объясняют эти результаты следующим образом. Они обнаружили присутствие в питательной добавке, используемой по изобретению, аминокислоты, необходимые для дрожжей. Эти аминокислоты, видимо, в значительной степени способствуют азотному питанию дрожжей, в частности, гораздо более эффективно, чем простые соли аммония, которые использовались до настоящего времени, помимо прочего, снижая синтез побочных продуктов, образуемых в процессе ферментации, таких как глицерин, и действительно повышая выход этанола.

Повышенную эффективность дрожжей можно также объяснить присутствием витаминов в питательной добавке по изобретению.

И, наконец, изобретатели обнаружили, что питательная добавка по изобретению содержит эргостерол и N-ацетилглюкозамин, которые являются важными компонентами дрожжей. Их присутствие в среде осахаривания-ферментации способствует росту и успешному функционированию дрожжей в условиях полного анаэробноза. Действительно в этих условиях его синтез дрожжами невозможен. Таким образом, предпочтительно присутствие эргостерола позволяет сократить, или даже исключить аэробную фазу в начале осахаривания-ферментации.

Однако, испытания, представленные в таблице 1 ниже, показали, что добавление выявленных питательных элементов не приводит к образованию столь же продуктивной среды осахаривания-ферментации, что и добавление питательной добавки по изобретению. Таким образом, в основе полученных исключительно высоких показателей лежит сочетание совокупности компонентов этой питательной добавки в пропорциях, образовавшихся в результате ферментации плесневыми грибами, и предпочтительно их подачи в форме пшеничных отрубей.

Питательная добавка не может проявлять особую или оптимальную ферментативную активность. В связи с этим необходимо добавление ферментов.

Тем не менее, предпочтительно, чтобы питательная добавка по изобретению проявляла также ферментативную активность, полезную в рамках способа изготовления этанола. В частности, предпочтительно, чтобы питательная добавка проявляла глюкоамилазную активность выше 500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ. Более предпочтительно, чтобы питательная добавка проявляла протеолитическую активность выше 100 единиц протеолитической активности на грамм сухих веществ и/или ксиланазную активность, по меньшей мере, 100 единиц ксиланазной активности на грамм сухих веществ.

Так, несмотря на то, что предусматривается использование других ферментов, таких как очищенные ферменты или комплексы очищенных ферментов, предпочтительно по изобретению использовать ферментированную питательную добавку в условиях, позволяющих ей проявить вышеупомянутую ферментативную активность. В этом случае, эта питательная добавка как ферментный комплекс должна вводиться предпочтительно на этапе d), и/или при необходимости на этапе с).

Предпочтительно, питательная добавка представляет собой ферментированные пшеничные отруби, которые были приготовлены или могут быть получены с помощью следующего способа по изобретению:

- i) обеспечение пшеничных отрубей,
- ii) увлажнение их и температурная обработка отрубей таким образом, чтобы пастеризовать или стерилизовать их, при этом температурная обработка

предпочтительно должна проводиться после увлажнения,

iii) засев полученных пшеничных отрубей штаммом *Aspergillus niger*, выбранным из числа штаммов ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112, предпочтительно из числа штаммов ATCC 76061 и NRRL 3112, более предпочтительно штаммом ATCC 76061, или из числа штаммов *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 и ATCC 42149.

iv) ферментация пшеничных отрубей в твердом состоянии, предпочтительно в форме слоя толщиной более 10 см в ферментере с периодическим перемешиванием при температуре от 28°C до 38°C при влажности от 45% до 65%, предпочтительно, от 50% до 60% по массе в условиях аэрации, достаточной для предотвращения постоянного накопления углекислого газа в толще пшеничных отрубей, до того момента, когда продукт ферментации будет иметь следующие минимальные значения ферментативной активности:

- глюкоамилазная: по меньшей мере, 500 единиц глюкоамилазной активности, предпочтительно, 750 единиц глюкоамилазной активности, более предпочтительно, 1500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ, и предпочтительно, - протеолитическая: по меньшей мере, 100 единиц протеолитической активности, предпочтительно, 400 единиц протеолитической активности на грамм сухих веществ, и более предпочтительно

- ксиланазная: по меньшей мере, 100 единиц ксиланазной активности, предпочтительно, 300 единиц ксиланазной активности на грамм сухих веществ.

На этапе i) пшеничные отруби предпочтительно выбирают таким образом, чтобы доля частиц размером менее 1 мм составляла, по меньшей мере, 40% по массе.

На этапе ii) пшеничные отруби необходимо увлажнить и подвергнуть температурной обработке с целью их пастеризации или стерилизации.

Предпочтительно, чтобы эта температурная обработка не предшествовала увлажнению, поскольку в том случае, когда проводили температурную обработку отрубей перед их увлажнением, были отмечены недостаточно удовлетворительные результаты ферментации.

Температурная обработка может заключаться в нагревании, например, в автоклаве. Обработка в автоклаве в течение 20 мин. при температуре от 120 до 121°C давала весьма удовлетворительные результаты. Подходят также менее жесткие условия пастеризации в сушильном шкафу при 105°C в течение 15 мин. Можно также проводить температурную обработку отрубей, подавая в отруби пар, это позволяет одновременно увлажнить отруби.

Предпочтительно проводят корректировку pH, предпочтительно азотной кислотой во время увлажнения в диапазоне от 4 до 5,5 для усиления пастеризирующего эффекта температурной обработки и запуска желаемой ферментации. Особенно предпочтительно использование азотной кислоты, поскольку она также используется в качестве источника азота для плесневых грибов.

Помимо стерилизации температурная обработка также способствует желатинизации крахмала, содержащегося в пшеничных отрубях и, следовательно, доступности этого субстрата для грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae*, что повышает эффективность ферментации.

Важна процедура увлажнения отрубей, так как содержание воды влияет на результаты ферментации. Увлажнение проводят таким образом, чтобы содержание воды в отрубях в начале этапа ферментации iv) находилось в пределах 50-60%, предпочтительно 50-55% от общей массы отрубей и воды.

На этапе iii) засев пшеничных отрубей можно проводить с помощью любого подходящего посевного материала. Специалист знает различные способы приготовления подходящего посевного материала на базе отобранного штамма. Предпочтительно норма засева составляет, по меньшей мере,  $10^7$  спор/грамм исходных сухих веществ.

На этапе iv) ферментацию можно проводить в любом подходящем ферментере. Примеры ферментеров, которые можно использовать, описаны в статье А.Дюрана и коллег (A.Durand et Coll.), опубликованной в Agro-Food-Industry Hi-Tech (май-июнь 1997, стр.39-42).

Ферментацию следует проводить до того момента, когда глюкоамилазная активность составит по меньшей мере 500 единиц глюкоамилазной активности, предпочтительно, по меньшей мере 750 единиц глюкоамилазной активности, более предпочтительно, по меньшей мере 1500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ отрубей, то есть обычно в течение периода от 1 до 3 дней, предпочтительно от 30 до 60 часов. Ферментация, продолжительностью менее 1 дня, слишком неполная. По прошествии 3 дней ферментация заканчивается или почти заканчивается, и таким образом, ее продолжение становится экономически нецелесообразным.

