

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

—  
PARIS  
—

⑪ N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

**2 496 121**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

**N° 81 23504**

---

⑮ Procédé de production d'alcool par fermentation sans cuisson.

⑯ Classification internationale (Int. Cl.<sup>3</sup>). C 12 P 7/06 // C 12 R 1/845.

⑰ Date de dépôt..... 16 décembre 1981.

⑱ ⑳ ㉑ Priorité revendiquée : Japon, 16 décembre 1980, n° 178 523/80; 7 mai 1981, n° 68 974/81;  
28 mai 1981, n° 82 217/81; 1<sup>er</sup> juin 1981, n° 84 823/81.

㉒ Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 24 du 18-6-1982.

---

㉓ Déposant : SUNTORY LIMITED, résidant au Japon.

㉔ Invention de : Hajime Yoshizumi, Nobuya Matsumoto, Osamu Fukuda et Osamu Fukushi.

㉕ Titulaire : *Idem* ㉓

㉖ Mandataire : Robert Bloch, conseil en brevets d'invention,  
39, av. de Friedland, 75008 Paris.

La présente invention concerne un procédé de production d'alcool par fermentation sans cuisson.

Plus particulièrement l'invention concerne un procédé pour produire de l'alcool par saccharification et fermentation d'une matière amylacée sans cuisson.

Il est habituel de cuire un moût constitué d'une suspension d'une matière amylacée broyée à une température élevée telle que 150°C. (Industrial Fermentation Vol. 1, publié par L.A. Underkofler et R.J. Hickey, Chemical Publishing Co., Inc., 1954, p. 17, Trans Am. Inst. Chem. Eng., 40, 421 (1944), Food Can., 29, 23 (1969)). Cette cuisson a pour objet de décomposer la structure de la matière première concassée pour en éluer l'amidon et éviter ainsi une élévation de la viscosité due à une gélatinisation après l'élution, favoriser les actions des enzymes liquéfiantes et saccharifiantes et de plus tuer les micro-organismes nuisibles à la saccharification et à la fermentation. Cependant après la cuisson, on doit refroidir le moût à la température de fermentation qui est d'environ 25 à 35°C et l'énergie que nécessite le refroidissement est importante. Donc la consommation totale d'énergie, y compris l'énergie dépensée pour la cuisson, est énorme dans le procédé classique de cuisson à température élevée.

Ces dernières années, les difficultés provoquées par l'accroissement du coût du pétrole ont suscité de nombreux travaux de recherche pour la mise au point de nouvelles sources d'énergie. En particulier on s'est beaucoup intéressé à l'éthanol qui peut être produit de façon renouvelable à partir de la biomasse formée sous l'effet de l'énergie solaire, car on peut envisager de remplacer par de l'éthanol les combustibles dérivant du pétrole.

Certains des présents inventeurs ont précédemment mis au point un procédé économisant l'énergie pour produire de l'alcool qui comprend une cuisson à une température de 75 à 85°C (brevet US N° 4 092 434 et brevet GB n° 1 503 760).

On connaît d'autre part les procédés de brassage du saké japonais et de production d'alcool sans cuisson. (I. J.

Ferm. Ass. Japan 10, 319 (1952), 2. J. Ferm. Ass. Japan 21; 83 (1963), 3. J. Ferment. Technol. 58 237 (1980), 4. J. Brew. Soc. Japan 75, 858 (1980), 5. Abstract of Papers, Annual Meeting of the Society of Fermentation Technology of Japan, Osaka, nov. 1980 P4). Cependant ces techniques nécessitent  
5 des opérations particulières telles qu'une acidification du moût (pH 3,5), qui empêche la contamination par les micro-organismes nuisibles (1, 2, 3, 4 précités). De plus les techniques antérieures nécessitent une période de sacchari-  
10 fication et de fermentation plus longue (1, 2, 4, 5 précités) ou des stades opératoires complexes tels qu'une dialyse du bouillon fermenté (3, 4 précités) et sont difficilement utilisables dans l'industrie.

Les inventeurs ont de plus étudié le procédé du brevet  
15 US n° 4 092 434 et du brevet GB n° 1 503 760 précités et ont découvert un nouveau procédé économisant l'énergie pour produire de l'alcool à partir de matières amylacées ne nécessitant pas de stades de cuisson. L'invention concerne un procédé pour produire de l'alcool qui consiste à mélanger une  
20 matière amylacée broyée avec une liqueur de trempage dans des proportions telles que le rapport pondéral du liquide de trempage à la matière amylacée broyée soit compris entre 1,8 et 3,4 pour former une suspension, sans cuire la suspension et sans ajuster le pH de la suspension, à ajouter  
25 à la suspension une préparation enzymatique saccharifiante dérivant d'une source de micro-organismes, ou du malt, ou les deux, comme agent saccharifiant à raison d'au moins 3,5 unités saccharifiantes par gramme de matière brute, en valeurs humides (l'activité saccharifiante étant déterminée  
30 selon la norme japonaise JIS K-7001) lorsqu'on utilise l'enzyme ou le mélange d'enzyme et de malt ou d'au moins 10 unités saccharifiantes lorsqu'on utilise uniquement le malt, à mélanger de plus une levure de fermentation alcoolique puis à faire fermenter la suspension.

35 L'invention va maintenant être décrite de façon détaillée.

Dans le procédé industriel classique, le rapport pondéral de la matière première au liquide de trempage est

compris entre 1/4,3 et 1/2,8 tandis que dans le procédé de l'invention la concentration de la matière première dans la suspension est relativement élevée. De plus il est favorable que dans le stade initial on effectue la fermentation en maintenant la concentration en levure à environ  $2 \times 10^7$  cellules/ml de moût. Dans le procédé classique, la concentration finale de l'alcool obtenu dans le moût est d'environ 11 %, tandis qu'elle est d'environ 15 % dans le procédé de l'invention.

Le procédé de l'invention repose sur la découverte surprenante qu'en adoptant une concentration relativement élevée du moût, on peut obtenir un rendement de fermentation relativement élevé et une concentration finale en alcool dans le moût supérieure d'environ 40 % à celle du procédé classique, sans cuisson et sans ajustement particulier du pH.

