

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 216**

51 Int. Cl.:

A23L 1/105 (2006.01)
C12C 1/00 (2006.01)
C12C 7/04 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)
C12P 1/02 (2006.01)
C12P 7/02 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12F 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2004 E 04719274 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1603406**

54 Título: **Método para producir etanol usando almidón sin procesar**

30 Prioridad:

10.03.2003 US 453442 P

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

14.03.2013

73 Titular/es:

**POET RESEARCH, INC. (100.0%)
2209 East 57th Street N.
Sioux Falls, SD 57104 , US**

72 Inventor/es:

**LEWIS, STEPHEN, M.;
VAN HULZEN, SHON, ERRON;
FINCK, JOHN, MICHAEL y
ROTH, DEBBIE, LYNN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 398 216 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir etanol usando almidón sin procesar.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para producir niveles altos de alcohol durante la fermentación de material de plantas. La presente invención también se refiere a métodos para producir destilados de grano seco ricos en proteína a partir de fermentación de material de plantas.

Antecedentes de la invención

10 Existen numerosos métodos convencionales para transformar material de plantas en etanol. Sin embargo, estos métodos tienen numerosas deficiencias. Permanece una necesidad de métodos adicionales más eficaces para transformar material de plantas en etanol y para producir productos de fermentación mejorados.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a métodos para producir niveles altos de alcohol durante la fermentación de material de plantas. La presente invención también se refiere a métodos para producir destilados de grano seco ricos en proteína a partir de fermentación de material de plantas.

15 Según un primer aspecto de la invención se proporciona un método para producir etanol a partir de maíz molido cuyo método comprende:

20 proporcionar una composición acuosa que comprende maíz molido de un tamaño de modo que más de 50% del maíz molido pasa a través de un filtro de 0,5 mm, una amilasa ácida fúngica y una glucoamilasa bajo condiciones de sacarificación para producir azúcares fermentables que incluyen un pH de menos de 6, una temperatura de 25°C a 40°C, y un contenido de sólidos de 20 a 50 por cien en peso; y

fermentar los azúcares en presencia de una levadura bajo condiciones que producen etanol en la que dichas condiciones incluyen un pH de menos de 6, en el que dicho método produce al menos 18 por cien en volumen de etanol.

25 En una realización, la presente invención se refiere a un proceso para producir etanol a partir de material de plantas. Este método incluye moler el material de plantas para producir material de plantas molido que incluye almidón; sacarificar el almidón, sin cocinado; fermentar el almidón incubado, y recuperar el etanol de la fermentación. El presente método puede incluir variación de la temperatura durante la fermentación. El presente método puede incluir emplear un material de plantas con un tamaño de partícula de modo que más del 50% pase a través de un tamiz de 0,5 mm de malla. El presente método puede producir una composición que incluya al menos 18% en volumen de etanol.

30 En una realización, la presente composición se refiere a un proceso para producir destilados de grano seco ricos en proteína a partir de fermentación de material de plantas. Este método incluye moler el material de plantas para producir material de plantas molido que incluye almidón; producir azúcares a partir del almidón sin cocinar; fermentar los azúcares sin cocinar para producir una composición que incluye etanol; y recuperar el destilado de grano seco de la fermentación. El destilado de grano seco puede incluir al menos aproximadamente 30% de proteína. Los destilados de grano seco pueden incluir niveles incrementados de proteína zeína.

35 En una realización, la presente invención se refiere a un proceso para producir etanol a partir de maíz. Este proceso incluye producir almidón a partir de maíz y etanol a partir del almidón; que producen emisiones de ventilación más secas que incluyen un nivel significativamente más bajo de compuestos orgánicos volátiles que las tecnologías convencionales.

40 La patente WO 03/066826 describe un medio para la producción de etanol sin el requerimiento de gelatinización y/o licuefacción del sustrato.

La patente WO 03/018766 describe polinucleótidos que codifican una o más enzimas de procesado de expresión en plantas que tienen una composición alterada para facilitar el procesado de planta y grano.

45 En un artículo de Chi & Liu, *Biotechnology Letters* 15(8), páginas 877-882 (1993) se describe un método con condiciones adecuadas para producción de etanol a alta concentración a partir de maíz molido sin procesar mediante una cepa de levadura tetraploide.

La patente WO 91/03543 describe un proceso para fabricar un producto alimentario de grano de cereal que también es adecuado para la coproducción de etanol.

50

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-E ilustran esquemáticamente una comparación del rendimiento del proceso de la presente invención comparado con el proceso convencional.

5 Las figuras 2A-2C ilustran esquemáticamente el efecto de las dosis de glucoamilasa y amilasa ácida fúngica en el presente proceso.

Las figuras 3A-3D ilustran esquemáticamente el efecto del tamaño de molienda y la dosis de enzimas sobre la eficacia de la fermentación en el presente proceso.

Las figuras 4A-4C ilustran esquemáticamente el efecto del tamaño de la partícula molida, tipo de glucoamilasa y dosis de amilasa ácida fúngica sobre la eficacia de la fermentación en el presente proceso.

10 Las figuras 5A-5J ilustran esquemáticamente el efecto de los sólidos secos iniciales y la temperatura sobre el comportamiento de la fermentación en el presente proceso.

Las figuras 6A y 6B ilustran esquemáticamente niveles altos de producción de etanol a partir del proceso de la presente invención usando modos de operación en lotes o continuos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS).

15 La figura 7 ilustra esquemáticamente que el presente proceso mantiene niveles bajos de glicerol durante las operaciones SFS en lotes.

La figura 8 ilustra esquemáticamente que el presente proceso mantiene niveles bajos de aceite de fusel durante las operaciones SFS en lotes.

20 Las figuras 9A y 9B ilustran esquemáticamente que el presente proceso mantiene niveles bajos de glucosa durante los modos de operación de fermentación en lotes o continuos de SFS.

Las figuras 10A y 10B ilustran esquemáticamente que el presente proceso mantiene niveles bajos de maltosa durante los modos de operación de fermentación en lotes o continuos de SFS.

Las figuras 11A y 11B ilustran esquemáticamente que el presente proceso mantiene niveles bajos de maltotriosa (DP3) durante los modos de operación de fermentación en lotes o continuos de SFS.

25 Las figuras 12A y 12B ilustran esquemáticamente que el presente proceso mantiene niveles bajos de dextrinas (DP4+) durante los modos de operación de fermentación en lotes o continuos de SFS.

La figura 13 ilustra esquemáticamente que el presente proceso tiene un impacto favorable sobre la calidad DDGS en base a la tendencia a cuajar.

30 Las figuras 14A y 14B ilustran esquemáticamente el equilibrio de masa del presente proceso en relación con la separación posterior durante la etapa de centrifugación en la producción de etanol.

Las figuras 15A-D ilustran esquemáticamente que el presente proceso ofrece fermentación ventajosa de materias primas no tradicionales.

35 Las figuras 16A-C ilustran esquemáticamente que el proceso de la presente invención es capaz de funcionar establemente en modo de operación continuo sin pérdida significativa debido al ácido que produce contaminantes bacterianos.

La figura 17 ilustra esquemáticamente que el presente proceso es capaz de lograr niveles de almidón residual bajos en un modo de operación continuo.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

40 Como se usa en la presente memoria, la frase “sin cocinado” se refiere a un proceso para transformar almidón a etanol sin tratamiento térmico para la gelatinización y dextrinización de almidón usando alfa-amilasa. Generalmente, para el proceso de la presente invención, “sin cocinado” se refiere a mantener una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón, de modo que la sacarificación tiene lugar a partir de almidón insoluble nativo sin procesar dando glucosa soluble mientras que se evitan las condiciones convencionales de
 45 gelatinización de almidón. Las temperaturas de gelatinización de almidón están típicamente en el intervalo de 57°C a 93°C dependiendo de la fuente de almidón y el tipo de polímero. En el método de la presente invención, la dextrinización de almidón que usa técnicas convencionales de licuefacción no es necesaria para la fermentación eficaz del hidrato de carbono en el grano.

Como se usa en la presente memoria, la frase “material de plantas” se refiere a todo o parte de cualquier planta (por ejemplo grano de cereal), típicamente un material que incluye almidón. Material de plantas adecuado incluye granos tales como panocha (maíz, por ejemplo, maíz entero molido), sorgo (milo), cebada, trigo, centeno, arroz, y mijo; y cultivos de raíz con almidón, tubérculos, o raíces tales como patata dulce y mandioca. El material de plantas puede ser una mezcla de tales materiales y subproductos de tales materiales, por ejemplo, fibra de maíz, mazorca de maíz, forraje, u otros materiales que contienen celulosa y hemicelulosa tales como madera o residuos de plantas. Materiales de plantas adecuados incluyen maíz, o bien maíz normal o maíz ceroso.

Como se usa en la presente memoria, los términos “sacarificación” y “sacarificar” se refieren al proceso de transformar almidón en polisacáridos más pequeños y finalmente en monosacáridos, tal como glucosa. La sacarificación convencional usa licuefacción de almidón gelatinizado para crear sustrato dextrinizado soluble que la enzima glucoamilasa hidroliza a glucosa. En el presente método, la sacarificación se refiere a transformar el almidón sin procesar a glucosa con enzimas, por ejemplo, glucoamilasa y amilasa ácida fúngica (AFAU). Según el presente método, el almidón sin procesar no está sometido a licuefacción y gelatinización convencional para crear un sustrato dextrinizado convencional.

Como se usa en la presente memoria, una unidad de actividad de amilasa ácida fúngica (AFAU) se refiere a las unidades Novozymes normales para medir actividad de amilasa ácida fúngica. Las unidades Novozymes se describen en un boletín técnico Novozymes SOP N°: EB-SM-0259.02/01. Tales unidades se pueden medir mediante productos que detectan la degradación de almidón mediante titulación con yodo. Se define 1 unidad como la cantidad de la enzima que degrada 5,260 mg de materia seca de almidón por hora bajo condiciones normales.