Температура среды поддерживается в пределах от 28°C до 38°C, предпочтительно от 32°C до 36°C, что соответствует известной оптимальной области активности используемых штаммов. Предпочтительно, для этого температуру воздуха в течение первых часов ферментации устанавливают в диапазоне от 34°C до 38°C для облегчения прорастания спор, затем на остальную часть этапа ферментации снижают до уровня 28°C-32°C для того, чтобы способствовать корректировке температуры среды.

Содержание влаги в пшеничных отрубях обычно составляет от 50% до 60%. Однако влажность может отклоняться в пределах  $\pm 5\%$  от диапазона 50-60% на относительно короткое время между двумя следующими друг за другом корректировками влажности или в конце ферментации. В любом случае достаточно, чтобы уровень влажности не опускался ниже 45%. При культивировании уровень влажности культуральной среды имеет тенденцию к снижению за счет испарения под действием тепла, которое выделяется при росте грибов, поскольку вышеупомянутая среда является плохим проводником тепла. Поэтому во время ферментации необходимо поддерживать определенное содержание влаги, например, периодически добавляя воду в среду, чтобы компенсировать потери воды средой. Качество используемой воды также играет весьма заметную роль. Можно использовать водопроводную воду хорошего качества или дистиллированную воду.

РН среды ферментации обычно не корректируется. Как было объяснено выше, предпочтительно его уровень корректируется первоначально в пределах от 4 до 5.

Если сначала уровень рН составляет примерно 6,0-6,4, при культивировании уровень рН снижается до 3,8-4,2, а затем к концу снова повышается. Это повторное повышение, как правило, соотносится с фазой споруляции гриба. Мониторинг динамики рН является средством определения состояния культуры.

Ферментер должен аэрироваться, предпочтительно постоянно для того, чтобы обеспечить подачу кислорода, необходимого для ферментации, и не допустить избыточного накопления двуокиси углерода, образующейся при ферментации. Кроме того, аэрация участвует в регуляции температуры и влажности культуральной среды. Воздух предпочтительно должен быть насыщен влагой, чтобы ограничить тенденцию

к подсушиванию среды. Трудно дать количественные указания по потоку аэрации, поскольку здесь участвуют множество переменных, в частности, размер и геометрия ферментера, количество загруженных отрубей и тому подобное. Однако специалист с помощью простых обычных опытов сможет определить надлежащий поток аэрации в  
5 каждом конкретном случае; обычно достаточен поток воздуха из расчета 1-2 м<sup>3</sup>/час на кг сухих веществ, избыточное давление предпочтительно должно составлять от 0,5 до 1 бар.

Партию загруженных в ферменте отрубей в течение ферментации необходимо  
10 периодически перемешивать с помощью перемешивающих стержней, ножей или лопаток или с помощью шнеков для предотвращения образования непроницаемой массы и для обеспечения максимально равномерной аэрации всей массы отрубей. Используемые штаммы удивительным образом устойчивы к перемешиванию. Тем не  
15 менее, следует избегать чрезмерно интенсивного перемешивания.

Ферментированные пшеничные отруби, используемые в способе по изобретению, при желании могут быть высушены или заморожены для сохранности или охлаждены и использованы без дополнительной обработки.

Высушивание предпочтительно проводится при умеренной температуре, чтобы не  
20 нарушить ферментативную активность. Подходящим способом является нагрев в сушильном шкафу при 40°C. В промышленном масштабе предпочтительно вентилировать сухим воздухом при температуре от 35°C до 40°C в зависимости от используемого плесневого гриба. В свою очередь, замораживанию при низкой  
25 температуре, например, при -20°C можно подвергать влажный продукт.

US 2002037342 раскрывает ферментный комплекс, обладающий глюкоамилазной, протеолитической и ксиланазной активностью, полученный при ферментации пшеничных отрубей со штаммами *Aspergillus*. Этот комплекс может использоваться в качестве питательной добавки по изобретению.

Как правило, в рамках способа, включающего этап осахаривания, по меньшей  
30 мере, в той его части, которая проводится одновременно с ферментацией, невозможно предусмотреть действие фермента или многоферментной композиции, использование которой известно в рамках способа с отдельными этапами осахаривания и  
35 ферментации. В частности, это подтверждается фактом, когда добавление композиции, например, композиции по US 2002037342, подразумевает включение таких веществ как гемицеллюлоза, способных повышать вязкость во время ферментации.

Этот документ описывает использование этой композиции с целью улучшения условий на этапе осахаривания. Он никоим образом не означает, что композиция  
40 может представлять интерес для способа, не включающего этап осахаривания или только один этап предварительного осахаривания.

Действительно, оптимальные условия для осахаривания и для ферментации сильно различаются. В частности, осахаривание зачастую проводится при температуре  
45 около 60°C, то есть при температуре, которая не подходит для дрожжей, обычно используемых во время ферментации. Обоюдно, как это иллюстрируется таблицей 7 документа US 2002037342, ферменты композиции по US 2002037342 проявляют оптимальную ферментативную активность при температуре осахаривания, но, как и следовало ожидать, демонстрируют пониженную ферментативную активность в  
50 случае одновременного осахаривания-ферментации.

Кроме того, известно, что ферменты композиции по US 2002037342 уменьшают вязкость среды осахаривания при температуре осахаривания (см. таблицу 8), но специалист с долей вероятности может рассчитывать, что это уменьшение вязкости не

будет воспроизводиться при температуре ферментации, во всяком случае, будет воспроизводиться в той мере, которая сделает приемлемой вязкость среды осахаривания-ферментации.

5 В связи с этим специалист не будет пытаться использовать композицию по US 2002037342 в способе изготовления этанола, не включающем этап осахаривания или только один этап предварительного осахаривания. Это еще менее разумно с учетом того факта, что исключение осахаривания или ограничение его продолжительности может иногда привести к образованию среды осахаривания-ферментации неисправимо  
10 загрязненной, которую можно улучшить только добавлением больших количеств бактериостатических препаратов. Действительно, температура осахаривания обеспечивает защиту от бактериального загрязнения.

Изобретение также относится к использованию пшеничных отрубей, полученных вышеописанным способом, или способом, согласующимся с пшеничными отрубями,  
15 описанным в US 2002037342, для создания благоприятных условий для спиртового брожения в среде осахаривания-ферментации. Предпочтительно в начале этапа d) в среде осахаривания-ферментации должно находиться более 4 кг таких отрубей на 1000 кг крахмала.

20 Преимущественно в предпочтительном способе осуществления изобретения питательная добавка является многоферментным комплексом, полученным при ферментации пшеничных отрубей плесневыми грибами и:

- представляет собой средство повышения ценности отрубей, полученных в результате этапа а) - приготовления пшеничной муки,
- 25 - вносит одновременно ряд полезных ферментов, таким образом, упрощая способ, и
- является превосходной питательной добавкой для дрожжей. Однако для обеспечения этого последнего эффекта массовая доля многоферментного комплекса должна быть гораздо более высокой, чем по предшествующему приему.