On entend ici par "sans cuisson" l'absence de traitement thermique accroissant la viscosité de la suspension de matière amylacée. En d'autres termes, la suspension de matière première n'est pas traitée à une température à laquelle l'amidon est transformé en  $\alpha$ -amidon ou gélatinisé. La température à laquelle la viscosité commence à s'accroître varie selon les matières premières et leurs concentrations. Le tableau 1 montre la relation entre la concentration initiale d'une matière première et la température à laquelle la viscosité commence à s'accroître déterminée pour des grains complets de maïs broyés et de l'amidon de maïs au moyen d'un amylographe de HAAKE. Inc. Ainsi par exemple lorsque le rapport pondéral des grains complets de maïs broyés à l'eau de trempage est de 1/1,8, on doit préparer la suspension à une température inférieure à 55,8°C pour qu'il n'y ait pas d'accroissement de la viscosité dû à la gélatinisation et lorsque le rapport pondéral de l'amidon de maïs à l'eau de trempage est de 1/3,4, on doit préparer la suspension à une température inférieure à 66,5°C. (Voir tableau 1 page 15).

Dans un système sans cuisson, la contamination par des micro-organismes indésirables est susceptible de réduire le rendement de la fermentation ou de l'arrêter. Cependant selon

l'invention, la concentration des sucres fermentables dans le moût est suffisante pour permettre la fermentation par les levures mais non excessive. Il semble que cette faible concentration en sucres du moût ne gêne pas la réaction de  
5 saccharification par inhibition par rétroaction.

Par conséquent, le procédé de l'invention ne crée pas des conditions appropriées au développement des micro-organismes indésirables tels que les bactéries susceptibles de provoquer des altérations, par suite du manque de sucres  
10 assimilables comme source de carbone pour le développement des bactéries et par conséquent il n'y a pratiquement pas de tendance à la contamination par les micro-organismes indésirables.

De plus, le procédé de l'invention permet d'économiser l'énergie de cuisson et il est avantageux en ce qui concerne  
15 l'équilibre énergétique par rapport aux procédés classiques de production d'alcools combustibles à partir de matières amylacées.

Un autre avantage est que les matières solides du moût après fermentation n'ont pas subi de modification thermique et sont faciles à séparer selon une opération simple de filtration ou de décantation.

Le procédé de l'invention est décrit en détail ci-après.

#### Préparation de la matière première

25 Des exemples de matières premières amylacées utiles dans l'invention comprennent des céréales telles que le maïs, le sorgho, l'orge, le blé, le riz, le panic millet, le millet à grappes et le millet commun, des racines cultivées telles que la patate douce et le manioc, et des amidons bruts  
30 séparés à partir de ces matières.

La matière première brute peut être un mélange de telles matières. On utilise les céréales sous forme de grains complets broyés ou de produits broyés des grains complets dont on a séparé le germe. On utilise les racines amylacées sous  
35 forme de produits broyés obtenus, soit à partir des matières amylacées brutes, soit à partir des matières amylacées séchées. Le diamètre des particules des matières premières doit être aussi petit que possible. Généralement il suffit qu'au moins

30 % de la matière amylacée soient en particules ne dépassant pas 840  $\mu\text{m}$ .

#### Préparation de la suspension

On mélange la matière première broyée avec le liquide de trempage dans un rapport pondéral (matière première broyée/  
5 liquide de trempage) en valeur humide de 1/3,4 à 1/1,8 pour former une suspension. Le liquide de trempage peut être de l'eau ou un mélange d'eau et d'un résidu de distillation du moût connu sous le nom de vinasse ou de la vinasse seule.

Si la concentration de la matière première dans la sus-  
10 pension est inférieure à la limite précitée (1/3,4), la fermentation ne s'effectue pas de façon régulière. Si elle est supérieure à la limite précitée (1/1,8) le rendement de la saccharification et le rendement de la fermentation diminuent. Il est essentiel que la concentration de la matière première  
15 dans la suspension soit comprise dans la gamme précitée.

L'emploi d'une vinasse résultant de la distillation de l'alcool du moût après fermentation, en combinaison avec de l'eau, est préférée car on peut utiliser les sucres, l'azote, le phosphore et d'autres substances nutritives demeurant dans  
20 la vinasse et l'emploi de vinasse accroît le tamponnage.

La vinasse peut être obtenue par distillation de l'alcool du moût fermenté, par distillation ordinaire à chaud, ou obtenue par élimination des solides bruts d'une telle vinasse. On préfère ce dernier type de vinasse.

L'emploi de vinasse avec l'eau a été précédemment réa-  
25 lisé mais dans l'art antérieur la quantité de vinasse ne dépasse pas 50 % de la quantité totale de liquide de trempage.

On sait que le résidu de fermentation qui demeure après la distillation de l'alcool par distillation sous vide est  
30 utilisé directement comme matière première dans le cycle suivant de fermentation alcoolique (brevet japonais publié non examiné n° 15691/1981). Cependant ce procédé nécessite une opération particulière, et n'est pas très facile à mettre en pratique.

Comme le procédé de l'invention n'utilise pas de système de cuisson, la viscosité de la suspension est faible. Donc l'emploi d'une proportion accrue de vinasse ne réduit pas l'efficacité du transport du moût. Par suite de ces

avantages on peut utiliser dans le procédé de l'invention un liquide de trempage contenant 50 à 100 % de vinasse au lieu d'eau.

5 L'emploi d'une telle quantité importante de vinasse facilite l'activation de la levure en particulier dans le stade primitif de la fermentation, favorise une fermentation énergique et conduit à de bons résultats de fermentation. L'agent de saccharification ajouté à la suspension est une  
10 préparation enzymatique saccharifiante dérivant d'une source de micro-organismes, du malt ou les deux. La quantité de préparation d'enzyme saccharifiante est d'au moins 3,5 unités enzymatiques/g de matière première, en valeur humide. Lorsqu'on utilise du malt, sa quantité est comprise dans celle de la matière première. De plus lorsqu'on utilise le  
15 malt comme seul agent saccharifiant, il est nécessaire que la quantité de malt soit au moins équivalente à 10 unités enzymatiques/g.