Como se usa en la presente memoria, una unidad de actividad glucoamilasa (GAU) se refiere a las unidades Novozymes normales para medir actividad glucoamilasa. Las unidades Novozymes y las pruebas para determinar la actividad glucoamilasa se describen en un boletín técnico de Novozymes disponible públicamente.

Como se usa en la presente memoria, una unidad de actividad amiloglucosidasa (AGU) se refiere a las unidades Novozymes normales para medir actividad amiloglucosidasa. Las unidades Novozymes se describen en un boletín técnico SOP N°: EB-SM-0131.02/01. Tales unidades se pueden medir por detección de la transformación de maltosa a glucosa. La glucosa se puede determinar usando la reacción glucosa deshidrogenasa. Se define 1 unidad como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mmol de maltosa por minuto bajo las condiciones dadas.

Como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente” que modifica cualquier cantidad se refiere a la variación en la cantidad que se encuentra en condiciones del mundo real para producir azúcares y etanol, por ejemplo, en el laboratorio, planta piloto, o lugar de producción. Por ejemplo, una cantidad de un ingrediente que se emplea en una mezcla cuando se modifica “aproximadamente” incluye la variación y grado de precisión que se emplea típicamente en la medición en una planta de producción o laboratorio de etanol. Por ejemplo, la cantidad de un componente de un producto cuando se modifica por “aproximadamente” incluye la variación entre lotes en una planta de producción o laboratorio de etanol y la variación inherente al método analítico. Esté o no modificado por “aproximadamente”, las cantidades incluyen equivalentes de esas cantidades. Cualquier cantidad declarada en la presente memoria y modificada por “aproximadamente” también se puede emplear en la presente invención como la cantidad no modificada por “aproximadamente”.

Transformación de almidón a etanol

La presente invención se refiere a métodos para producir niveles altos de alcohol durante la fermentación de material de plantas, y a la cerveza rica en alcohol producida. La presente invención también se refiere a métodos para producir destilados de grano seco ricos en proteína a partir de fermentación de material de plantas, al destilado de grano seco rico en proteína producido, y a las emisiones de ventilación más secas y más limpias.

El presente método transforma almidón de material de plantas en etanol. En una realización, el presente método puede incluir preparar el material de plantas para sacarificación, transformar el material de plantas preparado en azúcares sin cocinado, y fermentar los azúcares.

El material de plantas se puede preparar por sacarificación mediante cualquier variedad de métodos, por ejemplo, mediante molido, para hacer el almidón disponible para sacarificación y fermentación. En una realización, el material vegetal se puede moler de modo que una parte significativa, por ejemplo, una mayoría, del material molido pase a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm. Por ejemplo, en una realización, aproximadamente 70% o más, del material vegetal molido puede pasar a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm. En una realización, el material de plantas reducido se puede mezclar con líquido de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% en peso o de aproximadamente 25 a aproximadamente 45% en peso del material de plantas reducido seco.

El presente proceso puede incluir transformar el material de plantas en azúcares que pueden fermentar mediante un microorganismo tal como levadura. Esta transformación se puede efectuar mediante sacarificación del material de plantas reducido con una preparación de enzimas, tal como una composición de enzimas sacarificantes. Una composición de enzimas sacarificantes puede incluir una variedad de enzimas conocidas adecuadas para transformar el material de plantas reducido en azúcares fermentables, tales como amilasas (por ejemplo α -amilasa

y/o glucoamilasa). En una realización, la sacarificación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6,0 o menos, por ejemplo, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,0.

5 El presente proceso incluye fermentar azúcares a partir de material de plantas a etanol. La fermentación se puede efectuar mediante un microorganismo, tal como levadura. En una realización, la fermentación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6 o menos, por ejemplo, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,0. En una
 10 realización, el presente método puede incluir variación del pH. Por ejemplo, la fermentación puede incluir rellenar el fermentador a pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4,5 durante la primera mitad del relleno y a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6 durante la segunda mitad del ciclo de relleno del fermentador. En una realización, la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C o de aproximadamente 30 a aproximadamente 35°C. En una realización, durante la fermentación la temperatura disminuye de aproximadamente 40°C a aproximadamente 30°C o aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 35°C a aproximadamente 30°C, durante la primera mitad de la fermentación, y la temperatura se mantiene a la temperatura más baja durante la segunda mitad de la fermentación. En una realización, la fermentación se lleva a cabo durante de aproximadamente 25 (por ejemplo, 24) a aproximadamente 150 horas, por ejemplo, durante
 15 aproximadamente 48 (por ejemplo, 47) a aproximadamente 96 horas.

El presente proceso puede incluir simultáneamente transformar el material de plantas reducido a azúcares y fermentar esos azúcares con un microorganismo tal como levadura.

20 El producto del proceso de la fermentación es referido en la presente memoria como "cerveza". El etanol se puede recuperar de la mezcla de fermentación, de la cerveza, mediante cualquier variedad de procesos conocidos, tal como mediante destilación. La vinaza que queda incluye material tanto líquido como sólido. El líquido y sólido se pueden separar mediante, por ejemplo, centrifugación.

Preparación del material de plantas

25 El presente método transforma almidón de material de plantas a etanol. El material de plantas se puede reducir mediante una variedad de métodos, por ejemplo, por molido, para hacer el almidón disponible para sacarificación y fermentación. Están disponibles otros métodos de reducción de material de plantas. Por ejemplo, material vegetal, tal como copos de maíz, se puede moler con un molino de bola, un molino de rodillo, un molino de martillo, u otro molino conocido para moler material vegetal, y/o otros materiales para el propósito de reducir el tamaño de partícula. Se puede emplear el uso de tecnología de emulsión, pulsación rotatoria, y otros medios de reducción del tamaño de partícula para incrementar el área superficial del material de plantas mientras que se eleva la eficacia del caudal del medio líquido. El material de plantas preparado puede ser referido como ser o estar incluido en "almidón sin procesar".
 30

35 Un molido fino expone más área del material de plantas, o material vegetal, y puede facilitar sacarificación y fermentación. En una realización, el material vegetal se muele de modo que una parte significativa, por ejemplo, una mayoría, del material molido, pasa a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm. En una realización, aproximadamente 35% o más del material vegetal molido puede pasar a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm. En una realización, de aproximadamente 35 a aproximadamente 70% del material vegetal molido puede pasar a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm. En una realización, aproximadamente 50% o más del material vegetal molido puede pasar a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm. En una realización, aproximadamente 90% o más del material vegetal molido puede pasar a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm. En una realización, todo el material vegetal molido puede pasar a través de un tamiz con una malla de 0,1-0,5 mm.
 40

Fraccionamiento

45 En una realización, el material vegetal se puede fraccionar en uno o más componentes. Por ejemplo, un material vegetal tal como un grano de cereal o maíz se puede fraccionar en componentes tales como fibra (por ejemplo, fibra de maíz), germen (por ejemplo, germen de maíz), y una mezcla de almidón y proteína (por ejemplo, una mezcla de almidón de maíz y proteína de maíz). Uno o una mezcla de estos componentes se puede fermentar en un proceso según la presente invención. El fraccionamiento de maíz u otro material de plantas se puede realizar mediante cualquier variedad de métodos o aparatos. Por ejemplo, se puede usar un sistema fabricado por Satake para fraccionar material de plantas tal como maíz.

50 Sacarificación y fermentación

Sacarificación

55 El presente proceso puede incluir transformar material de plantas reducido en azúcares que pueden fermentar mediante un microorganismo tal como levadura. Esta transformación se puede efectuar por sacarificación del material de plantas reducido con cualquiera de la variedad de composiciones de enzimas sacarificantes. En una realización, la composición de enzimas sacarificantes incluye una amilasa, tal como una alfa amilasa (por ejemplo, amilasa ácida fúngica). La preparación de enzimas también puede incluir glucoamilasa. La preparación de enzimas no necesita proteasa, y, en una realización, no la incluye. Sin embargo, los métodos de producción de etanol según

la presente invención pueden conservar agua reutilizando agua de proceso (vinaza reciclada) que puede contener proteasa. En una realización, el presente método usa amilasa ácida fúngica para hidrolizar almidón sin procesar.

5 La sacarificación se puede llevar a cabo sin cocinado. Por ejemplo, la sacarificación se puede llevar a cabo mezclando la fuente de composición de enzimas sacarificantes (por ejemplo, enzimas comerciales), levadura, e ingredientes de fermentación con grano molido y aguas de proceso sin cocinar.

10 En una realización, la sacarificación puede incluir mezclar el material de plantas reducido con un líquido, que puede formar una pasta o suspensión y añadir composición de enzimas sacarificantes (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa) al líquido. En una realización, el método incluye mezclar el material de plantas reducido y líquido y después añadir la composición de enzimas sacarificantes (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa). Alternativamente, la adición de la composición de enzimas puede preceder o darse simultáneamente con el mezclado.

15 En una realización, el material de plantas reducido se puede mezclar con líquido de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% en peso, de aproximadamente 25 a aproximadamente 45 (por ejemplo, 44) % en peso, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 (por ejemplo, 39) % en peso, o de aproximadamente 35% en peso de material de plantas reducido en un líquido se refiere al porcentaje de sustancia seca de material de plantas reducido o sólidos secos. En una realización, el método de la presente invención puede transformar almidón sin procesar o nativo (por ejemplo, en material de plantas reducido seco) en etanol a una velocidad más rápida a niveles más altos de sólidos secos comparado con sacarificación convencional con cocinado. Aunque no limita la presente invención, se cree que el presente método se puede realizar a niveles más altos de sólidos secos porque, al contrario que el proceso convencional, no incluye gelatinificación, lo que incrementa la viscosidad.