30 Современные исследования имеют тенденцию к изготовлению все более концентрированных многоферментных комплексов с целью ограничения массовой доли вводимых веществ. Это приводит к упрощению способов.

В противовес упомянутой тенденции изобретатели, напротив, открыли, что введение более 4 кг сухих веществ, предпочтительно более 14 кг сухих веществ, более  
35 предпочтительно около 19 кг сухих веществ ферментированных пшеничных отрубей на тонну исходного крахмала позволяет повысить общую продуктивность способа изготовления этанола.

40 На выходе после этапа d) ферментированное сусло или «вино», полученное в результате осахаривания-ферментации, после пропускания через теплообменник подается на дистилляционные колонки.

Барда, выходящая из основания колонки, направляется в цех отделения дробины для очистки классическими способами, типа центрифугирования, с целью отделения растворимых веществ от нерастворимых.

45 Сырая дробина, полученная в результате этого этапа отделения, состоит примерно из 35% сухих веществ, осветленная жидкая барда содержит примерно от 7% до 10% сухих веществ.

50 Осветленную жидкую барду концентрируют испарением в вакууме для получения сиропа или «концентрированной барды» с содержанием сухих веществ около 35%.

Полученный сироп можно смешивать с сырой дробинкой (твердой фазой). Затем смесь высушивают и получают около 350 кг дробины, высушенной таким образом, на кг пшеницы, при этом содержание сухих веществ в этой дробине составляет около 90%.

Дробина, полученная после высушивания, обладает замечательными питательными свойствами, в частности, для скота, она также является объектом изобретения. Действительно, 350 кг дробины, полученной по изобретению, содержат от 2 до 35 г эргостерола, предпочтительно около 10 г. Итак, поскольку эргостерол является

5

предшественником синтеза витамина D<sub>2</sub>, он, таким образом, представляет интерес для здоровья, а также интерес для питания дрожжей, в частности, в анаэробных условиях. Кроме того, в том случае, когда питательная добавка представляет собой пшеничные отруби, ферментированные согласно описанному выше способу по

10

изобретению, полученная дробина содержит избыток протеинов. Пары спирта из колонок конденсируются в теплообменниках. Азеотропная смесь, улавливаемая в верхней части колонки, высушивается с помощью классических методов, например, с использованием молекулярного сита.

15

Способ по изобретению позволяет получить примерно от 375 до 390 литров этанола из исходных 1000 кг пшеницы. Иначе говоря, удивительным образом до 91% стехиометрического выхода этанола из пшеницы, содержащей около 60% крахмала, при преобразовании глюкозы в этанол путем ферментации.

20

Без привязки к теории изобретатели объясняют эти результаты заменой внесения экзогенного азота, например, в форме сульфата аммония, свободным аминным азотом. Эта замена предпочтительно снижает синтез побочных ферментных продуктов, в частности, глицерина, и, следовательно, увеличивает выход продукта.

25

Изобретение относится также к способу производства дрожжей в аэробных условиях или «размножения дрожжей», которые более конкретно могут использоваться для предварительной ферментации с целью приготовления дрожжей, которые затем помещаются в среду ферментации или в среду осахаривания-ферментации при способе спиртового сбраживания глюкозы в этанол.

30

В рамках этого способа этап предварительной ферментации обычно имеет своей целью увеличить концентрацию дрожжей в среде предварительной ферментации с уровня около  $10^6$ - $10^7$  КОЕ на мл минимум примерно до  $10^8$  КОЕ на мл среды предварительной ферментации, предпочтительно минимум примерно до  $5 \cdot 10^8$  КОЕ на мл среды предварительной ферментации.

35

Предварительная ферментация проводится в ферментерах для предварительной ферментации, где температура строго контролируется и регулируется, например, с помощью системы охлаждающих пластин снаружи или внутри резервуаров для предварительной ферментации, в которой циркулирует охлаждающая жидкость. Действительно, любое размножение микроорганизмов влечет за собой повышение температуры, которая может стать ингибитором размножения дрожжей. Классически температуру в ферментерах для предварительной ферментации поддерживают в диапазоне от 30°C до 35°C.

45

Для размножения дрожжей необходимо внесение кислорода, например, в форме сжатого воздуха.

Известно, что для содействия развитию дрожжей в питательную среду следует добавить:

50

- азот, который вносится в различных формах, таких как мочевины, аммиак, соли аммония,
- фосфор, который вносится в различных формах, таких как фосфорная кислота, фосфаты,
- серу, которая вносится в различных формах, таких как серная кислота, сульфаты,
- основные минералы.



По предыдущему способу в питательную среду также добавляют сусло, выходящее после этапа перехода в жидкую фазу, осахаривания или предварительного осахаривания. Это сусло вносит также ферментируемые сахара, но приводит к снижению общей эффективности спиртового брожения. Таким образом, существует  
5 потребность в способе производства дрожжей в аэробных условиях, которые могут быть использованы на этапе предварительной ферментации для приготовления дрожжей, которые затем помещаются в среду ферментации или в среду осахаривания-ферментации при способе спиртового сбраживания глюкозы в этанол, который бы  
10 ограничил это снижение эффективности.

По изобретению эта задача решается путем добавления в ферментеры для предварительной ферментации, по меньшей мере, часть осветленной барды, более конкретно,

15 барды, полученной на выходе этапа отделения, и/или концентрированной барды, полученной при осуществлении способа изготовления этанола из углеводного сырья, более конкретно крахмалистого сырья путем спиртового брожения и/или способа по изобретению.

Барда может быть получена в рамках способа изготовления этанола, включающего  
20 этап осахаривания-ферментации, и способа, в котором этапы осахаривания и ферментации полностью разделены.

Предпочтительно барда получается в рамках способа изготовления этанола по изобретению, в котором была введена питательная добавка по изобретению.

25 Так, изобретение также относится к такому способу изготовления этанола, как описано выше, в котором для этаноловой ферментации используются дрожжи, полученные таким способом, как описано выше, и в котором используется барда, полученная при осуществлении упомянутого способа изготовления этанола.

Особое преимущество имеет использование барды, полученной при осуществлении  
30 способа изготовления этанола по изобретению, в котором была введена питательная добавка по изобретению, для производства дрожжей в ферментерах для предварительной ферментации, поскольку это позволяет разъединить производство этанола дрожжами, с одной стороны, и рост дрожжевых клеток, с другой стороны. Действительно, барда, полученная при осуществлении способа изготовления этанола  
35 по изобретению, представляет собой питательную среду, позволяющую выращивать дрожжи до уровня, сопоставимого с повышенной нормой засева среды ферментации или осахаривания-ферментации, результатом чего является использование дрожжами ферментируемых Сахаров, присутствующих в среде ферментации или осахаривания-ферментации, главным образом для производства этанола, а не для роста дрожжевых  
40 клеток, как это было отмечено выше. Так, ферментируемые сахара из исходного углеводного субстрата в основном используются для производства этанола, а рост клеток в основном обеспечивается за счет неферментируемых Сахаров. Таким образом, общая эффективность производства этанола из исходного углеводного  
45 субстрата оказывается выше в сравнении со способами, в которых ферментируемые сахара используются дрожжами одновременно для производства этанола и для роста клеток.