On peut utiliser des préparations enzymatiques existantes et commercialisées comme préparations enzymatiques saccharifiantes dérivant d'une source de micro-organismes. Elles  
20 peuvent être constituées de bouillons de culture de micro-organismes ou d'extraits de bouillons de culture. Par exemple on sait que des agents saccharifiants dérivant de micro-organismes du genre Aspergillus et Rhizopus décomposent l'amidon brut et ils sont utiles comme agents saccharifiants dans  
25 l'invention. En particulier des préparations enzymatiques dérivant de Rhizopus sp. conviennent dans la pratique de l'invention car le pH de la suspension dans l'invention est de 4,0 à 5,0 avec une moyenne de 4,6, et elles ont une activité de saccharification de l'amidon brut supérieure à celles  
30 dérivant d'Aspergillus sp. et possèdent un pouvoir saccharifiant important.

L'activité saccharifiante des préparations enzymatiques dérivant de micro-organismes est exprimée par le titre  
35 enzymatique mesuré selon la méthode de la norme japonaise JIS K-7001.

D'autre part, une unité saccharifiante de malt est par définition la quantité produisant 10 mg de maltose en 10

minutes à 40°C à partir d'une solution à 1 % d'amidon soluble (pH 4,5).

Dans l'invention, le pH du moût pendant la fermentation est généralement de 4,0 à 5,0 avec une moyenne d'environ 4,5. D'autre part, le pH optimal de la décomposition de l'amidon brut par le malt est d'environ 4,6. Par conséquent les enzymes du malt qui participent à la décomposition de l'amidon brut agissent au voisinage du pH optimal du malt.

#### Saccharification et fermentation

Les levures habituelles de la fermentation alcoolique peuvent conserver pleinement leur activité pour un pH du moût de 4,0 à 5,0. Par conséquent, dans le procédé de l'invention, la saccharification de l'amidon n'est pas ralentie et la fermentation alcoolique s'effectue rapidement bien que l'amidon ne soit pas transformé en  $\alpha$ -amidon ni gélatinisé. Ce fait est un des éléments importants découverts par les inventeurs.

La levure initiale utilisée est une levure cultivée de façon classique et la quantité de levure mélangée à la suspension doit être d'au moins  $2 \times 10^6$  cellules/ml du moût comme population initiale de levure. Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, pendant une période d'au moins 10 heures à partir du moment où l'on combine la suspension de matière première à la levure initiale, la population de levure est toujours maintenue à au moins  $2 \times 10^7$  cellules/ml de moût. Pour cela, on ajoute à la suspension  $2 \times 10^7$  cellules de levure /ml de moût ou on mélange la levure initiale à une partie de la suspension et, après développement de la levure, on ajoute progressivement la suspension restante. Du point de vue opératoire, on préfère le second procédé. En opérant ainsi on obtient une fermentation énergique dès que la suspension de matière première est combinée à la levure initiale. Comme la levure provoque une fermentation alcoolique énergique, les micro-organismes indésirables prolifèrent à peine malgré l'absence d'un stade de cuisson et la contamination par les micro-organismes indésirables prolifèrent à peine malgré l'absence d'un stade de cuisson et la contamination par les micro-organismes d'altération ne se produit pas. Le moût présente un phénomène de convection important. Cette convection uniformise



la densité de la levure et des autres composants, ce qui établit les conditions préférées de saccharification et de fermentation. En particulier, l'élution de l'amidon des matières premières broyées est favorisée. Grâce à ces effets synergiques, on peut dans le procédé sans cuisson de l'invention obtenir des rendements de fermentation équivalents ou supérieurs à ceux des procédés classiques pratiquement dans les mêmes périodes de temps.

Dans certains cas, par exemple selon la forme de la cuve de fermentation, la convection du moût peut être forcée. Si l'on utilise une matière première nettement contaminée par des bactéries, on peut mettre en pratique le procédé de l'invention en présence de moins de 320 ppm de dioxyde de soufre. Comme précédemment indiqué, le procédé de l'invention est simple et économique et la concentration finale de l'alcool dans le moût atteint 15 % ou plus. Par conséquent, on peut par distillation classique, obtenir de façon économique de l'alcool pur.

L'invention est illustrée par les exemples non limitatifs suivants.

#### Préparation d'enzymes saccharifiantes

Le tableau 2 (voir page 15) montre l'analyse des diverses préparations d'enzymes saccharifiantes provenant de micro-organismes.

On ajoute 1 g de préparation enzymatique à 1 000 ml d'eau distillée puis on agite de temps en temps pendant une heure à 30°C. On utilise le surnageant obtenu par centrifugation (3 000 tr/mn; 10 mn) comme solution enzymatique. Les pouvoirs liquéfiant, dextrinisant, saccharifiant, la protéase, cellulase et pectinase ont été respectivement déterminés selon les méthodes de Wohlgemuth modifiée, de Tsujisaka, de la norme japonaise JIS K-7001, de Kunitz, de Miller et de Willstätter-Schudel.

L'analyse de malts figure dans le tableau 3 (voir page 16).

On ajoute 1 g de malt broyé à 1 000 ml d'eau distillée puis on agite de temps en temps pendant une heure à 30°C. On utilise le surnageant obtenu par centrifugation (3 000 tr/mn; 10 mn) comme solution d'enzyme. Le pouvoir saccharifiant

a été déterminé selon la méthode de la norme japonaise JIS K-7001. Par définition, une unité d'enzyme saccharifiante (amylase) est la quantité produisant 10 mg de maltose en 10 minutes à 40°C à partir d'une solution à 1 % d'amidon soluble (pH 4,5).

#### Préparation d'échantillons

On broie à sec des matières premières amylicées et on les utilise pour l'analyse. Les degrés de broyage figurent dans le tableau 4 (voir pages 17 à 20); les patates douces et le manioc utilisés comme matières premières sont des matières séchées.

#### EXEMPLE 1

On mélange en agitant dans un flacon de Meyer de 1 litre, 185 g de produit broyé correspondant à chacune des diverses céréales indiquées dans le tableau 5, 370 ml d'eau, 1,15 g (15,6 U/g de matière première en pouvoir saccharifiant) de la préparation d'enzyme saccharifiante A du tableau 2 provenant de Rhizopus sp. et 45 ml de levure initiale (Saccharomyces sp.;  $1,2 \times 10^8$  cellules/ml) et on effectue une fermentation à 25°C pendant 120 heures. Les résultats de la fermentation figurent dans le tableau 5 (voir page 16).