20 Líquidos adecuados incluyen agua y una mezcla de agua y aguas de proceso, tal como vinazas (vinaza reciclada), agua residual, condensado o destilado del evaporador, agua de depuración de la destilación, u otras aguas de proceso de la planta de etanol. En una realización, el líquido incluye agua en una mezcla con aproximadamente 1 a aproximadamente 70% en volumen de vinazas, de aproximadamente 15 a aproximadamente 60% en volumen de vinazas, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50% en volumen de vinazas, o aproximadamente 40% en volumen de vinazas.

25 En el proceso convencional que emplea gelatinificación y licuefacción, las vinazas proporcionan nutrientes para la fermentación de levaduras eficaz, especialmente amino nitrógeno libre (FAN) requerido por las levaduras. La presente invención puede proporcionar fermentación eficaz con niveles reducidos de vinazas e incluso sin vinaza añadida. En una realización, el presente método emplea una preparación de material de plantas que provee suficiente cantidad y calidad de nitrógeno para la fermentación eficaz bajo condiciones de gravedad alta (por ejemplo, en presencia de niveles altos de material de plantas reducido). Así, en una realización, nada o sólo niveles bajos de vinaza pueden ser suficientes.

30 Sin embargo, el presente método proporciona la flexibilidad de emplear niveles altos de vinaza si se desea. El presente método no emplea licuefacción convencional. La licuefacción convencional incrementa la viscosidad de la mezcla de fermentación y las vinazas resultantes. El presente método produce vinazas de viscosidad más baja. Por lo tanto, en una realización, se pueden emplear niveles incrementados de vinazas en el presente método sin detrimento del incremento de viscosidad de la mezcla de fermentación o vinazas resultantes.

35 Además, aunque no es limitante de la presente invención, se cree que los procesos convencionales de sacarificación y fermentación requieren adición de FAN debido a "reacciones de Maillard" indeseables que se dan durante gelatinización y licuefacción a alta temperatura. Las reacciones de Maillard consumen FAN durante el cocinado. Como resultado, el proceso convencional requiere adición de vinazas para incrementar los niveles de FAN en la fermentación. Se cree que el presente proceso evita reacciones de Maillard inducidas por la temperatura y proporciona niveles incrementados de FAN en el material de plantas reducido, que se utiliza eficazmente por las levaduras en la fermentación.

40 La sacarificación puede emplear cualquiera de una variedad de fuentes de enzimas conocidas (por ejemplo, un microorganismo) o composiciones para producir azúcares fermentables a partir de material de plantas reducido. En una realización, la composición de enzimas sacarificantes incluye una amilasa, tal como una alfa amilasa (por ejemplo, amilasa ácida fúngica) o una glucoamilasa.

45 En una realización, la sacarificación se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 6,0 o menos, pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,5, o de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,0. El pH inicial de la mezcla de sacarificación se puede ajustar mediante la adición de, por ejemplo, amoníaco, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, aguas de proceso (por ejemplo, vinazas (vinaza reciclada), condensado del evaporador (destilado), posos de depuración, y similar), y similares. La actividad de ciertas composiciones de enzimas sacarificantes (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa) se puede realzar a pH más bajo que a intervalos superiores.

En una realización, la sacarificación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C o de aproximadamente 30 a aproximadamente 35°C.

5 En una realización, la sacarificación se puede llevar a cabo empleando cantidades de composición de enzima sacarificante (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa) seleccionada para mantener concentraciones bajas de dextrina en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de composición de enzimas sacarificantes (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa) seleccionada para mantener maltotriosa (DP3) a niveles o por debajo de aproximadamente 0,2% en peso o a nivel o por debajo de aproximadamente 0,1% en peso. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de composición de enzimas sacarificantes (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa) seleccionada para mantener dextrina con un grado de polimerización de 4 o más (DP4+) a niveles o por debajo de aproximadamente 1% en peso o a niveles o por debajo de aproximadamente 0,5% en peso. Para mantener niveles bajos de maltotriosa y/o DP4+, niveles adecuados de amilasa ácida fúngica y glucoamilasa incluyen de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU/gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de amilasa ácida fúngica y de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 (por ejemplo, 2,4) AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de glucoamilasa. En una realización, la mezcla de reacción incluye de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU/gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de amilasa ácida fúngica y de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de glucoamilasa.

20 En una realización, la sacarificación se puede llevar a cabo empleando cantidades de composición de enzima sacarificante (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa) seleccionada para mantener concentraciones bajas de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de composición de enzimas sacarificantes (por ejemplo, al menos una amilasa ácida fúngica y glucoamilasa) seleccionada para mantener maltosa a niveles o por debajo de aproximadamente 0,3% en peso. Para mantener niveles bajos de maltosa, niveles adecuados de amilasa ácida fúngica y glucoamilasa incluyen de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU/gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de amilasa ácida fúngica y de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 (por ejemplo, 2,4) AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de glucoamilasa. En una realización, la mezcla de reacción incluye de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU/gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de amilasa ácida fúngica y de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC) de glucoamilasa.

Amilasa ácida fúngica

35 En ciertas realizaciones, el presente método emplea una α -amilasa. La α -amilasa puede ser una producida por hongos. La α -amilasa puede ser una caracterizada por su capacidad para hidrolizar hidratos de carbono bajo condiciones ácidas. Una amilasa producida por hongos y capaz de hidrolizar hidratos de carbono bajo condiciones ácidas es referida en la presente memoria como amilasa ácida fúngica, y también es conocida como una α -amilasa fúngica estable en ácido. La amilasa ácida fúngica puede catalizar la hidrólisis de almidón parcialmente hidrolizado y oligosacáridos grandes a azúcares tal como glucosa. La amilasa ácida fúngica que se puede emplear en el presente proceso se puede caracterizar por su capacidad para ayudar a la hidrólisis de almidón si procesar o nativo, mejorando la sacarificación proporcionada por glucoamilasa. En una realización, la amilasa ácida fúngica produce más maltosa que α -amilasas convencionales (por ejemplo, bacteriana).

40 Amilasa ácida fúngica adecuada se puede aislar a partir de cualquier variedad de especies de hongos, incluyendo especies de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Entomophtora*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. En una realización, la amilasa ácida fúngica es estable térmicamente y se aísla a partir de especies de *Aspergillus*, tales como *A. niger*, *A. saitoi* o *A. oryzae*, a partir de especies de *Mucor* tales como *M. pusillus* o *M. miehei*, o a partir de especies de *Endothia* tal como *E. parasitica*. En una realización, la amilasa ácida fúngica se aísla a partir de *Aspergillus niger*. La actividad de la amilasa ácida fúngica se puede proporcionar como una actividad en una preparación de glucoamilasa, o se puede añadir como una enzima separada. Una amilasa ácida fúngica adecuada se puede obtener de Novozymes, por ejemplo en combinación con glucoamilasa.

50 La cantidad de amilasa ácida fúngica empleada en el presente proceso puede variar según la actividad enzimática de la preparación de amilasa. Cantidades adecuadas incluyen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 unidades amilasa ácida fúngica (AFAU) por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, sólidos secos de maíz (DSC)). En una realización, la mezcla de reacción puede incluir de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU/gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC). En una realización, la mezcla de reacción puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU/gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC).

Glucoamilasa

En ciertas realizaciones, el presente método puede emplear una glucoamilasa. La glucoamilasa también es conocida como amilogucosidasa y tiene el nombre sistémico 1,4-alfa-D-glicano glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.3). La

glucoamilasa se refiere a una enzima que elimina unidades de glucosa sucesivas a partir de extremos no reductores de almidón. Por ejemplo, ciertas glucoamilasas pueden hidrolizar enlaces glucosídicos tanto lineales como ramificados de almidón, amilosa y amilopectina. Se conocen una diversidad de glucoamilasas adecuadas y disponibles comercialmente. Por ejemplo, proveedores como Novozymes y Genencor proporcionan glucoamilasas. La glucoamilasa puede ser de origen fúngico.

La cantidad de glucoamilasa empleada en el presente proceso puede variar según la actividad enzimática de la preparación de amilasa. Cantidades adecuadas incluyen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 6,0 unidades de glucoamilasa (AGU) por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo DSC). En una realización, la mezcla de reacción puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo DSC). En una realización, la mezcla de reacción puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 (por ejemplo, 2,4) AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo DSC). En una realización, la mezcla de reacción puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo DSC). En una realización, la mezcla de reacción puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo DSC). En una realización, la mezcla de reacción puede incluir de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo DSC).

Fermentación

El presente proceso incluye fermentar azúcares a etanol a partir de material de plantas reducido. La fermentación se puede efectuar mediante un microorganismo, tal como levadura. La mezcla de fermentación no necesita, y en una realización no lo hace, incluir proteasa. Sin embargo, el agua de proceso puede contener proteasa. La cantidad de proteasa puede ser menos que la usada en el proceso convencional. Según la presente invención, la fermentación se lleva a cabo sobre una composición de almidón que no se ha cocinado. En una realización, el presente proceso de fermentación produce alcohol potable. El alcohol potable tiene sólo niveles aceptables, no tóxicos de otros alcoholes, tal como aceite de fusel. La fermentación puede incluir poner en contacto una mezcla que incluye azúcares a partir de material de plantas reducido con levadura bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de la levadura y producción de etanol. En una realización, la fermentación emplea la mezcla de sacarificación.

Se puede emplear cualquiera de una variedad de levaduras como la levadura estándar en el presente proceso. Levaduras adecuadas incluyen cualquiera de una variedad de levaduras disponibles comercialmente, tal como cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*. Cepas adecuadas incluyen "Fali" (Fleischmann's), Thermosac (Alltech), Ethanol Red (LeSafre), BioFerm AFT (North American Bioproducts), y similares. En una realización, la levadura se selecciona para proporcionar velocidades de crecimiento y fermentación rápidas en presencia de alta temperatura y niveles altos de etanol. En una realización, se ha encontrado que la levadura Fali tiene buen comportamiento según la medición del contenido final de alcohol que es mayor de 17% en volumen.