Особый вариант осуществления такого способа описан на фигуре 2.

50 Предпочтительно питательная смесь для предварительной ферментации содержит барду и освобождена от промежуточных продуктов, полученных при осуществлении способа изготовления этанола из крахмалистого сырья путем спиртового брожения, более конкретно, барда не смешивается с суслом, полученным в ходе промежуточных

этапов способа изготовления этанола из крахмалистого сырья путем спиртового брожения.

По другому предпочтительному варианту питательная среда для предварительной ферментации состоит или включает жидкую смесь барды и сусла, и, в случае

необходимости, воды.  
По еще одному предпочтительному варианту питательная среда для предварительной ферментации состоит или включает смесь барды и питательной добавки по изобретению, более конкретно, ферментированных пшеничных отрубей и, в случае необходимости, воды.

Наконец, можно также приготовить питательную среду, составленную из или включающую вышеупомянутые элементы.

Питательная среда для предварительной ферментации по изобретению предпочтительно содержит такое количество сухих веществ, что перемешивание и/или аэрация среды является достаточной для поддержания оптимального производства этанола, например, от 15% до 20% сухих веществ.

Для способа приготовления дрожжей по изобретению питательной добавкой по изобретению могут быть ферментированные пшеничные отруби. Барда, полученная из среды ферментации или осахаривания-ферментации, представляет собой композицию и, более конкретно, некоторое количество Сахаров, которые могут быть использованы дрожжами, и эта композиция особенно благоприятна для развития дрожжей в ферментерах для предварительной ферментации. Среда предварительной ферментации может быть дополнена экзогенными питательными элементами, такими как глицерин или растворы глицерина, а также гидролизатами, полученными из сырой дробины. Это позволяет предпочтительно экономить глюкозу сусла по изобретению и, таким образом, ограничивать вышеупомянутое снижение эффективности.

Предпочтительно, по меньшей мере, часть барды используется повторно путем ее включения в питательную среду предварительной ферментации. Также предпочтительно повторно использовать барду после концентрации, чтобы ограничить разбавление питательной среды в ферментере предварительной ферментации.

Предпочтительно барда, присутствующая в питательной среде предварительной ферментации, полностью заменяет сусло, выходящее после этапа перехода в жидкую фазу, осахаривания или предварительного осахаривания. Но такая замена может быть только частичной.

Добавление питательной добавки по изобретению, более конкретно, ферментированных пшеничных отрубей, также позволяет улучшить предварительную ферментацию, в частности, путем обогащения питательной среды:

- азотом, вносимым в форме аминокислот,
- фосфором,
- серой,
- витаминами и основными минералами,
- протеинами.

Это добавление может осуществляться непосредственно в питательную среду предварительной ферментации, или после смешивания с суслом, выходящим после этапа перехода в жидкую фазу; эта смесь, после разведения в случае необходимости, добавляется в ферментер предварительной ферментации.

Использование дрожжей, предварительно ферментированных с бардой, полученной в ходе осуществления способа изготовления этанола по изобретению,

предпочтительно позволяет также значительно обогатить протеинами высушенную дробину, полученную в конце способа изготовления этанола по изобретению. Так, вышеупомянутая дробина может содержать более 40% протеинов и, предпочтительно, по меньшей мере, 50% протеинов в пересчете на сухое вещество.

Различная ферментативная активность, упоминаемая в описании и в формуле изобретения, измерялась с помощью следующих методов:

Глюкоамилазная активность.

Под действием препарата глюкоамилазы (ГА) на раствор растворимого крахмала происходит высвобождение редуцирующих Сахаров. При нагревании до 100°C в присутствии 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) эти композиции приобретают коричневый цвет, который определяется с помощью спектрофотометра (компании Kontron Instruments, Милан, Италия) при 540 нм.

Реакционная среда содержит:

- раствор крахмала: 1,5% в случае *Aspergillus niger* и 2% в случае *Aspergillus oryzae* 1000 мкл
- 0,1 М нитратный буфер с рН 4,5 900 мкл
- Раствор фермента 100 мкл

Реакция протекает в течение 20 мин. при 60°C в случае *Aspergillus niger* и в течение 5 мин. при 50°C в случае *Aspergillus oryzae*. Отбор проб реакционной среды в объеме 100 мкл проводится каждые 4 мин. в случае *Aspergillus niger* и каждую минуту в случае *Aspergillus oryzae*, пробы смешивают с 500 мкл ДНС и 400 мкл нитратного буфера с рН 4,5. Затем смесь нагревают в течение 5 мин. при 100°C, быстро охлаждают и проводят количественный анализ при 540 нм относительно контрольного образца: смеси 500 мкл ДНС и 500 мкл цитратного буфера с рН 4,5.

Условия количественного анализа были установлены после изучения влияния температуры и рН на активность препаратов ГА. В качестве субстрата при этом ферментативном гидролизе использовался растворимый крахмал Merck (Дармштадт, Германия). Раствор ДНС готовился в соответствии с процедурой, предложенной П. Бернфельдом в журнале Методы в энзимологии (Bernfeld, Methods in enzymology, 1, 149-158 (1955)), следующим образом:

- Растворить предварительно:

- 10 г 3,5-динитросалициловой кислоты в
- 200 мл 2М гидроокиси натрия о 200 мл дистиллированной воды
- Затем добавить:

- 300 г двойной калийно-натриевой соли винной кислоты

- После полного растворения долить полученный раствор дистиллированной водой до 1 л.

После приготовления этот реактив следует предохранять от воздействия света. Градуировочные кривые были составлены для глюкозы как для стандартного продукта для количественной оценки глюкоамилазной активности или для мониторинга реакций перехода в жидкую фазу - осахаривания, и для ксилозы для определения ксиланазной активности.

Одна единица глюкоамилазной активности (ЕГА) соответствует количеству фермента, необходимому для высвобождения одного микромоля редуцирующих концов в минуту в условиях дозированной подачи глюкозы в качестве эталона.

Глюкоамилазная активность, рассчитанная с помощью приведенной ниже формулы, пересчитывается на исходное количество сухих веществ (ИСВ):

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

где

- 5 - А соответствует активности ГА, выраженной в ЕГА/г ИСВ (мкмоль/мин·г ИСВ),
- Р соответствует скорости высвобождения эквивалентов глюкозы в мкмоль/мин,
- $V_{\text{enz}}$  представляет собой объем дозированно введенного раствора ферментов в мл,
- $V_{\text{ferm}}$  - это общий объем дистиллированной воды, использованный для
- 10 экстрагирования раствора ферментов, в мл,
- $M_{\text{ferm}}$  - масса, выраженная в г ИСВ, соответствует исходной массе сухого
- вещества, из которой был экстрагирован раствор ферментов.

Протеазная активность.