#### EXEMPLE 2

On mélange en agitant 140 g d'un produit broyé d'une fraction des grains débarrassés de leur germe des céréales indiquées dans le tableau 6, 0,28 g (5,0 U/g de matière première) de la préparation d'enzyme saccharifiante A dérivant de Rhizopus sp. comme indiqué dans le tableau 2, 80 ml d'eau, 322 ml de vinasse et 25 ml d'une levure initiale ( $1,1 \times 10^8$  cellules/ml) et on fait fermenter à 30°C pendant 90 heures. Pour obtenir la vinasse, on soumet la liqueur résiduaire évacuée de la tour de récupération de l'alcool à une centrifugation pour éliminer les composants solides grossiers. Les résultats figurent dans le tableau 6 (voir page 20).

#### EXEMPLE 3

On mélange en agitant 185 g d'un produit de broyage des grains complets de maïs à grains dentés blancs ou de sorgho, 0,33 g (4 U/g de matière première) de l'enzyme saccharifiante B indiquée dans le tableau 2 dérivant de Rhizopus sp., 80 mg

de  $K_2S_2O_5$ , 370 ml d'eau et 25 ml de levure initiale ( $1,2 \times 10^8$  cellules/ml) et on effectue une fermentation à  $32^\circ C$  pendant 110 heures. Les résultats figurent dans le tableau 7 (voir page 20).

5 EXEMPLE 4

On introduit 4 litres de levure initiale ( $1,2 \times 10^8$  cellules/ml) dans une cuve de fermentation de 100 litres. On mélange dans un rapport pondéral de 1/2, un produit de broyage de grains entiers de sorgho (degré de broyage F) et de liquide de trempage et on ajoute, pour former une suspension, une préparation d'enzyme saccharifiante D indiquée dans le tableau 2 dérivant de Asp. sp. à raison de 20 unités par gramme de sorgho en pouvoir saccharifiant. On ajoute la suspension progressivement pour que le nombre des cellules de levure dans le moût après l'addition soit toujours maintenu à plus de  $2 \times 10^7$  cellules/ml. On ajuste la quantité totale de moût à 84 litres et on effectue la fermentation à  $32^\circ C$  pendant 96 heures. Le liquide de trempage utilisé dans cette expérience est un mélange d'eau et de vinasse dans un rapport de 7/3 en volume. La vinasse utilisée est obtenue selon le même traitement que celui décrit dans l'exemple 2. Les résultats qui figurent dans le tableau 8 (voir page 21) montrent l'évolution au cours du temps de la quantité de sucre réducteur direct dans le moût et ceux du tableau 9 (voir page 21) montrent l'évolution au cours du temps du nombre des cellules de levure dans le moût et les résultats de la fermentation.

25 EXEMPLE 5

On introduit 400 ml de levure initiale ( $1,2 \times 10^8$ ) cellules/ml) dans un fermenteur de verre de 10 litres (diamètre intérieur 20 cm, hauteur 40 cm). On mélange dans un rapport pondéral de 1/2 chacune des diverses matières broyées indiquées dans le tableau 10 et un liquide de trempage puis on ajoute pour préparer une suspension, 23 unités, en pouvoir saccharifiant, par gramme de matière première de la préparation d'enzyme saccharifiante D indiquée dans le tableau 2 dérivant d'Asp. sp. On ajoute progressivement la suspension pour que le nombre des cellules de levure dans le moût après l'addition soit toujours maintenu à plus de  $2 \times 10^7$  cellules/ml. On ajuste la quantité totale de moût à 8,4 l et on effectue la fer-

mentation à 35°C pendant 110 heures. Le liquide de trempage utilisé dans cette expérience est un mélange d'eau et de vinasse dans un rapport de 1/1 et la vinasse est obtenue selon le traitement indiqué dans l'exemple 2.

5 Les résultats figurent dans le tableau 10 (voir page 22).

EXEMPLE 6

On introduit 400 ml de levure initiale ( $1,1 \times 10^8$  cellules/ml) dans un fermenteur de 10 litres (diamètre intérieur 20 cm; hauteur 40 cm). On mélange dans un rapport pondéral de 1/1,8 un produit broyé correspondant à chacune des matières premières indiquées dans le tableau 11 et du liquide de trempage puis on ajoute, pour former une suspension, 4 unités en pouvoir saccharifiant, par gramme de matière première, de la préparation d'enzyme saccharifiante E indiquée dans le tableau 2 dérivant de Asp. sp. On ajoute progressivement la suspension de façon à ce que le nombre des cellules de levure dans le moût après l'addition demeure toujours supérieur à  $2 \times 10^7$  cellules/ml. On ajuste la quantité totale de moût à 8,4 litres et on effectue la fermentation à 32°C pendant 120 heures. Le liquide de trempage utilisé dans cette expérience est un mélange d'eau et de vinasse dans un rapport de 8/2. La vinasse est obtenue selon le même traitement que dans l'exemple 2.

15 Les résultats figurent dans le tableau 11 (voir page 23).

25 EXEMPLE 7

On mélange en agitant 120 g d'une fraction d'amidon séparée de chacune des matières premières indiquées dans le tableau 12, 1,34 g (25 U/g de matière première) de la préparation d'enzyme saccharifiante B indiquée dans le tableau 2 dérivant de Rhizopus sp., 408 ml de vinasse et 25 ml de levure initiale et on effectue la fermentation à 35°C pendant 96 heures. La vinasse utilisée dans cette expérience est le liquide évacué de la tour de récupération de l'alcool. Les résultats figurent dans le tableau 12 (voir page 24).