La cantidad de levadura estándar empleada se selecciona para producir eficazmente una cantidad comercialmente significativa de etanol en un tiempo adecuado, por ejemplo, menos de 75 horas.

La levadura se puede añadir a la fermentación mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos para añadir levaduras a procesos de fermentación. Por ejemplo, se puede añadir levadura estándar mediante un lote seco, o por acondicionamiento/propagación. En una realización, la levadura estándar se añade como una inoculación única. En una realización, la levadura se añade a la fermentación durante el llenado del fermentador a un velocidad de 2 a 45 kilogramos de levadura seca activa (ADY) por 378.500 litros de masa de fermentación (de 5 a 100 libras de ADY por 100.000 galones de masa de fermentación). En una realización, la levadura se puede aclimatar o acondicionar incubando de aproximadamente 2 a 23 kilogramos de ADY por 37.850litros de volumen de volumen de fermentador (de 5 a10 libras de ADY por 10.000 galones de volumen por volumen de fermentador) en una tanque de prefermentación o propagación. La incubación puede ser de 8 a 16 horas durante la etapa de propagación, que también se airea para realzar el crecimiento de levaduras. El prefermentador usado para inocular el fermentador principal puede ser de una capacidad de 1 a 10% de volumen del fermentador principal, por ejemplo, de 2,5 a 5% en volumen de capacidad relativa con respecto al fermentador principal.

En una realización, la fermentación se lleva a cabo a pH de aproximadamente 6 o menos, pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6, de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, de aproximadamente 4 a aproximadamente 4,5, o de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5. El pH inicial de la mezcla de fermentación se puede ajustar por adición de, por ejemplo, amoniaco, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, aguas de proceso (por ejemplo vinazas (vinaza reciclada), condensado del evaporador (destilado), posos de destilación, y similares), y similares.

Aunque no limita la presente invención, se cree que levaduras de destilería conocidas crecen bien en el intervalo de pH de 3 a 6, pero son más tolerantes a pH más bajo de 3 que la mayoría de cepas bacterianas contaminantes. Las bacterias contaminantes ácido lácticas y acéticas crecen mejor a pH 5,0 y superior. Así, en el intervalo de pH de 3,0 a 3,5, se cree que predominará la fermentación de etanol porque la levadura crecerá mejor que la bacteria contaminante.

5 En una realización, el presente método puede incluir variación de pH. Se cree que la variación de pH puede llevar a reducir la probabilidad de contaminación temprana en fermentación y/o incrementar el crecimiento de levadura y fermentación durante las etapas más tardías de la fermentación. Por ejemplo, la fermentación puede incluir rellenar el fermentador a pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4,5 durante la primera mitad del llenado. La fermentación puede incluir incrementar el pH de la pasta a pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6 durante la segunda mitad del ciclo de llenado del fermentador. La fermentación puede incluir mantener el pH mediante la adición de pasta de sustrato fresca a pH deseado como se describió anteriormente. En una realización, durante la fermentación (después del llenado), el pH no se ajusta. Más bien, en esta realización, el pH se determina mediante el pH de los componentes durante el llenado.

10 En una realización, el pH disminuye a aproximadamente cinco (5) o por debajo en el agua e proceso del maíz. En una realización, el pH es aproximadamente pH 4 (por ejemplo, 4,1) al inicio del llenado de la fermentación y se incrementa a aproximadamente pH 5 (por ejemplo, pH 5,2) hacia el final del llenado de la fermentación. En una realización, el método incluye frenar el control de pH de la pasta de masa después de que el cultivo de levadura se hace estable durante el proceso inicial de llenado del fermentador, y después permitir al pH variar en el agua de proceso del maíz durante las últimas etapas de llenado del fermentador.

15 En una realización, la fermentación se lleva a cabo durante aproximadamente 25 (por ejemplo 24) a aproximadamente 150 horas, de aproximadamente 25 (por ejemplo, 24) a aproximadamente 96 horas, de aproximadamente 40 a aproximadamente 96 horas, de aproximadamente 45 (por ejemplo, 44) a aproximadamente 96 horas, de aproximadamente 48 (por ejemplo, 47) a aproximadamente 96 horas. Por ejemplo, la fermentación se puede llevar a cabo durante aproximadamente 35, aproximadamente 45, aproximadamente 55, o aproximadamente 75 horas.

20 En una realización, la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C o de aproximadamente 30 a aproximadamente 35°C. En una realización, durante la fermentación la temperatura disminuye de aproximadamente 40°C a aproximadamente 30°C o aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 35°C a aproximadamente 30°C durante la primera mitad de la fermentación, y la temperatura se mantiene a la temperatura más baja durante la segunda mitad de la fermentación. En una realización, la temperatura puede disminuir a medida que se produce etanol. Por ejemplo, en una realización, durante la fermentación la temperatura puede ser tan alta como aproximadamente 37°C (99°F) y después reducirse a aproximadamente 26°C (79°F). Esta reducción de temperatura se puede coordinar con el incremento de concentración (%) de etanol en el fermentador.

25 En una realización, el presente método incluye almacenamiento de sólidos. El almacenamiento de sólidos incluye rellenar los sólidos a un nivel desproporcionadamente más alto durante la fase inicial del ciclo de llenado del fermentador para incrementar la velocidad inicial de fermentación. La concentración de sólidos de la masa que entra al fermentador puede disminuir a medida que la concentración de etanol aumenta y/o a medida que el ciclo de llenado del fermentador se acerca a completo. En una realización, la concentración de sólidos puede ser aproximadamente 40% (por ejemplo 41%) durante la primera mitad de llenado del fermentador. Esto puede disminuir a aproximadamente 25% después de que el fermentador esté lleno al 50% y continuar hasta que concluya el ciclo de llenado del fermentador. En el ejemplo anterior, tal estrategia da como resultado un fermentador lleno con sólidos al 33%.

30 Se cree que el almacenamiento de sólidos puede acelerar la velocidad de hidrólisis enzimática y estimular un comienzo rápido de la fermentación por el uso de llenado de sólidos inicial más alto. Se cree que bajando los sólidos en la primera mitad del llenado se puede reducir la presión osmótica relacionada con los efectos de estrés sobre la levadura. Manteniendo el llenado de sólidos en el fermentación global en un intervalo determinado de fermentabilidad, el almacenamiento de sólidos mejora la capacidad de la levadura de fermentar masa de gravedad alta hacia el final de la fermentación.

Sacarificación y fermentación simultánea

El presente proceso puede incluir transformar simultáneamente material de plantas reducido a azúcares y fermentar esos azúcares con un microorganismo tal como levadura. Se puede llevar a cabo sacarificación y fermentación simultánea usando los reactivos y condiciones descritos anteriormente para sacarificar y fermentar.

50 En una realización, se lleva a cabo sacarificación y fermentación a una temperatura de aproximadamente 25 a aproximadamente 40°C o de aproximadamente 30 a aproximadamente 35°C. En una realización, durante la sacarificación y fermentación la temperatura disminuye de aproximadamente 40 a aproximadamente 25°C o de aproximadamente o de aproximadamente 35 a aproximadamente 30°C durante la primera mitad de la sacarificación, y la temperatura se mantiene a la temperatura más baja durante la segunda mitad de la sacarificación.

55 Aunque no limita la presente invención, se cree que temperaturas tempranas más altas durante la sacarificación y fermentación puede incrementar la transformación de almidón a azúcar fermentable cuando las concentraciones de etanol son bajas. Esto puede ayudar a incrementar el rendimiento en etanol. A concentraciones de etanol más altas, este alcohol puede afectar adversamente a la levadura. Así, se cree que temperaturas posteriores más bajas

durante la sacarificación y fermentación son beneficiosas para disminuir el estrés sobre la levadura. Esto puede ayudar a incrementar el rendimiento en etanol.

5 También sin limitar la presente invención, se cree que temperaturas tempranas más altas durante la sacarificación y fermentación pueden reducir la viscosidad durante al menos una parte de la fermentación. Este puede ayudar al control de la temperatura. También se cree que temperaturas posteriores más bajas durante la sacarificación y fermentación son beneficiosas para reducir la formación de glucosa después de que la levadura ha parado la fermentación. La formación tardía de glucosa en la fermentación puede ser perjudicial para el color del producto de destilado de grano seco.

10 En una realización, la sacarificación y fermentación se lleva a cabo a pH de aproximadamente 6,0 o menos, pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,5, o de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,0. El pH inicial de la mezcla de sacarificación y fermentación se puede ajustar por adición de, por ejemplo, amoníaco, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, aguas de proceso (por ejemplo vinazas (vinaza reciclada), condensado del evaporador (destilado), posos de destilación, y similares), y similares.

15 En una realización, la sacarificación y fermentación se lleva a cabo durante aproximadamente 25 (por ejemplo 24) a aproximadamente 150 horas, de aproximadamente 25 (por ejemplo, 24) a aproximadamente 72 horas, de aproximadamente 45 a aproximadamente 55 horas, de aproximadamente 50 (por ejemplo, 48) a aproximadamente 96 horas, de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 horas, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 horas. Por ejemplo, la sacarificación y fermentación se puede llevar a cabo durante aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60 o aproximadamente 70 horas. Por ejemplo, la sacarificación y fermentación se puede llevar a cabo durante aproximadamente 35, aproximadamente 45, aproximadamente 55, aproximadamente 65 o aproximadamente 75 horas.

20 En una realización, la sacarificación y fermentación simultánea se puede llevar a cabo empleando cantidades de enzimas y levaduras seleccionadas para mantener concentraciones altas de levadura y niveles altos de brote de la levadura en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionada para mantener levaduras a o por encima de aproximadamente 300 células/ml o a aproximadamente 600 células/ml.