- Этот количественный анализ был разработан для азоказеина в соответствии с
- 15 методом Веинона (Veinon), описанном в публикации "Proteins Purification methods - a practical Approach", Harris E.L.V. и Angal, S (составители), IRL-Press, Oxford University Press, 1-66 (1989). При разложении этого субстрата протеазами высвобождаются
  - азотистые группы, которые поглощают свет в ультрафиолетовой части спектра
  - при 340 нм. Динамика коэффициента поглощения во время гидролиза этого протеина
  - 20 указывает на интенсивность реакции.

Реакционная среда содержит:

- раствор азоказеина 1%, рН 5,0 1000 мкл
- Раствор фермента 200 мкл
- 25 Азоказеин (компания Сигма (Sigma), Сен-Луис, США) растворяют в ацетатном
- буфере 0,1 мол/л, рН 5,0. Протеазную активность количественно оценивают при этом
- уровне рН, поскольку азоказеин нерастворим в ацетатном буфере при более низком
- значении рН. Ферментативная реакция проводится при 60°C. Отбор проб выполняется
- каждые 5 мин. в течение 20 мин.; чтобы остановить реакцию, пробы смешиваются с 5%
- 30 трихлоруксусной кислотой (ТХУК).

- Одна единица протеазной активности (ЕПА) соответствует количеству фермента,
- необходимому для увеличения  $A_{340}$  нм; генерируемой при высвобождении азотистых
- групп на 0,01 единицы в мин. в условиях, описанных выше. Эта активность,
- 35 рассчитанная с помощью приведенной ниже формулы, пересчитывается на исходное
  - количество сухих веществ (ЕПА/г ИСВ) или на глюкоамилазную активность
  - (ЕПА/ЕГА):

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

где

- А соответствует протеазной активности, выраженной в ЕПА/г ИСВ,
- Р соответствует скорости высвобождения азотистых групп, выраженной в
- увеличении  $A_{340}$  нм на 0,01 единицы в мин,
- 45 -  $V_{\text{enz}}$  представляет собой объем дозированно введенного раствора ферментов в мл,
- $V_{\text{ferm}}$  - это общий объем дистиллированной воды, использованный для
- экстрагирования раствора ферментов, в мл,
- $M_{\text{ferm}}$  - масса, выраженная в г ИСВ, соответствует исходной массе сухих веществ,
- 50 из которой был экстрагирован раствор ферментов.

Ксиланазная активность

Для выявления этой ферментативной активности препаратами ГА воздействуют на

раствор растворимого ксилана и замеряют количество высвободившихся

редуцирующих сахаров с помощью метода с применением ДНС.

Реакционная среда содержит:

- раствор ксилана 2%, рН 4,5 1900 мкл
- Раствор фермента 100 мкл

5 Готовят раствор ксилана из листовницы (Сигма, 1%) в 0,1 М цитратном буфере с рН 4,5. Реакция протекает при 60°C в случае *Aspergillus niger* и при 50°C в случае *Aspergillus oryzae*. Отбор проб реакционной среды в объеме 200 мкл проводится каждые 2 мин. в течение 10 мин., пробы смешивают с 500 мкл ДНС и 300 мкл  
10 нитратного буфера с рН 4,5. Затем смесь нагревают в течение 5 мин. при 100°C, быстро охлаждают и проводят количественный анализ при 540 им относительно контрольного образца: смеси 500 мкл ДНС и 500 мкл цитратного буфера с рН 4,5.

Одна единица ксиланазной активности (ЕКА) соответствует количеству фермента, необходимому для высвобождения одного микромоля редуцирующих концов в  
15 минуту. Эта активность пересчитывается на исходное количество сухих веществ (ЕКА/г ИСВ) или на глюкоамилазную активность (ЕКА/ЕГА). Для расчета этой активности мы взяли формулу, выведенную для расчета ГА, в которой:

- А - соответствует ксиланазной активности, выраженной в ЕКА/г ИСВ  
20 (мкмоль/мин. г ИСВ),
- Р - соответствует скорости высвобождения эквивалентов ксилозы в мкмоль/ мин.,
- Другие компоненты формулы не были изменены.

Следующие неограничивающие опыты приведены для иллюстрации изобретения, в частности преимущества, которое обеспечивается за счет использования  
25 ферментированных пшеничных отрубей по изобретению в случае осуществления способа одновременного осахаривания-ферментации.

Пример 1: Эффект дополнительного внесения азота

Провели сравнительное изучение количества этанола, полученного во время этапа  
30 осахаривания-ферментации, при введении коммерческого ферментного препарата (Spirizyme® Fuel), или того же ферментного препарата с неограниченным добавлением азота, или питательной добавки по изобретению.

В этих опытах исследователи приготовили 750 г суслу из пшеничной муки с содержанием сухих вещества 32% в перемешиваемом реакторе вместимостью 1 л.  
35 После 2 часов перехода в жидкую фазу при 85°C и рН 5,5 сусло налили в 3 эрленмейеровские колбы объемом 0,5 л, в каждую из которых поместили 200 г суслу и создали одинаковые условия для глюкоамилазной активности следующим образом:

- Колба 1: Spirizyme® Fuel (раствор очищенной глюкоамилазы, Novozymes);
- 40 - Колба 2: Spirizyme® Fuel и азотная добавка, а именно вторичный кислый фосфат и кислый сульфат аммония: 3 г/л каждого вещества;
- Колба 3: пшеничные отруби, ферментированные штаммом *Aspergillus niger* ATCC 76061 по способу, описанному в US 2002037342.

Во всех трех колбах исходное значение рН было откорректировано на уровне 4,5,  
45 температура 32°C.

Введение азотистых веществ в колбу 2 привело к подщелачиванию рН до уровня 6,2, что потребовало дополнительного добавления концентрированной соляной кислоты для снижения исходного уровня рН суслу до 4,5 для проведения  
50 осахаривания-ферментации. Колбы с суслем были засеяны дрожжами из расчета 10<sup>7</sup> КОЕ на мл суслу. В примерах использовались дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

После полного ферментативного гидролиза крахмала максимальное теоретически возможное содержание глюкозы в сусле составляет 303 г/л.

Как показано в таблице 1, максимальный выход этанола был получен при добавлении ферментированных пшеничных отрубей за 72 часа.

Использование Spirizyme® Fuel даже с азотной добавкой позволяет получить максимум 59% этанола за 96 часов. При отсутствии дополнительного внесения азота производство этанола очень невелико, и нами было отмечено повышенное содержание глюкозы.

Продолжит. ООФ (ч)	Произв. этанол/окончат. кол-во этанола с фермент. отрубями (%)			Произв. глюкоза/окончат. кол-во глюкозы с фермент. отрубями (%)		
	Spirizyme	Spirizyme + N	Фермент. отруби	Spirizyme	Spirizyme + N	Фермент. отруби
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	12,1	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	53,5	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

Таким образом, использование пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами, при производстве этанола из пшеницы дает существенное преимущество, даже при температуре в ферментере при одновременном осахаривании-ферментации. Сравнение со Spirizyme Fuel указывает, что неограниченное добавление азота только частично объясняет увеличение эффективности процесса.