35 EXEMPLE 8

On mélange 1 540 g d'un produit de broyage de grains complets (degré de broyage E) de maïs à grains dentés jaunes, 1 260 g d'amidon de maïs du commerce, 10,5 g (8,4 U/g de

matière première) de la préparation d'enzyme saccharifiante dérivant de Rhizopus sp. (B dans le tableau 2), 5,6 litres d'eau et 2,4 litres de vinasse et 500 ml de levure initiale ( $1,0 \times 10^8$  cellules/ml) et on effectue la fermentation pendant 100 heures à 32°C. Les résultats figurent dans le tableau 13. (voir page 24).

#### EXEMPLE 9

On mélange en agitant 126 g d'un produit de broyage de grains complets (degré de broyage B) de maïs à grains dentés jaunes, 14 g (4,6 U/g de matière première) de malt broyé (A du tableau 3), 0,22 g (3,5 U/g de matière première) de préparation enzymatique saccharifiante de Rhizopus sp. (B du tableau 2), 80 mg de  $K_2S_2O_5$ , 402 ml d'eau et 25 ml de levure initiale ( $1,1 \times 10^8$  cellules/ml) et on effectue la fermentation à 30°C pendant 96 heures. Les résultats figurent dans le tableau 14 (voir page 25).

#### EXEMPLE 10

On introduit 670 ml de levure initiale ( $1,0 \times 10^8$  cellules/ml) dans un fermenteur de verre de 10 litres (diamètre intérieur 20 cm; hauteur 40 cm). On mélange dans un rapport pondéral (maïs/malt/liqueur de trempage) de 4/1/14,5 du maïs broyé, du malt broyé (B du tableau 3; 22 U/g de matière première en pouvoir saccharifiant) et du liquide de trempage et on ajoute 320 ppm de  $K_2S_2O_5$  pour former une suspension. On ajoute progressivement la suspension de façon à ce que le nombre des cellules de levure dans le moût après l'addition soit toujours maintenu à plus de  $2 \times 10^7$  cellules/ml. On ajuste la quantité totale de moût à 8,7 litres et on effectue la fermentation à 32°C pendant 96 heures.

La liqueur de trempage utilisée dans cette expérience est un mélange d'eau et de vinasse dans un rapport de 7/3. Les résultats figurent dans le tableau 15 (voir page 26).

On effectue une expérience semblable à celle ci-dessus avec du sorgho, de l'orge, du blé, du seigle et du riz. Les résultats figurent dans le tableau 16 (voir page 27).

#### EXEMPLE 11

On introduit 800 ml de levure initiale ( $1,3 \times 10^8$  cellules/ml) dans un fermenteur de verre de 10 litres (diamètre

intérieur 20 cm; hauteur 40 cm).

On mélange dans un rapport pondéral de 8,7/1,22,8 (produit broyé/malt broyé/eau) un produit broyé correspondant à chacune des matières premières indiquées dans le tableau 17, du malt broyé (C du tableau 3; 11,6 U/g de matière première en pouvoir saccharifiant) et de l'eau et on ajoute de plus 160 ppm de  $K_2S_2O_5$  pour former une suspension.

On introduit progressivement la suspension dans le fermenteur pour que le nombre des cellules de levure dans le moût après l'addition soit toujours maintenu à plus de  $2 \times 10^7$  cellules/ml. On ajuste la quantité totale de moût à 8,8 litres et on effectue la fermentation à 28°C pendant 120 heures. Les résultats figurent dans le tableau 17 (voir page 25).

#### EXEMPLE 12

On mélange en agitant 185 g de manioc broyé (séché), 370 ml d'eau, 200 ml de vinasse, 0,58 g (7,8 U/g de matière première) de la préparation d'enzyme saccharifiante dérivant de Rhizopus sp. (A dans le tableau 2) et 45 ml de levure initiale ( $1,2 \times 10^8$  cellules/ml) et on effectue la fermentation à 30°C pendant 96 heures. Les résultats figurent dans le tableau 18 (voir page 28).

#### EXEMPLE 13

On mélange en agitant 185 g de patates douces broyées (tranches séchées), 305 ml d'eau, 165 ml de vinasse; 0,32 g (3,9 U/g de matière première) de l'enzyme saccharifiante dérivant de Rhizopus sp. (B du tableau 2) et 40 ml ( $1,0 \times 10^8$  cellules/ml) de levure initiale et on effectue la fermentation à 32°C pendant 120 heures. Les résultats figurent dans le tableau 19. (voir page 28).

#### EXEMPLE 14

On mélange 112 g d'un produit broyé correspondant à chacune des matières premières (séchées) figurant dans le tableau 20, 28 g de malt broyé, (B du tableau 3; 22 U/g de matière première) et 200 ml d'eau, 200 ml de vinasse, 320 mg de  $K_2S_2O_5$  et 25 ml ( $1,3 \times 10^8$  cellules/ml) de levure initiale et on effectue la fermentation à 28°C pendant 120 heures. Les résultats figurent dans le tableau 20 (voir page 28).

EXEMPLE 15

On introduit 400 ml de levure initiale ( $1,3 \times 10^8$  cellules/ml) dans un fermenteur de verre de 10 litres (diamètre intérieur 20 cm; hauteur 40 cm).

- 5           Séparément, on mélange dans un rapport pondéral de 1/2,5 un produit broyé de la fraction des grains débarrassés du germe de chacune des céréales indiquées dans le tableau 21 et du liquide de trempage et on ajoute la préparation enzymatique dérivant d'un micro-organisme (C du tableau 2; 5,9 U/g
- 10 de matière première) pour former une suspension. On ajoute progressivement la suspension au fermenteur pour que le nombre des cellules de levure du moût après l'addition soit toujours maintenu à plus de  $2 \times 10^7$  cellules/ml. On ajuste la quantité totale de moût à 7,6 litres et on effectue la fermentation à
- 15 30°C pendant 120 heures. Le liquide de trempage utilisé dans cette expérience est un mélange d'eau et de vinasse dans un rapport de 1/1. Les résultats figurent dans le tableau 21 (voir page 29).