25 En una realización, la sacarificación y fermentación simultánea se puede llevar a cabo empleando cantidades de enzima y levadura seleccionada para una fermentación eficaz sin añadir nitrógeno exógeno; sin añadir proteasa; y/o sin añadir vinaza reciclada. Se puede añadir vinaza reciclada, si se desea, para consumir agua de proceso y reducir la cantidad de agua residual producida por el proceso. Además, el presente proceso mantiene viscosidad baja durante la sacarificación y fermentación.

30 Por ejemplo, la sacarificación y fermentación simultánea puede emplear amilasa ácida fúngica de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 6 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC). Por ejemplo, la sacarificación y fermentación simultánea puede emplear amilasa ácida fúngica de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC). Por ejemplo, la sacarificación y fermentación simultánea puede emplear amilasa ácida fúngica de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC).

35 En una realización, la sacarificación y fermentación simultánea se puede llevar a cabo empleando cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener concentraciones bajas de glucosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener la glucosa a niveles de o por debajo de aproximadamente 2% en peso, de o por debajo de aproximadamente 1% en peso, de o por debajo de aproximadamente 0,5% en peso, o de o por debajo de aproximadamente 0,1% en peso. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener glucosa a niveles de o por debajo de aproximadamente 2% en peso durante la sacarificación y fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionada para mantener glucosa a niveles de o por debajo de aproximadamente 2% en peso a partir de las horas 0-10 (o desde 0 a aproximadamente 15% del tiempo) de sacarificación y fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener la glucosa a niveles de o por debajo de aproximadamente 1% en peso, de o por debajo de aproximadamente 0,5% en peso, de o por debajo de aproximadamente 0,1 % en peso a partir de las horas 12-54 (o desde aproximadamente 15% a aproximadamente 80% del tiempo) de sacarificación y fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener la glucosa a niveles de o por debajo de aproximadamente 1% en peso a partir de las horas 54-66 (o desde aproximadamente 80% a aproximadamente 100% del tiempo) de sacarificación y fermentación. Niveles adecuados de enzima incluyen amilasa ácida fúngica de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU por gramos de

40

45

50

55

60

5 sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC). Por ejemplo, la sacarificación y fermentación simultánea puede emplear amilasa ácida fúngica de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC).

10 En una realización, la sacarificación y fermentación simultánea se puede llevar a cabo empleando cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener concentraciones bajas de maltosa (DP2) en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener la maltosa a niveles de o por debajo de aproximadamente 0,5% en peso, o de o por debajo de aproximadamente 0,2 % en peso. Niveles adecuados de enzima incluyen amilasa ácida fúngica de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC). Por ejemplo, la sacarificación y fermentación simultánea puede emplear amilasa ácida fúngica de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC).

20 En una realización, la sacarificación y fermentación simultánea se puede llevar a cabo empleando cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener concentraciones bajas de dextrina en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener la maltotriosa (DP3) a niveles de o por debajo de aproximadamente 0,5% en peso, de o por debajo de aproximadamente 0,2 % en peso, o de o por debajo de aproximadamente 0,1% en peso. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener la dextrina con un grado de polimerización de 4 o más (DP4+) a niveles de o por debajo de aproximadamente 1% en peso o de o por debajo de aproximadamente 0,5% en peso. Niveles adecuados de enzima incluyen amilasa ácida fúngica de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC). Por ejemplo, la sacarificación y fermentación simultánea puede emplear amilasa ácida fúngica de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC).

35 En una realización, la sacarificación y fermentación simultánea se puede llevar a cabo empleando cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener concentraciones bajas de aceites de fusel en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el presente proceso puede emplear cantidades de enzima y levadura seleccionadas para mantener aceites de fusel a niveles de o por debajo de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5% en peso. Niveles adecuados de enzima incluyen amilasa ácida fúngica de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC). Por ejemplo, la sacarificación y fermentación simultánea puede emplear amilasa ácida fúngica de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 AFAU por gramos de sólidos secos de material de plantas reducidos (por ejemplo, DSC) y glucoamilasa de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,5 AGU por gramo de sólidos secos de material de plantas reducido (por ejemplo, DSC).

Ingredientes adicionales para sacarificación y/o fermentación

45 La mezcla de sacarificación y/o fermentación puede incluir ingredientes adicionales para incrementar la eficacia del proceso. Por ejemplo, la mezcla puede incluir nutrientes añadidos (por ejemplo, micronutrientes de levadura), antibióticos, sales, enzimas añadidas, y similares. Los nutrientes pueden derivar a partir de vinazas o vinaza reciclada añadida al líquido. Sales adecuadas incluyen sales de zinc o manganeso, tal como sulfato de zinc, sulfato magnésico, y similares. Enzimas añadidas adecuadas incluyen aquellas que se añaden en procesos convencionales, tales como proteasa, fitasa, celulasa, hemicelulosa, exo- y endo- glucanasa, xilanasa, y similares.

50 Recuperación de etanol de la cerveza

El producto del proceso de fermentación es referido en la presente memoria como "cerveza". Por ejemplo, la fermentación de maíz produce "cerveza de maíz". El etanol se puede recuperar de la mezcla de fermentación, de la cerveza, mediante cualquiera de una variedad de procesos conocidos. Por ejemplo, el etanol se puede recuperar por destilación.

55 La vinaza que queda incluye material tanto líquido como sólido. El líquido y sólido se pueden separar, por ejemplo, por centrifugación. El líquido recuperado, vinaza diluida, se puede emplear como al menos parte del líquido para formar la mezcla de sacarificación y fermentación para lotes o tiradas posteriores.

Los sólidos recuperados, destilados de grano seco, incluyen sólidos de grano sin fermentar y restos de sólidos de levadura. La vinaza diluida se puede concentrar a jarabe, que se puede añadir al destilado de grano seco y la mezcla y después secar para formar destilado de grano seco más sustancias solubles. El destilado de grano seco y/o destilado de grano seco más sustancias solubles se puede vender como alimento para animales.

5 Combustión de almidones residuales para fermentación posterior

En una realización, el presente método puede incluir tratamiento térmico de la cerveza o vinaza, por ejemplo, entre el tanque de cerveza y destilación. Este tratamiento térmico puede transformar los almidones a dextrinas y azúcares para fermentación posterior en un proceso conocido como combustión. Tal etapa del tratamiento también puede reducir la suciedad de las bandejas de destilación y las superficies del evaporador que intercambian calor. En una realización, la etapa de tratamiento térmico se puede llevar a cabo sobre las vinazas totales. Después del tratamiento enzimático sobre el almidón residual, las dextrinas y azúcares que resultan se pueden fermentar en el proceso de fermentación principal como vinaza reciclada o procesada en un turno de fermentación separado para producir etanol.

Fraccionamiento de sólidos de la fermentación

15 Los trozos grandes de germen y fibra pueden fermentar el almidón residual en el fermentador. Después de la fermentación, las fracciones se podrían eliminar antes o después de la destilación. La eliminación se puede efectuar con una espumadera antes de la destilación. En una realización, se puede realizar filtrado de la cerveza. Después el material filtrado se puede separar de la mezcla etanol/agua por, por ejemplo, centrifugación y secado de tambor rotatorio de vapor, que puede eliminar el etanol residual de la torta. En realizaciones en las que se eliminan piezas
20 más grandes de fibra y germen antes de la destilación de la cerveza por lotes, se puede utilizar una columna de depuración separada para el caudal de fibra/germen. Alternativamente, se puede eliminar fibra y germen por filtrado de la vinaza total después de la destilación.

En una realización, todos los componentes se mezclan y secan juntos. La fibra y germen se pueden eliminar del producto terminado por aspiración y/o clasificación por tamaño. La fibra del DDGS (destilado de grano seco con sustancias solubles) se puede aspirar. La eliminación de fibra por aspiración después del secado incrementa la cantidad de aceite y proteína en el DDGS residual de 0,2 a 1,9% y de 0,4 a 1,4%, respectivamente. La cantidad de FND (fibra neutro detergente) en el DDGS residual disminuye de 0,1 a 2,8%.

En una realización, el fraccionamiento puede emplear los trozos de fibra y germen más grandes para incrementar el tamaño de partícula de la parte de DDGS que viene del endospermo, así como para mejorar la capacidad de vehículo del jarabe. Un anillo desintegrador de secado puede proporcionar algo de reducción del tamaño de partícula y homogenización.

Fermentación continua

El presente proceso se puede hacer por un proceso en lotes o continuo. Un proceso continuo incluye mover (bombear) las mezclas de sacarificación y/o fermentación a través de una serie de depósitos (por ejemplo, tanques)
35 para proporcionar una duración suficiente al proceso. Por ejemplo, se puede emplear un sistema de fermentación de etapas múltiples para un proceso continuo con un tiempo de residencia de 48-96 horas. Por ejemplo, el material de plantas reducido se puede introducir por arriba de un primer depósito para sacarificación y fermentación. Después la mezcla parcialmente incubada y fermentada se puede extraer por la parte de abajo del primer depósito e introducirse por arriba de un segundo depósito, y así sucesivamente.

Aunque no es limitante de la presente invención, se cree que el presente método es más adecuado que métodos convencionales para realizarse como un proceso continuo. Se cree que el presente método proporciona menos oportunidades de crecimiento de organismos contaminantes en un proceso continuo. Actualmente, la mayoría de las instalaciones de etanol molido seco emplean tecnología de fermentación en lotes. Esto se debe en parte a la dificultad de evitar pérdidas debido a la contaminación en esos procesos convencionales. Para fermentación
45 continua eficaz que usa tecnología de licuefacción tradicional, la creencia convencional es que una etapa de sacarificación separada antes de la fermentación es necesaria para pre-sacarificar la masa antes para fermentar. Tal pre-sacarificación asegura que hay glucosa fermentable adecuada para el proceso de fermentación continuo.