Эти опыты показывают адекватность использования ферментированных пшеничных отрубей для производства этанола способом одновременного осахаривания-ферментации.

Пример 2: Буферное действие питательной добавки по изобретению

Этот пример иллюстрирует преимущества использования питательной добавки по изобретению для создания благоприятных условий для осахаривания-спиртовой ферментации. Более конкретно, этот пример относится к буферному действию питательной добавки по изобретению на среду осахаривания-ферментации.

В этих опытах исследователи приготовили 750 г сусла из пшеничной муки с содержанием сухих вещества 32% в реакторе вместимостью 1 л с устройствами для перемешивания. После 1 часа 30 мин. перехода в жидкую фазу при 85°C и pH 5,5 в условиях перемешивания сусло налили в 2 эрленмейеровские колбы объемом 250 мл, в каждую из которых поместили 100 г жидкого сусла с содержанием сухих веществ 32% и 40 г стерильной воды для получения сусла с содержанием сухих веществ 23%. После этого в каждую колбу с суслем добавили:

- Колба 1: 0,5 г пшеничных отрубей, ферментированных штаммом *Aspergillus niger* ATCC 76061 по способу, описанному в US 2002037342;

- Колба 2: 16,7 мкл Spirizyme® Fuel (раствор очищенной глюкоамилазы, Novozymes).

В обеих колбах исходное значение pH сусла было откорректировано на уровне 4. Сусло было засеяно дрожжами Ethanol Red® (Lesaffre) из расчета 5-10 КОЕ на мл сусла.

В колбу 2 был добавлен экзогенный азот в форме аммиака из расчета 1 г азота на

кг пшеницы.

В течение всего опыта сусло выдерживалось при температуре 30° в условиях встряхивания при 100 об/мин.

Желаемая концентрация этанола составляет 87 г этанола на литр сусла (11% по объему), что соответствует степени конверсии крахмала в этанол 81%.

В таблице 2 приведена динамика концентрации этанола в сусле и рН сусла в зависимости от продолжительности осахаривания-ферментации.

Так же, как и таблица 1, таблица 2 иллюстрирует то, что использование питательной добавки по изобретению в среде осахаривания-ферментации позволяет получить более высокую концентрацию этанола за более короткое время, чем использование традиционных ферментов, несмотря на внесение экзогенного азота.

Кроме того, таблица 2 показывает, что внесение аммиака в колбу 2 приводит к снижению рН до уровня около 2,8.

Для получения лучшей производительности по этанолу важно, чтобы показатель рН сусла оставался на уровне от 3,5 до 5. Действительно, при проведении процесса осахаривания-ферментации примерно при 30°C, чрезмерно высоком уровне рН, более конкретно, при рН выше 5, увеличивается риск загрязнения сусла. При слишком низком уровне рН, более конкретно, ниже 3,5 происходит снижение эффективности спиртового брожения.

Использование ферментного препарата, к которому добавлен источник экзогенного азота, в среде осахаривания-ферментации требует устройства для регулировки рН, позволяющего поддерживать уровень рН в пределах от 3,5 до 4,5.

Питательная добавка по изобретению обладает буферным действием на рН сусла при осахаривании-ферментации и, следовательно, предпочтительно позволяет отказаться от устройства, регулирующего рН.

Продолжит. ООФ (ч)	Концентрация этанола (г/л)		рН	
	Фермент. отруби	Spirizyme + NH <sub>3</sub>	Фермент. отруби	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

### Пример 3: Биостимуляция

Этот пример выявляет биостимулирующий эффект питательной добавки по изобретению. Опыты в этом примере иллюстрируют то, что добавление азота и эффект стабилизации рН сусла на уровне около 4 только частично объясняют повышение эффективности дрожжей при производстве этанола при их введении в среду осахаривания-ферментации.

В этих опытах исследователи приготовили сусло из пшеничной муки с содержанием сухих веществ 32%. После 1 часа 30 мин. разжижения при 85°C и рН 5,5 в условиях перемешивания при 250 об/мин, сусло налили в 2 биореактора объемом 4 л. В каждом реакторе находилось 1,7 кг сусла с содержанием сухих веществ 29,8%. Сусло, полученное в каждом биореакторе, было приготовлено путем смешивания сусла с содержанием сухих веществ 32%, образовавшегося после перехода в жидкую фазу, и барды с содержанием сухих веществ 27%.

Для разведения сусла использовалась барда, полученная на выходе при реализации

способа спиртового брожения пшеницы.

В 1,7 кг суслу с содержанием сухих веществ 29,8% было внесено следующее:

- Биореактор 1: 199 мкл Spirizyme® Fuel (раствор очищенной глюкоамилазы, Novozymes) и 59 мкл Viscozym Wheat® (Novozymes) (фермент, снижающий вязкость);)

- Биореактор 2: 5,7 г пшеничных отрубей, ферментированных штаммом *Aspergillus niger* ATCC 76061 по способу, описанному в US 2002037342;

В обоих биореакторах исходное значение pH суслу было откорректировано на уровне 4,1, температура на уровне 30°, затем сусло было подвергнуто встряхиванию при 100 об/мин.

Сусло было засеяно дрожжами из расчета  $5 \cdot 10^6$  КОЕ на мл суслу (Ethanol Red®, Lesaffre).

Экзогенный азот добавляли в биореактор 1 порционно в форме аммиака таким образом, чтобы его содержание составило 1 г азота на кг пшеницы.

Барда, полученная из суслу ферментированных зерновых, содержит некоторое количество волокон. При их смешивании с суслom достигается буферное действие на pH суслу.

Требуемая концентрация этанола составляет 87 г этанола на литр суслу, что соответствует степени конверсии крахмала в этанол 81%.

В таблице 3 приведена динамика концентрации этанола в сусле и pH суслу в зависимости от продолжительности осахаривания-ферментации.

Порционное внесение экзогенного азота, а также использование барды позволяет стабилизировать pH в биореакторе 1 на уровне около 4.

Как видно из таблицы 3, желаемая концентрация этанола почти достигается за 28 часов в биореакторе с питательной добавкой по изобретению, тогда как для достижения эквивалентной концентрации в биореакторе с ферментным препаратом требуется 44 часа. Кроме того, после 68 часов концентрация этанола в биореакторе с питательной добавкой по изобретению остается более высокой, чем в биореакторе с ферментным препаратом.

Таблица 3 иллюстрирует существенное преимущество использования питательной добавки по изобретению по сравнению с классическими ферментными препаратами. Результаты этих опытов указывают, что дополнительное внесение азота и контроль pH лишь частично объясняют эффективность питательной добавки по изобретению.

Эти опыты выявляют эффект биостимуляции дрожжей, связанный с составом питательной добавки по изобретению.

Продолжит. ООФ (ч)	Концентрация этанола (г/л)		pH	
	Фермент. отруби	Spirizyme + NH <sub>3</sub> + VW	Фермент. отруби	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

#### Пример 4: Аэробная ферментация барды

Изобретатели провели сравнительное изучение динамики концентрации дрожжей в среде предварительной ферментации в зависимости от содержания сухих веществ в



вышеупомянутой среде.