Tableau 1

Maïs broyé/eau (en poids)	1/3,4	1/2,9	1/2,4	1/2,1	1/1,8
Température d'accroissement de la viscosité	66,5°C	63,8°C	60,0°C	57,5°C	55,8°C
Amidon de maïs/ eau (en poids)	1/3,4	1/2,9	1/2,4	1/2,1	1/1,8
Température d'accroissement de la viscosité	66,5°C	66,5°C	65,0°C	64,0°C	62,0°C

Tableau 2

Code des pré- parations	A	B	C	D	E
Origine de l'en- zyme	Rhiz.sp.* (No.204)	Rhiz.sp.* (No.202)	Rhiz.sp.* (No.212) + * Asp. sp. (No.107)	Asp.sp.* (No.186)	Asp.sp.* (No.171)
Pouvoir liquéfiant	105 U/g**	1850 U/g**	103 U/g**	45 U/g**	118 U/g**
Pouvoir dextrinisant	400	5285	286	5347	588
Pouvoir saccharifiant	2503	2236	1764	745	3763
Protéase (acide)	985	3761	555	1236	13694
(neutre)	269	1262	1074	N.D***	1969
(alcaline)	traces	1080	traces	N.D***	1050
Cellulase	8,9	563	2,6	3,2	3,2
Pectinase	62	93	48	21	64

\* Rhiz.sp. : Rhizopus sp.      \*\* U : Unités  
 Asp. sp. : Aspergillus sp.      \*\*\* N.D.: Non détecté



Tableau 3

Malt No.	A	B	C
Humidité (%)	4,5	4,2	4,6
Extrait fin (%)	76,6	80,1	77,1
grossier (%)	75,4	79,4	76,4
pH du moût	5,9	5,7	5,9
Pouvoir saccharifiant (U/g)	46	110	113

Tableau 5

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention			Procédé classique(d)	
		pH	AT(a) (ml)	Alc(b) (%)	RF(c) (%)	RF (%)
Maïs à grains dentés blancs	A	4,8	3,1	14,5	88,3	87,2
Sorgho	A	4,7	3,5	14,5	88,1	87,3
Orge	A	4,8	3,5	13,7	88,0	86,8
Blé	A	4,8	3,6	13,7	87,5	87,0
Seigle	A	4,6	4,0	13,8	88,7	87,3
Riz	A	4,9	3,0	16,2	91,2	90,8
Millet à grappes	B	4,8	3,2	12,5	85,0	84,3
Millet panic	B	4,6	4,1	10,3	82,9	82,0
Millet commun	B	4,9	3,0	12,1	85,9	84,2

(a) AT : acidité totale, ml de NaOH N/10 nécessaires pour neutraliser 10 ml de moût.

(b) Alc : teneur en alcool en volume

(c) RF : rendement de fermentation =  $\frac{\text{alcool produit(ml)}}{\text{alcool théorique(ml)}} \times 100 (\%)$

(d) Procédé classique : un procédé classique dans lequel on cuit tout d'abord la matière première à une température élevée (150°C), puis on saccharifie et fait fermenter.

Tableau 4

Matière première	Taille des particules (*)	Degré de broyage						
		A	B	C	D	E	F	G
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Maïs	> 840 $\mu\text{m}$	69,0	28,8	21,6	20,8	10,2	4,4	0
	420 - 840 $\mu\text{m}$	16,5	35,3	38,0	37,1	35,5	36,7	14,5
	250 - 420 $\mu\text{m}$	5,8	10,8	10,9	10,9	12,6	12,3	11,9
	177 - 250 $\mu\text{m}$	2,2	10,7	8,1	5,5	4,7	5,0	5,7
	149 - 177 $\mu\text{m}$	1,9	3,6	4,5	1,2	0,3	1,1	1,3
	< 149 $\mu\text{m}$	4,6	10,8	16,9	24,5	36,7	40,5	66,6
Sorgho	> 840 $\mu\text{m}$	69,2	29,0	21,5	20,2	11,0	4,0	0
	420 - 840 $\mu\text{m}$	16,3	34,8	37,6	37,5	35,3	36,5	14,2
	250 - 420 $\mu\text{m}$	6,0	11,0	10,8	11,2	12,0	11,8	11,5
	177 - 250 $\mu\text{m}$	2,1	10,5	9,0	5,9	5,7	5,0	5,0
	149 - 177 $\mu\text{m}$	2,0	3,8	4,7	1,8	1,0	1,2	1,7
	< 149 $\mu\text{m}$	4,4	10,9	16,4	23,4	35,0	41,5	67,6
Orge	> 840 $\mu\text{m}$	67,5	30,5	20,0	19,1	9,1	3,7	0
	420 - 840 $\mu\text{m}$	16,0	36,5	39,1	36,0	34,8	32,0	17,5
	250 - 420 $\mu\text{m}$	6,0	9,0	11,0	12,5	13,7	13,5	12,0
	177 - 250 $\mu\text{m}$	2,5	11,0	8,5	6,5	6,3	7,0	6,1
	149 - 177 $\mu\text{m}$	3,0	3,5	5,0	1,5	1,2	1,8	1,6
	< 149 $\mu\text{m}$	5,0	9,5	16,4	24,4	34,9	42,0	62,8

Tableau 4 (suite)

Matière première	Taille des particules (*)	Degré de broyage						
		A	B	C	D	E	F	G
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Millet Panic	> 840 $\mu\text{m}$		30,5			10,0		
	420 - 840 $\mu\text{m}$		36,1			36,0		
	250 - 420 $\mu\text{m}$		9,8			13,0		
	177 - 250 $\mu\text{m}$		10,0			4,0		
	149 - 177 $\mu\text{m}$		4,0			1,8		
	< 149 $\mu\text{m}$		9,6			35,2		
Millet commun	> 840 $\mu\text{m}$		31,5			9,8		
	420 - 840 $\mu\text{m}$		38,0			37,5		
	250 - 420 $\mu\text{m}$		12,5			11,8		
	177 - 250 $\mu\text{m}$		7,1			5,7		
	149 - 177 $\mu\text{m}$		3,0			1,8		
	< 149 $\mu\text{m}$		7,9			33,4		
Manioc	> 840 $\mu\text{m}$		38,4	19,4		10,6		
	420 - 840 $\mu\text{m}$		32,5	42,9		39,8		
	250 - 420 $\mu\text{m}$		12,1	17,9		23,6		
	177 - 250 $\mu\text{m}$		8,2	10,6		13,6		
	149 - 177 $\mu\text{m}$		3,2	2,7		4,8		
	< 149 $\mu\text{m}$		5,6	6,5		7,6		
Patate douce (tranches séchées)	> 840 $\mu\text{m}$		32,5			9,0		
	420 - 840 $\mu\text{m}$		34,0			32,5		
	250 - 420 $\mu\text{m}$		13,0			10,2		
	177 - 250 $\mu\text{m}$		10,2			3,8		
	149 - 177 $\mu\text{m}$		1,5			1,8		
	< 149 $\mu\text{m}$		8,8			42,7		