El presente método logra producción eficaz de concentraciones altas de etanol sin una etapa de licuefacción o sacarificación antes de la fermentación. Esto es sorprendente ya que esta sabiduría convencional muestra que es necesario tener niveles adecuados de azúcar fermentable disponible durante el proceso de fermentación cuando se practica de un modo continuo. Por el contrario el presente método puede proporcionar concentraciones bajas de glucosa y fermentación eficaz. En el presente método, parece que la glucosa se consume rápidamente por las células de levadura que la fermentan. Se cree que tales niveles bajos de glucosa reducen el estrés sobre las levaduras, tal estrés es causado por presión de inhibición osmótica y contaminación bacteriana. Según la presente
50 invención, se pueden lograr niveles de etanol mayores de 18% en volumen en aproximadamente 45 a aproximadamente 96 horas.

Destilado de grano seco con características físicas mejoradas

La presente invención también se refiere a destilados de grano seco con una o más características físicas mejoradas, tal como disminución del cuajado o compactación o incremento de la capacidad de fluir. El presente proceso puede producir tal destilado de grano seco mejorado.

5 Aunque no es limitante de la presente invención, se cree que el presente proceso puede producir sólidos de fermentación que incluyen formas de hidratos de carbono de alto peso molecular. Tales sólidos de fermentación, se cree, muestran una temperatura de transición vítrea más alta (es decir, valores T_g más altos). Por ejemplo, los almidones residuales tienen un valor T_g más alto. Así, a través del control del contenido de almidón en el DDG y DDGS, el presente proceso puede fabricar DDG o DDGS con valores T_g objetivo.

10 Además, según la presente invención, la adición de una combinación de jarabe alcalino (por ejemplo, jarabe más cal añadida u otro material alcalino) a los sólidos de fermentación (por ejemplo, destilado de grano seco) puede proporcionar disminución del cuajado o compactación y aumento de la capacidad de fluir al destilado de grano seco con sustancias solubles (DDGS).

15 Aunque no es limitante de la presente invención, se cree que ácidos orgánicos tales como ácidos láctico, acético y succínico que se producen en la fermentación tiene un valor T_g más bajo que sus correspondientes sales de calcio. El mantenimiento de hidratos de carbono residuales en forma de alto peso molecular, o la adición de cal para formar sales de calcio de ácidos orgánicos, son dos estrategias para formar co-productos con valores T_g más altos que tendrán menos probabilidad de sufrir transición vítrea, dando como resultado el fenómeno de deterioro conocido como cuajado.

20 Aunque no es limitante de la presente invención, se cree que el proceso de la presente invención puede no necesitar destruir proteína en el material de plantas fermentado. El maíz contiene prolaminas, tal como zeína. El sorgo en grano, por ejemplo, contiene una clase de proteínas similar a zeína conocidas como kafirinas, que se parecen a zeína en la composición de aminoácidos. La degradación termal que se da durante la licuefacción, destilación, y temperatura alta durante el proceso produce DDG y DDGS incluye cantidades significativas de proteína degradada. Se cree que el proceso de la presente invención puede proporcionar niveles mejorados de la fracción de prolamina de granos de cereal.

25 Se cree que una exposición prolongada a concentraciones altas de alcohol que se puede lograr mediante el presente proceso puede condicionar las proteínas en el material de plantas. Este puede solubilizar algunas de las proteínas. Por ejemplo, se cree que en destilación la concentración de etanol alcanza niveles que puede solubilizar prolaminas (por ejemplo, zeína) en la cerveza. Después de eliminar, o "depurar", el etanol de la cerveza, se pueden recuperar las prolaminas (tal como la zeína) concentradas en DDG y DDGS. El contenido de DDG y DDGS rico en proteína que resulta puede ser ventajoso para diversos usos finales de DDG y DDGS, por ejemplo en procesado o composición posterior.

30 En una realización, la fermentación eficaz del presente proceso elimina componentes sin zeína de DDG o DDGS tal como almidón. El fraccionamiento del material de plantas, por ejemplo maíz, también puede incrementar los niveles de proteínas, tal como zeína, en DDG o DDGS. Por ejemplo, la eliminación de las fracciones de salvado y germen antes de la fermentación puede concentrar zeína en el sustrato. La zeína en maíz se aísla en el endospermo. La fermentación de endospermo enriquecido con zeína da como resultado concentración de la zeína en los residuos de la fermentación.

35 En una realización, el proceso de la presente invención puede proporcionar DDG y DDGS con valores de T_g diferentes, predeterminados. El proceso de la presente invención puede fermentar fracciones que contienen niveles altos, medios o bajos de zeína, variando así la temperatura de transición vítrea de DDG o DDGS que resulta. La T_g del co-producto que resulta puede ser directamente proporcional al contenido de proteína prolamina (tal como zeína). El proceso de la presente invención es deseable para la fermentación de maíz rico en proteína. Esto también permite la producción de DDG y DDGS con un contenido de prolamina (zeína) más alto.

40 El almidón residual que queda al final de la fermentación preferentemente se separa en la fracción de vinaza diluida, que posteriormente se evapora para producir jarabe. La fracción de torta húmeda producida por el presente método, que se puede secar por separado para producir DDG, puede ser más rica en proteína prolamina (tal como zeína) que DDG convencional. El presente proceso permite variar la proporción de combinación del jarabe y la torta húmeda. Esto da como resultado DDG/DDGS con proporciones variables entre proteína prolamina (tal como zeína) y almidón residual. A medida que el almidón residual se reduce en la torta húmeda la proteína incrementa en la torta húmeda. Esto indica una relación inversa. Una respuesta similar se da en la fracción de jarabe.

45 Se cree que el almidón se puede separar en la fracción líquida. La cantidad de almidón en DDGS puede variar combinando jarabe a velocidades que van de 0 kg (libras) de peso seco de sólidos de jarabe a 0,6 kg (1,2 libras) de sólidos de jarabe por kg (libra) de sólidos de torta húmeda antes, y a tiempos diversos durante el secado para crear el producto DDGS final. Esta separación desproporcionada de almidones residuales en la vinaza reciclada o fracción de vinaza diluida puede proporcionar que en estas fracciones se de lo anteriormente señalado combustión y fermentación secundaria. Debido a que la vinaza diluida se evapora para producir jarabe, el equilibrio de masa

centrifugada también permite la producción de DDGS con diversos valores de T_g dependiendo de las propiedades deseadas y de su dependencia de T_g .

La presente invención puede ser entendida mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Se pretende que estos ejemplos sean representativos de realizaciones específicas de la invención, y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción de destilado de grano seco mejorado a partir de maíz

Se empleó un método según la presente invención para preparar destilado de grano seco a partir de maíz. Este método produce destilado de grano seco rico en proteína, rico en grasa, y rico en fibra. Comparándolo con un proceso convencional de sacarificación y licuefacción indica un rendimiento superior del presente método.

Materiales y métodos

Fermentación de almidón sin procesar

Se preparó inóculo de levadura añadiendo glucoamilasa (0,088 ml de Novozyme's Spirizyme Plus glucoamilasa a 400 AGU/g) y proteasa (0,018 ml de Genencor International's GC 106 proteasa 1000 SAPU/g) a 400 ml de vinaza que contenían 70 gramos de maltodextrina. La vinaza (vinaza reciclada) usada se preparó a partir de fermentaciones previas convencionales o de almidón sin procesar por destilación del alcohol y sometiendo la vinaza entera resultante a separación centrífuga para producir vinaza reciclada. También se añadieron 1,07 gramos de urea, 0,13 gramos de sulfato de zinc, y 0,00067 ml de una disolución 1:1000 de antibiótico (Alltech Lactocide). Se añadieron aproximadamente 300-400 millones células/ml (*Saccharomyces cerevisiae*) (0,48 g de levadura Fleischmann's Fali) viables a esta mezcla y la propagación se llevo a cabo sin remover, o agitando, durante 8 horas a una temperatura de incubación de 32°C (90°F). Los matraces se giraban periódicamente bajo condiciones suaves para efectuar mezclado del contenido. El cultivo de levadura resultante (10,8 ml) se añadió directamente a cada fermentador para inoculación.

Se obtuvo maíz de proveedores comerciales de semilla de maíz y creció a través de una malla de 0,5 mm usando un molino de martillo antes de la fermentación. Se compararon diversas variedades de maíz dentado amarillo número 2, y en diversos experimentos también se probó su equivalente isogénico de maíz ceroso. Se probaron diversas variedades de maíz para demostrar que los presentes métodos producen DDG mejorado usando cualquiera de una variedad de híbridos de maíz.

Se mezclaron aproximadamente 129 a 134 gramos del maíz adecuado con aproximadamente 225 ml de agua. Se ajustaron los volúmenes reales de harina (maíz molido) y agua para cada fermentador en base al contenido de humedad de la harina de modo que todas las fermentaciones se hacían con aproximadamente 33,4 gramos de sólidos secos de maíz por 100 gramos de agua (33,4% SSM). Todos los fermentadores de almidón sin tratar se ajustaron a pH 5,0 con ácido sulfúrico.

Las fermentaciones se llevaron a cabo a 28°C (82°F). Se añadió antibiótico (Alltech Lactocide 3 mg) a cada lote de fermentación. Las fermentaciones de almidón sin procesar emplearon una preparación de glucoamilasa disponible comercialmente (Novozyme's Spilizyme Plus 0,317 ml de GAU/ml) que también incluye actividad de amilasa ácida fúngica.

Las fermentaciones se llevaron a cabo durante 72 horas con muestreos que se llevaron a cabo a intervalos de aproximadamente 24 horas (por ejemplo, 25). Todas las muestras se analizaron mediante HPLC. Al final de la fermentación las muestras de cerveza se colocaron en cazuelas de metal, el pH disminuyó a <3,5 para inactivar la actividad enzimática residual, y se secaron.