Эти опыты проводились на 100 г среды предварительной ферментации, помещенной в колбы с перегородками объемом 250 мл. Среда предварительной ферментации выдерживали в термостате при 30 °С, встряхивали при 130 об/мин и засеивали дрожжами из расчета  $2,5 \cdot 10^7$  на мл среды (Ethanol Red®). Исходный уровень рН сред составлял от 4,2 до 4,4.

Каждая среда предварительной ферментации имела следующий состав в массовых процентах:

- Колба 1: 1,2% барды с содержанием сухих веществ 28% и около 98,8% воды;
- Колба 2: 10% барды с содержанием сухих веществ 28% и около 90% воды;
- Колба 3: 20% барды с содержанием сухих веществ 28% и около 80% воды;
- Колба 4: 40% барды с содержанием сухих веществ 28% и около 60% воды;
- Колба 5: контрольная среда (глюкоза и экстракт дрожжей). Колбы встряхивали

для обогащения среды кислородом и создания благоприятных условия для размножения дрожжей.

Изобретатели определяли изменение концентрации дрожжей в каждой среде предварительной ферментации.

Состав сред и динамика концентрации дрожжей обобщены в таблице 4 ниже:

Таблица 4					
Продолжительность культуры (ч)	Количество (дрожжей/мл)				
	1,2% барды	10% барды	20% барды	40% барды	Контроль
0	$2,50 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^7$
5	$3,30 \cdot 10^7$	$4,90 \cdot 10^7$	$1,54 \cdot 10^8$	$4,15 \cdot 10^8$	$4,90 \cdot 10^7$
7	$3,00 \cdot 10^7$	$2,50 \cdot 10^8$	$3,10 \cdot 10^8$	$4,50 \cdot 10^8$	$6,00 \cdot 10^7$
24	$3,30 \cdot 10^7$	$1,90 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^8$	$5,50 \cdot 10^8$	$2,00 \cdot 10^8$

Как видно из таблицы 4, среда предварительной ферментации, состоящая на 40 масс.% из барды с содержанием сухих веществ 28 масс.%, следовательно, среда, содержащая 11,2 масс.% сухих веществ, позволяет за 5 часов в 16,6 раз увеличить количество дрожжей. Для сравнения, коэффициент увеличения за тот же период в контрольной среде составил около 2.

После 24 часов культивирования в аэробных условиях концентрация дрожжей в среде, на 40 масс.% состоящей из барды, более чем в 2,5 раза превысила концентрацию дрожжей в контрольной среде.

Без привязки к теории изобретатели объясняют эти результаты присутствием в сухих веществах барды источников углерода, отличных от глюкозы, которые ассимилируются дрожжами. Изобретатели показали, что сухие вещества барды содержат около 10% ферментируемых Сахаров, в основном в форме глюкозы или остаточного крахмала. Исходная концентрация дрожжей соответствует примерно 0,62 г дрожжей на литр среды, а окончательная концентрация соответствует примерно 13,8 г дрожжей на литр среды. Таким образом, в среде образовалось около 13,2 г дрожжей на литр среды, что соответствует потреблению примерно 26,4 г глюкозы. Однако исходная концентрация глюкозы в колбе №4 составляет около 11,2 г на литр среды. Таким образом, количество полученных дрожжей связано с источником углерода, отличным от глюкозы, например, с присутствием глицерина в барде.

Разумеется, настоящее изобретение не ограничивается описанными и представленными способами осуществления, которые приведены в качестве иллюстрирующих и не ограничивающих примеров.

## Формула изобретения

1. Применение питательной добавки, полученной из пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами, активным началом которой являются, по меньшей мере, один фермент и смесь питательных ингредиентов для дрожжей: эргостерол, N-ацетилглюкозамин, витамины, нуклеиновые кислоты и аминокислоты, на стадии одновременного осахаривания-ферментации для сокращения времени этой стадии, увеличения роста и эффективности дрожжей при производстве этанола из крахмалистого сырья.
2. Применение по п.1, где питательную добавку вводят на указанной стадии из расчета 4-60 кг сухих веществ на 1 т крахмала.
3. Применение по п.1, где питательную добавку вводят в твердом или жидком виде.
4. Применение по п.1, где питательная добавка обладает следующей ферментативной активностью:
- по меньшей мере, 500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ,
  - по меньшей мере, 100 единиц протеолитической активности на грамм сухих веществ,
  - по меньшей мере, 100 единиц ксиланазной активности на грамм сухих веществ, и получена ферментацией пшеничных отрубей плесневыми грибами, выбранными из числа штаммов *Aspergillus niger* ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 или из числа штаммов *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 и ATCC 42149.
5. Применение по любому из пп.1-4, где питательная добавка получена с помощью способа, включающего следующие этапы:
- i) обеспечения пшеничных отрубей,
  - ii) увлажнение их, подкисление до уровня pH от 4 до 5 и температурная обработка отрубей таким образом, чтобы пастеризовать или стерилизовать их,
  - iii) засев полученных пшеничных отрубей штаммом *Aspergillus niger*, выбранным из числа штаммов ATCC 201202, ATCC 76060, ATCC 76061, MUCL 28815, MUCL 28816, NRRL 3112 или штаммом *Aspergillus oryzae*, выбранным из числа штаммов ATCC 22788 и ATCC 42149,
  - iv) ферментация пшеничных отрубей в твердом состоянии в ферментере с периодическим перемешиванием при температуре от 28° до 38° при влажности от 45% до 65% по массе в условиях аэрации, достаточной для предотвращения постоянного накопления углекислого газа в толще пшеничных отрубей до того момента, когда продукт ферментации будет иметь следующие минимальные значения ферментативной активности:
- глюкоамилазная: по меньшей мере, 500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ и, при случае,
  - протеолитическая: по меньшей мере, 100 единиц протеолитической активности на грамм сухих веществ,
  - ксиланазная: по меньшей мере, 100 единиц ксиланазной активности на грамм сухих веществ.
6. Применение по п.4, где термообработку на стадии ii) предпочтительно проводят после увлажнения.
7. Применение по п.1 или 4, где глюкоамилазная активность питательной добавки составляет, по меньшей мере, 750 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ.

8. Применение по п.1 или 4, где глюкоамилазная активность питательной добавки составляет, по меньшей мере, 1500 единиц глюкоамилазной активности на грамм сухих веществ.

9. Применение по п.1, где витамины в питательной добавке относятся к витаминам группы В.

10. Применение по п.1, где в питательной добавке одна или несколько аминокислот являются: аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, валин, лейцин, глутаминовая кислота.

11. Способ производства этанола из углеводного материала, который является крахмалистым сырьем, включающий:

а) после стадии перехода крахмала в жидкую фазу и необязательно стадии предварительного осахаривания стадию одновременного осахаривания и ферментации в среде осахаривания-ферментации, содержание глюкозы в которой в начале стадии одновременного осахаривания и ферментации составляет не более 95% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству крахмала в упомянутом крахмалистом сырье, причем в среде осахаривания-ферментации присутствуют дрожжи в качестве агента спиртовой ферментации;

и на этой стадии среду осахаривания-ферментации вводят питательную добавку, полученную из пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами, активным началом которой являются, по меньшей мере, один фермент и смесь питательных ингредиентов для дрожжей: эргостерол, N-ацетилглюкозамин, витамины, нуклеиновые кислоты и аминокислоты,

б) стадию сбора этанола, полученного на стадии а).