Tableau 4 (suite)

Matière première	Taille des particules (*)	Degré de broyage						
		A	B	C	D	E	F	G
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Blé	> 840 $\mu\text{m}$	68,5				9,8		
	420 - 840 $\mu\text{m}$	14,8				35,0		
	250 - 420 $\mu\text{m}$	6,5				13,0		
	177 - 250 $\mu\text{m}$	1,9				5,2		
	149 - 177 $\mu\text{m}$	2,5				1,3		
	< 149 $\mu\text{m}$	5,8				35,7		
Seigle	> 840 $\mu\text{m}$	69,5				7,8		
	420 - 840 $\mu\text{m}$	16,3				34,2		
	250 - 420 $\mu\text{m}$	5,5				13,5		
	177 - 250 $\mu\text{m}$	2,1				5,2		
	149 - 177 $\mu\text{m}$	2,0				1,1		
	< 149 $\mu\text{m}$	4,6				38,2		
Riz	> 840 $\mu\text{m}$	69,5	20,5		10,0			0
	420 - 840 $\mu\text{m}$	16,5	38,4		36,4			13,0
	250 - 420 $\mu\text{m}$	5,2	12,1		12,3			11,5
	177 - 250 $\mu\text{m}$	2,0	6,5		4,0			6,3
	149 - 177 $\mu\text{m}$	2,0	4,1		1,1			1,5
	< 149 $\mu\text{m}$	4,8	18,1		36,2			67,7
Millet à grappes	> 840 $\mu\text{m}$		32,5			11,0		
	420 - 840 $\mu\text{m}$		37,0			34,4		
	250 - 420 $\mu\text{m}$		13,2			12,0		
	177 - 250 $\mu\text{m}$		6,7			5,0		
	149 - 177 $\mu\text{m}$		2,0			1,0		
	< 149 $\mu\text{m}$		8,6			36,6		

Tableau 4 (suite)

(\*) Granulométrie déterminée avec des tamis standard selon la norme japonaise JIS Z 8801 - 1966.

Tableau 6

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique
		pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
Maïs à grains dentés jaunes	E	4,8	3,8	11,8	90,0	88,2
Sorgho	E	4,7	3,7	11,8	89,5	88,0
Orge	E	4,7	3,7	11,6	88,7	87,1
Blé	E	4,6	3,9	11,5	88,0	86,3
Seigle	E	4,6	4,0	11,6	88,1	86,9
Riz	E	4,9	3,5	13,6	93,7	92,5

Tableau 7

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique
		pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
Maïs à grains dentés blancs	E	4,9	3,0	14,5	88,5	87,1
Sorgho	E	4,9	3,0	14,5	88,3	87,2

Tableau 8

Temps (heures) écoulé depuis le début de l'addition de la matière première	Procédé de l'invention	Procédé classique
1	1,10 %	6,79 %
10	1,65 %	6,45 %
24	0,17 %	2,52 %
48	0,14 %	0,18 %
72	0,12 %	0,12 %
96	0,09 %	0,10 %

Tableau 9

Procédé de l'invention								Procédé classique				
Nombre de cellules de levure dans le moût ( $\times 10^7$ cellules/ml)								Résultats de la fermentation				
Temps (h) écoulé depuis le début de l'addition de la matière première								pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
1	5	10	24	48	72	96						
4,2	2,0	6,8	18	13	10	8	5,0	3,0	15,0	89,5	88,2	

Tableau 10

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique				
		Nombre de cellules de levure ( $\times 10^7$ cellules/ml dans le moût)				Résultats de la fermentation				
		Temps (heures) écoulé depuis le début de l'addition de la matière première				pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
1	5	10	24							
Maïs	B	4,0	2,2	6,0	18	4,9	3,8	14,4	88,1	87,6
Sorgho	B	4,5	2,0	5,9	18	4,7	4,0	14,4	87,8	87,5
Orge	B	5,0	2,9	7,8	21	4,9	3,5	14,1	87,6	86,5
Blé	E	4,8	2,6	6,2	17	4,8	3,7	14,1	87,4	86,8
Seigle	E	4,7	2,4	7,0	18	4,6	4,1	14,2	88,0	87,1
Riz	E	3,5	3,7	6,9	20	5,0	3,5	16,5	90,5	90,2
Millet à grappes	E	6,0	4,2	8,0	18	4,7	3,9	12,9	84,7	83,6
Millet Panic	E	5,0	2,8	6,1	17	4,7	4,5	10,6	82,5	81,5
Millet commun	E	4,5	2,1	6,1	19	4,9	3,9	12,4	86,0	84,9

Tableau 11.

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Résultats de la fermentation					Procédé classique RT (%)
		Nombre de cellules de levure ( $\times 10^7$ cellules/ml dans le moût)				pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)		
		Temps (heures) écoulé depuis le début de l'addition de la matière première									
		1	5	10	24						
Maïs	G	4,5	4,0	7,2	19	4,9	3,7	15,3	87,5	87,7	
Sorgho	G	4,7	3,1	6,0	17	4,8	3,2	15,6	87,6	87,3	
Riz	G	3,8	3,0	7,8	18	4,9	3,4	17,1	89,7	89,5	



Tableau 12

Matière première	Procédé de l'invention				Procédé classique
	pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
Maïs	4,5	4,0	12,3	90,0	87,7
Sorgho	4,4	4,1	12,3	89,5	88,0
Orge	4,4	4,2	12,2	88,6	87,9
Blé	4,3	4,3	12,2	88,5	87,0
Seigle	4,2	4,3	12,3	89,1	88,3
Riz	4,7	4,1	12,5	92,1	90,0
Patate douce	4,3	4,0	12,3	89,2	86,8
Manioc	4,2	4,2	12,3	89,5	88,5