Fermentación convencional

Se realizó preparación de inóculo de levadura y molienda de maíz para dar harina de maíz según se describió anteriormente para la fermentación de almidón sin procesar.

Para las fermentaciones se empleó el proceso convencional, no fue necesario el ajuste del pH; el pH natural del agua y harina de maíz era de 5,8 a 6,0. Las fermentaciones convencionales empezaron con una etapa de sacarificación y cocinado para licuar el almidón en la mezcla. La etapa de cocinado se llevó a cabo durante 60 minutos a una temperatura de 85°C. Se añadieron 0,044 ml de Novozymes Liquozyme SC Alpha-amilasa (0,044 ml de Novozymes Liquozyme SC 120 AFAU (KNU/ml) a la masa de maíz licuada.

Las fermentaciones convencionales también se hicieron a 28°C (82°F) e incluían antibiótico (3 mg de antibiótico Alltech Lactocide). Se añadió proteasa (0,0047 ml de proteasa GC 106 (1000 SAPU/g/ml) y 0,64 ml de licor de urea al 50% (urea industrial de grado 50%) a los fermentadores usando el proceso convencional. Se añadió una glucoamilasa (0,095 ml de Genencor International's GC 480 glucoamilasa a 400 AGU/ml) comercialmente disponible

ES 2 398 216 T3

para fermentación. De lo contrario, las fermentaciones generalmente se llevaban a cabo como se describió anteriormente para fermentaciones de almidón sin procesar.

Resultados y discusión

Los resultados de la fermentación se muestran en la tabla 1 y se resumen en la tabla 2.

5

Tabla 1A: comparación del impacto del proceso sobre análisis inmediatos de DDGS

Híbrido de maíz	Azúcares residuales como glucosa (%)		% ácidos láctico y acético	
	Conv	RSH	Conv	RSH
Híbrido A amarillo nº2	2,57	0,58	0,09	0,06
Híbrido B amarillo nº2	1,67	0,84	0,09	0,06
Par isogénico ceroso y híbrido B	1,70	2,11	0,10	0,06
Híbrido C amarillo nº2	1,18	0,62	0,08	0,06
Par isogénico ceroso y híbrido C	1,43	1,49	0,10	0,07
Híbrido D amarillo nº2	0,84	0,49	0,06	0,05
Par isogénico ceroso y híbrido D	0,58	0,89	0,06	0,07
Híbrido E ceroso	1,15	0,50	0,10	0,06
Híbrido F amarillo nº2	1,86	0,61	0,11	0,07
Híbrido G ceroso	1,23	0,97	0,12	0,09
Par isogénico hetero ceroso y híbrido G	1,14	0,39	0,10	0,07
Media	1,40	0,86	0,09	0,07

Tabla 1B: comparación del impacto del proceso sobre análisis inmediatos de DDGS

Híbrido de maíz	% glicerol		% almidón		% proteína		% grasa		% FND	
	Conv	RSH	Conv	RSH	Conv	RSH	Conv	RSH	Conv	RSH
Híbrido A amarillo nº2	1,09	0,86	6,86	22,24	31,25	32,15	11,05	13,65	20,45	29,00
Híbrido B amarillo nº2	1,12	0,77	2,78	21,14	31,90	33,20	13,30	17,00	24,90	32,30
Par isogénico ceroso y híbrido B	1,11	0,75	1,97	14,35	31,10	30,40	14,30	16,40	25,30	34,10
Híbrido C amarillo nº2	1,20	0,85	1,68	17,51	31,50	33,80	15,00	21,30	22,00	31,00
Par isogénico ceroso y híbrido C	1,13	0,82	1,79	9,92	30,00	29,70	15,20	17,10	24,60	37,40

ES 2 398 216 T3

Híbrido de maíz	% glicerol		% almidón		% proteína		% grasa		% FND	
	Conv	RSH	Conv	RSH	Conv	RSH	Conv	RSH	Conv	RSH
Híbrido D amarillo nº2 Par isogénico ceroso y híbrido D	1,03	0,74	0,83	14,61	36,40	37,60	11,90	14,80	23,40	28,90
	1,06	0,78	1,11	3,39	33,30	34,20	12,80	15,70	24,60	31,70
Híbrido E ceroso Híbrido F amarillo nº2	1,11	0,76	0,65	1,90	35,60	35,90	11,60	13,30	26,90	29,90
	1,17	0,78	3,27	15,99	31,80	31,10	12,50	13,30	28,10	33,10
Híbrido G ceroso Par isogénico hetero ceroso y híbrido G	1,11	0,84	10,49	1,04	39,70	41,10	12,10	14,00	20,30	23,70
	1,05	0,84	12,15	13,74	36,60	38,90	8,96	10,90	20,80	26,50
Media	1,11	0,80	3,96	12,35	33,56	34,37	12,61	15,22	23,76	30,69

Tabla 2: comparación del impacto del proceso sobre análisis inmediatos de DDGS (resumen)

Análisis inmediato	Proceso	
	Convencional	Almidón sin procesar
Almidón	3,96	12,35
Proteína	33,56	34,37
Grasa	12,61	15,22
Fibra	23,76	30,69
Ceniza	4,06	4,29
Desconocido	22,05	3,08
Suma	100,00	100,00

5 Una característica interesante del proceso con almidón sin procesar es que da como resultado un destilado de grano seco con sustancias solubles (DDGS) con niveles iguales o más altos de diversos componentes, incluso cuando parece que la eficacia de la fermentación, medida por el almidón residual, disminuye para el proceso con almidón sin procesar. Se esperaría que, con la eficacia más baja, los otros componentes del DDGS deberían ser más bajos en base al equilibrio de masa. El proceso con almidón sin procesar aparentemente da como resultado menos daño en los constituyentes del grano.

10 Otra característica interesante del proceso con almidón sin procesar es el rendimiento mejorado que se da usando híbridos de maíz ceroso. El maíz ceroso está casi completamente compuesto por amilopectina almidón, donde el maíz amarillo nº2 tiene aproximadamente 25 a 28% de amilosa almidón siendo el restante amilopectina. El maíz ceroso generalmente no se usa en el proceso convencional debido a la alta viscosidad punta y velocidad de desarrollo de la viscosidad más rápida comparado con maíz normal. La viscosidad inicial alta hace que la masa de maíz sea más difícil de bombear durante la licuefacción primaria inicial a alta temperatura. Sin embargo, las variedades de maíz ceroso se pueden usar inmediatamente en el presente proceso. Debido a que no se usa etapa de cocinado, la alta viscosidad punta no es un problema de procesado.

Ejemplo 2. El presente proceso proporciona rendimiento potencial mejorado

El rendimiento potencial del método de la presente invención se comparó con un proceso convencional. El presente método mostró rendimiento mejorado usando etapa de temperatura. El presente método mostró un rendimiento

potencial máximo incrementado para la producción de etanol. La comparación con el proceso de sacarificación y licuefacción convencional indica comportamiento superior del presente método.

Material y métodos

- 5 Se prepararon las fermentaciones de un modo similar que en el ejemplo 1 excepto por diferencias intencionadas en el tamaño de partícula, dosis de enzima alfa-amilasa, dosis de enzima gluco-amilasa, o dosis de enzima amilasa ácida fúngica. Las condiciones de este experimento se describen en la tabla 3. El maíz para todas las pruebas se obtuvo de Broin Enterprises (BEI), Escocia, Dakota del Sur, EEUU. El maíz que representa un tamaño de partícula grueso para los estándares de almidón sin procesar se molió en BEI. El maíz molido fino se produjo usando un molino de martillo de laboratorio a través de un filtro de 0,5 mm.
- 10 El proceso convencional utilizó los niveles indicados de Liquozyme SC y GC 480. El proceso de almidón sin procesar utilizó los niveles indicados de Spirizyme Plus y SP 288 amilasa ácida fúngica a 1.700 AFAU por gramo. Las dosis de licor de urea, sulfato de zinc, y antibiótico se ajustaron según el proceso convencional. La vinaza (vinaza reciclada) usada se preparó del proceso previo de fermentaciones de almidón sin procesar por destilación del alcohol y sometiendo la vinaza total resultante a separación centrífuga para producir vinaza reciclada. Las
- 15 temperaturas de fermentación se dividieron en etapas según los siguientes intervalos de puntos: 0-18 horas a 32°C (90°F), 18-42 horas a 30°C (86°F), y 42-72 horas a 28°C (82°F). Se tomaron muestras a 65 horas para representar el final de la fermentación.

Resultados y discusión

- 20 El objetivo de estos experimentos era ilustrar la sensibilidad de los dos procesos a cambios en el grado de dosis de enzimas y comparar las diferencias en el % de etanol y almidón residual. Los resultados se muestran en la tabla 3 y las figuras 1A, 1B, 1C, 1D y 1E. El impacto del tamaño de molienda y dosis de enzima de los dos procesos es aparente. Señalar que la amilasa ácida fúngica SP 288 es eficaz en acceder al almidón sin procesar. Parece que la amilasa ácida fúngica mejora la capacidad de acceder al almidón de modo que el tamaño de molienda es menos eficaz sobre el rendimiento cuando SP 288 está presente. El presente proceso logra rendimientos en alcohol
- 25 significativamente mejores para niveles de almidón residual equivalentes o más altos. La figura 1B ilustra un efecto similar del tamaño de molienda sobre el rendimiento en etanol en el proceso convencional, y demuestra la importancia del nivel de dosis de GA sobre el acceso al almidón en partículas de grano grueso.