12. Способ по п.11, в котором содержание глюкозы в среде в начале стадии одновременного осахаривания-ферментации составляет не более 3% эквивалента глюкозы, соответствующего количеству крахмала в вышеупомянутом крахмалистом сырье.

13. Способ по п.11, где питательную добавку вводят на указанной стадии из расчета 4-60 кг сухих веществ на 1 т крахмала.

14. Способ по п.11, в котором стадию одновременного осахаривания-ферментации полностью проводят без подачи воздуха или кислорода.

15. Способ по п.11, в котором стадия одновременного осахаривания-ферментации включает начальную аэробную фазу.

16. Способ по п.11, в котором этап осахаривания-ферментации проводят в следующих условиях:

- температура: от 30°C до 35°C,

- рН: доводят в начале стадии одновременного осахаривания-ферментации до уровня примерно от 3,5 до 5,

- инокулят дрожжей: примерно от  $10^6$  до  $5 \cdot 10^8$  КОЕ дрожжей на мл среды осахаривания-ферментации,

- содержание сухих веществ: от 20% до 35%,

- время взаимодействия: от 20 до 72 ч.

17. Способ по п.11, дополнительно включающий конечную стадию разделения и выхода сухой барды/дробины и жидкой барды.

18. Способ по п.17, в котором для спиртового брожения используют дрожжи, которые получены путем производства дрожжей в аэробных условиях в ферментере предварительной ферментации, причем их добавляют в указанный ферментер предварительной ферментации с осветленной жидкой бардой и/или

концентрированной бардой, полученной при осуществлении способа производства этанола путем спиртового брожения углеводного сырья, в котором была введена питательная добавка, упомянутая в любом из пп.1-10, и в котором использована жидкая барда, полученная в процессе производства этанола.

5 19. Применение питательной добавки, полученной из пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами, активным началом которой являются, по меньшей мере, один фермент и смесь питательных ингредиентов для дрожжей: эргостерол, N-ацетилглюкозамин, витамины, нуклеиновые кислоты и аминокислоты,  
10 для активации спиртового брожения или предварительной ферментации, предназначенной для приготовления дрожжей.

20. Способ производства дрожжей в аэробных условиях в ферментере предварительной ферментации, отличающийся тем, что в упомянутый ферментер предварительной ферментации добавляют осветленную барду и/или  
15 концентрированную барду, полученную при осуществлении способа производства этанола путем спиртового брожения из крахмалистого сырья, в котором вводят питательную добавку, полученную из пшеничных отрубей, ферментированных плесневыми грибами, активным началом которой являются, по меньшей мере, один  
20 фермент и смесь питательных ингредиентов для дрожжей: эргостерол, N-ацетилглюкозамин, витамины, нуклеиновые кислоты и аминокислоты.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что жидкую барду получают в процессе при осуществлении способа по п.17 или 19.

25

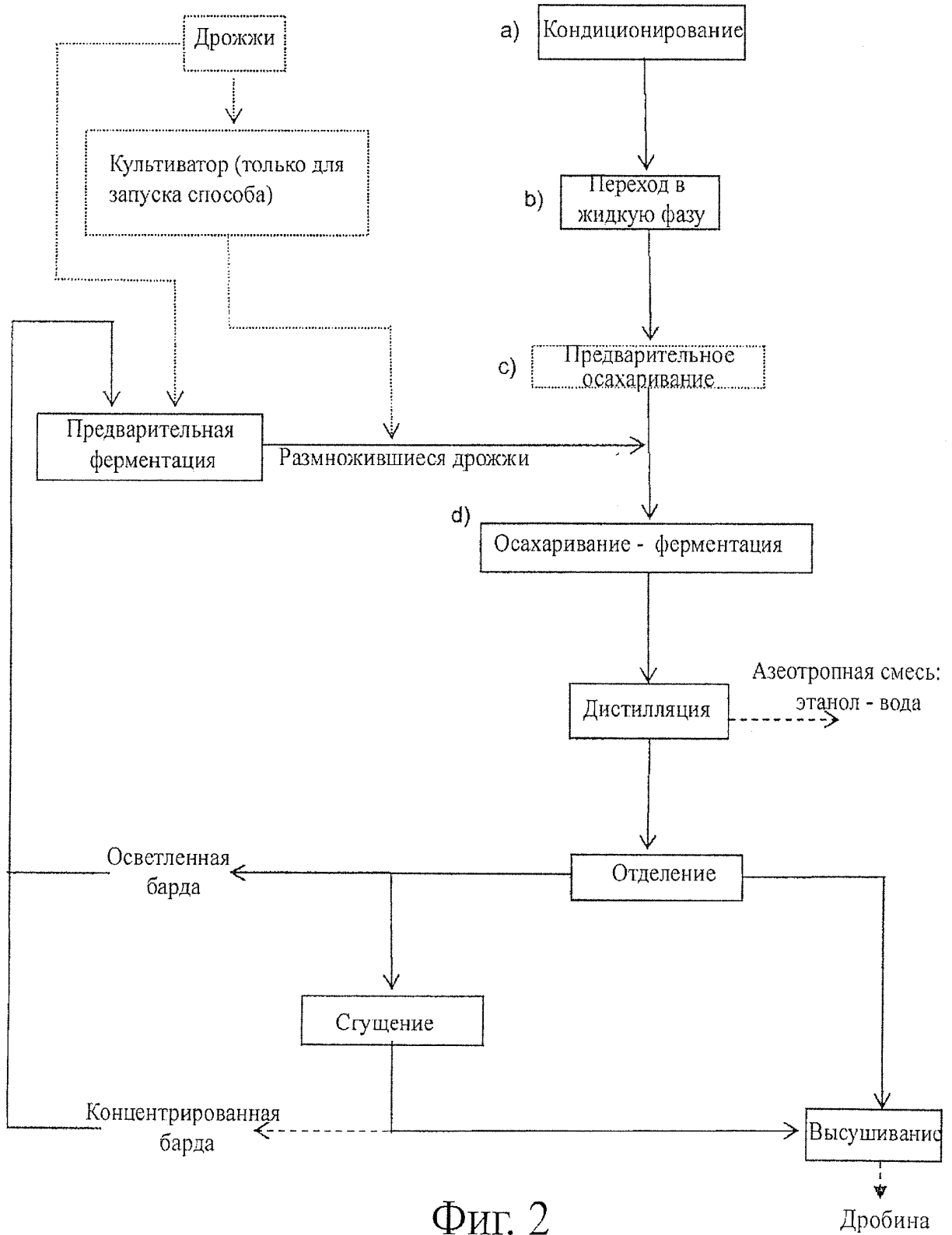
30

35

40

45

50



Фиг. 2