Tableau 13

Matière première	Procédé de l'invention				Procédé classique
	pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
Maïs à grains dentés jaunes et amidon de maïs du commerce	4,6	6,1	12,2	88,0	87,1

Tableau 14

Matière première	Procédé de l'invention				Procédé classique
	pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
Maïs à grains dentés jaunes et malt	4,7	3,0	11,2	88,2	87,3

Tableau 17

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique
		pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
Maïs et malt	G	4,6	3,5	11,7	86,5	86,6
Sorgho et malt	G	4,5	4,0	11,9	86,8	86,5
Riz et malt	G	4,8	4,1	12,9	87,5	87,3

Tableau 15

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention								Procédé classique			
		Nombre de cellules de levure ( $\times 10^7$ cellules/ml dans le moût) Temps (heures) écoulé depuis le début de l'addition de la matière première								Résultats de la fermentation			
		1	5	10	24	48	72	96	pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
Maïs et malt	B	4,0	2,4	6,0	19	15	7,2	5	4,8	3,0	10,5	87,3	86,8

Tableau 16

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique				
		Nombre de cellules de levure ( $\times 10^7$ cellules/ml dans le moût)				Résultats de la fermentation				
		Temps (heures) écoulé depuis le début de l'addition de la matière première				pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
1	5	10	24							
Sorgho et malt	B	3,8	2,0	5,8	18	5,0	3,2	10,6	87,0	87,0
Orge et malt	C	5,0	2,8	7,0	19	4,9	3,1	10,5	87,2	86,5
Blé et malt	E	4,6	2,2	6,4	19	4,9	3,0	10,5	87,1	87,0
Seigle et malt	E	4,5	2,1	6,5	17	4,9	3,3	10,6	88,0	87,5
Riz et malt	C	5,6	2,7	7,5	20	4,9	3,0	11,9	89,7	89,0

Tableau 18

Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique RF (%)
	pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	
B	4,2	3,1	12,5	87,8	88,2
D	4,3	3,3	12,6	88,3	88,4
E	4,3	3,1	12,7	89,6	88,5

Tableau 19

Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique RF (%)
	pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	
B	4,5	4,1	12,2	91,2	91,8
E	4,6	4,0	12,3	92,0	91,5

Tableau 20

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique RF (%)
		pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	
Manioc et malt	E	4,3	2,4	12,6	87,8	86,8
Patate douce et malt	E	4,5	4,3	11,1	90,2	90,6

Tableau 21

Matière première	Degré de broyage (voir tabl.4)	Procédé de l'invention				Procédé classique				
		Nombre de cellules de levure dans le moût ( $\times 10^7$ cellules/ml)				Résultats de la fermentation				
		Temps (heures) écoulé après le début de l'addition de la matière première				pH	AT (ml)	Alc (%)	RF (%)	RF (%)
1	5	10	24							
Maïs	G	6,8	4,2	8,3	19	4,8	3,6	12,8	88,0	87,0
Sorgho	E	6,2	2,1	7,1	17	4,9	3,5	12,9	88,1	87,9
Riz	G	7,1	4,5	7,8	20	5,0	3,2	14,7	92,7	92,2

Revendications.

- 1) Procédé de production d'alcool caractérisé par le fait qu'on mélange une matière amylacée broyée avec un liquide de trempage dans un rapport pondéral (poids de la matière amylacée/poids du liquide de trempage) de 1/3,4 à 1/1,8 pour former une suspension, sans cuire la suspension, on ajoute une préparation d'enzyme saccharifiante dérivant d'une source de micro-organismes à la suspension à raison d'au moins 3,5 unités par gramme de matière amylacée en valeur humide, on ajoute de plus une levure de fermentation alcoolique et on fait fermenter la suspension.
- 2) Procédé selon la revendication 1, dans lequel la matière amylacée broyée contient du malt broyé.
- 3) Procédé selon la revendication 2, dans lequel le titre de la préparation d'enzyme dérivant d'une source de micro-organismes est de 0,3 à 10 unités en pouvoir saccharifiant.
- 4) Procédé selon la revendication 2, dans lequel, au lieu d'ajouter à la suspension une préparation d'enzyme saccharifiant dérivant d'une source de micro-organismes, on fait en sorte que le malt ajouté corresponde à au moins 10 unités de pouvoir saccharifiant par gramme des matières amylacées.
- 5) Procédé selon la revendication 4, dans lequel l'activité saccharifiante ajoutée provenant du malt est de 10 à 25 unités.
- 6) Procédé selon l'une des revendications 1, 2 et 4 dans lequel on combine progressivement la suspension à une levure initiale préalablement obtenue de façon classique au fur et à mesure du développement de la levure pour que la population de levure dans le moût soit toujours maintenue à  $2 \times 10^7$  cellules/ml ou plus.
- 7) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la matière amylacée est une céréale, telle que le maïs, le sorgho, le blé, l'orge, le seigle, le riz, le panic millet, le millet à grappes ou le millet commun ou un amidon brut qu'on en a séparé.

8) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la matière amylacée est une racine cultivée amylacée, telle que la patate douce et le manioc ou un amidon brut qu'on en a séparé.

5 9) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le liquide de trempage est l'eau ou un mélange d'eau et de vinasse.

10 10) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le liquide de trempage est constitué entièrement de vinasse de distillation.

11) Procédé selon l'une des revendications 1, 2, 3, dans lequel la préparation d'enzyme dérive d'un micro-organisme du genre Rhizopus.

15 12) Procédé selon la revendication 1, dans lequel le titre de la préparation d'enzyme est de 3,5 à 25 unités en pouvoir saccharifiant.

20 13) Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la quantité de la levure de fermentation alcoolique est d'au moins  $2 \times 10^6$  cellules/ml de moût comme concentration initiale.

14) Procédé selon la revendication 2, dans lequel le titre de la préparation d'enzyme dérivant d'une source de micro-organismes est de 0,3 à 10 unités en pouvoir saccharifiant.

25 15) Procédé selon la revendication 4, dans lequel l'activité saccharifiante ajoutée provenant du malt est de 10 à 25 unités.