- La extrapolación de los resultados para ambos procesos, convencional y almidón sin procesar, mostrado en las figuras 1A y 1B a niveles cero de almidón residual revela una realización del proceso de almidón sin procesar. A medida que los niveles de almidón residual disminuyen en base a la mejora de la eficacia de transformación, este proceso puede lograr % de etanol más alto que los procesos convencionales. Por ejemplo, en ausencia de almidón residual, el presente proceso en este ejemplo produciría 21,3% de volumen de etanol pero el proceso convencional sólo produciría 20,6% de volumen de etanol. El presente proceso potencial del nuevo proceso comparado con el proceso existente se muestra en las figuras 1C y 1D. Estas figuras resumen el resultado para ambos procesos que se realizan bajo tamaño de molido variable y combinaciones de dosis de enzimas. La figura 1C ilustra el potencial del nuevo proceso para producir más alcohol que el proceso convencional, incluso cuando los niveles de alcohol residual son más altos. La sabiduría convencional sugiere que el proceso con almidón sin procesar es menos eficaz debido a los niveles más altos de almidón residual, sin embargo, este no es el caso. El presente proceso es superior al método convencional. Señalar que la eficacia de la fermentación también se puede valorar examinando los posos sólidos de la fermentación. Esto se muestra en la serie de datos que comparan ambos procesos en la figura 1D. Debido a que todas las fermentaciones de los ejemplos anteriores empezaron con el mismo ajuste inicial de sólidos, menos posos sugiere una mayor eficacia de la transformación de almidón en etanol. El potencial de este proceso también se indica por el logro de un nivel de posos igual o reducido, a pesar del mayor almidón residual observado.

- La figura 1E muestra la temperatura en etapas hecha durante el presente proceso. Las temperaturas de fermentación se establecieron según los siguientes intervalos de puntos: 0-18 horas a aproximadamente 32°C (90°F) (en el intervalo de aproximadamente 35°C (95°F) a aproximadamente 32°C (90°F)), 18-42 horas a aproximadamente 30°C (86°F) (en el intervalo de aproximadamente 32°C (90°F) a aproximadamente 30°C (86°F)), y 42-72 horas a aproximadamente 28°C (82°F) (en el intervalo de aproximadamente 30°C (86°F) a aproximadamente 29°C (84°F)). La temperatura por intervalos ayuda a incrementar el proceso de producción de etanol reduciendo el estrés sobre la levadura. La temperatura disminuye a medida que se produce el etanol para reducir el estrés sobre la levadura causado por la producción de etanol.

ES 2 398 216 T3

Tabla 3: comparación del rendimiento potencial del proceso convencional frente al de almidón sin procesar

Proceso de fermentación convencional									
Molienda usada	Dosis de enzimas		Cantidades de agua de proceso		Harina de maíz % peso	Sólidos secos de la pasta			
	AA (ml)	GA (ml)	Agua (ml)	Vinaza reciclada %					
BEI	0,04	0,08	285	40	190	35,91	Baja	16,21	19,49
BEI	0,04	0,12	285	40	190	35,89	Baja	17,57	14,69
BEI	0,06	0,08	285	40	190	35,90	Media	16,22	15,44
BEI	0,06	0,12	285	40	190	35,89	Media	17,22	14,03
BEI	0,08	0,08	285	40	190	35,89	Alta	15,93	16,72
BEI	0,08	0,12	285	40	190	35,88	Alta	17,47	12,78
0,5 mm	0,04	0,08	295	40	176	35,85	Baja	16,78	15,64
0,5 mm	0,04	0,12	295	40	176	35,83	Baja	18,40	9,58
0,5 mm	0,06	0,08	295	40	176	35,84	Media	16,57	15,77
0,5 mm	0,06	0,12	295	40	176	35,83	Media	18,19	10,36
0,5 mm	0,08	0,08	295	40	176	35,83	Alta	16,92	16,48
0,5 mm	0,08	0,12	295	40	176	35,82	Alta	18,31	9,27

Proceso de fermentación con almidón sin procesar									
Molienda usada	Dosis de enzimas		Cantidades de agua de proceso		Harina de maíz % peso	Sólidos secos de la pasta			
	AA (ml)	GA (ml)	Agua (ml)	Vinaza reciclada %					
BEI	0,00	0,34	285	40	190	36,35	Baja	17,53	22,37
BEI	0,03	0,34	285	40	190	36,35	Baja	19,19	14,45
BEI	0,00	0,42	285	40	190	36,32	Media	17,82	19,65
BEI	0,03	0,42	285	40	190	36,32	Media	19,14	11,15
BEI	0,00	0,53	285	40	190	36,28	Alta	18,11	19,83
BEI	0,03	0,53	285	40	190	36,28	Alta	19,13	12,80
0,5 mm	0,00	0,34	295	40	176	36,31	Baja	18,20	19,30
0,5 mm	0,03	0,34	295	40	176	36,31	Baja	19,22	13,54
0,5 mm	0,00	0,42	295	40	176	36,28	Media	18,51	17,24
0,5 mm	0,03	0,42	295	40	176	36,28	Media	19,56	10,50
0,5 mm	0,00	0,53	295	40	176	36,24	Alta	18,75	16,38

Tamaño malla (mm)	N°12	N°16	N°20	N°25	N°30	N°35	Bandeja	Tamaño tamiz
		1,70 mm	1,18 mm	0,85 mm	0,71 mm	0,60 mm	0,50 mm	<0,50 mm
Molienda BEI	0,02	0,26	2,53	7,91	12,14	20,80	54,96	Porcentaje sobre bandeja
0,5 mm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	

Proceso	AA	GA
Convencional	Liquozyme SC	GC 480
Almidón sin procesar	SP 288	Spirizyme Plus

Ejemplo 3. El presente proceso muestra resultados mejorados con niveles incrementados de amilasa ácida fúngica y niveles incrementados de glucoamilasa

- 5 Se evaluaron los resultados de una realización del método de la presente invención con niveles incrementados de amilasa ácida fúngica y niveles incrementados de glucoamilasa. Los niveles incrementados de amilasa ácida fúngica mejoraron los resultados con el presente proceso. El incremento de los niveles de glucoamilasa mejoró los resultados con el presente proceso.

Materiales y métodos

- 10 Se probó glucoamilasa (Novozymes Spirizyme Plus) y amilasa ácida fúngica (Novozymes SP 288) en fermentaciones de almidón sin procesar de una modo similar al ejemplo 2, usando la molienda gruesa.

Resultados y discusión

- 15 El objetivo de esta prueba era examinar el efecto de un intervalo de dosis de glucoamilasa y amilasa ácida fúngica sobre la producción de etanol y otros productos a partir de hidrólisis de fermentaciones de almidón sin procesar. En particular, dosis por encima de 0,3 AFAU por gr de sólidos secos de maíz para amilasa ácida fúngica y dosis por encima de 0,3 AGU por gramo de sólidos secos de maíz producen más alcohol y más glucosa residual invariablemente. Más glucosa invariablemente indica que estas fermentaciones tienen el potencial de incluso más rendimiento en etanol.

- 20 Estos resultados sugieren que glucoamilasa y amilasa ácida fúngica actúan sinérgicamente para acceder al almidón sin procesar y transformar el almidón en azúcar fermentable. Ver las figuras 2A, 2B y 2C.

Ejemplo 4. Impacto de la molienda o del tamaño de partícula del grano reducido sobre la eficacia de la fermentación

Se evaluaron los resultados de una realización del método de la presente invención con tamaño de partícula variable del material de planta molido. Los tamaños de partícula más pequeño mejoraron los resultados con el presente proceso.

- 25 Materiales y métodos

- 30 Se realizaron series de moliendas con molino de martillo a escala de laboratorio para generar harina que tenía tamaño de partículas desde grueso a relativamente fino. Las fermentaciones de almidón sin procesar se ajustaron de un modo similar al del ejemplo 2. La harina de maíz usada como sustrato se molió con un molino de martillo de laboratorio para pasar a través de mallas de abertura 0,5 mm, 2,0 mm, y 2,4 mm. Las condiciones de la prueba se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: impacto del tamaño de partícula molida y dosis de glucoamilasa sobre la eficacia de la fermentación

Tamaño molienda (mm)	Resultados del filtro										Partícula	
	N°12	N°16	N°20	N°25	N°30	N°35	Bandeja	Tamaño (mm)	Abertura de la malla del tamaño de filtro estándar (mm)			
								Peso medio				
Lab 0,5	1,70	1,18	0,85	0,71	0,60	0,50	<0,50					
Lab 0,2	0,00	0,00	1,0	3,6	2,0	9,0	85,0					
Lab 2,4	0,1	0,4	2,1	5,7	2,4	15,0	72,8					

Resultados de la fermentación a 24 horas mediante HPLC													
Tamaño de partícula molino de martillo (mm)	Dosis de enzima AGU por gramo DSC	Etanol % vol	Hidratos de carbono residuales % peso						Subproductos % peso			Sólidos totales %	Almidón residual %ps
			DP4+	DP3	Malta	Gluc	Fruc	Glyc	Láct	Acét			
0,5	1,0	13,47	0,37	0,02	ND	0,03	0,15	0,92	0,05	ND	19,6		
2,0	1,0	12,68	0,36	0,02	ND	0,03	0,08	0,94	0,05	ND	18,9		
2,4	1,0	12,71	0,37	0,02	ND	0,03	0,14	0,95	0,05	ND	18,9		
0,5	1,5	14,15	0,39	0,02	ND	0,04	0,08	0,91	0,05	ND	17,9		
2,0	1,5	13,72	0,37	0,02	ND	0,04	0,08	0,93	0,05	ND	17,8		
2,4	1,5	13,86	0,38	0,02	0,01	0,04	0,08	0,94	0,05	ND	17,3		

Resultados de la fermentación a 48 horas mediante HPLC												
Tamaño de partícula molino de martillo (mm)	Dosis de enzima AGU por gramo DSC	Etanol % vol	Hidratos de carbono residuales % peso					Subproductos % peso			Sólidos totales %	Almidón residual %ps
			DP4+	DP3	Malta	Gluc	Fruc	Glyc	Láct	Acét		
0,5	1,0	17,73	0,38	0,02	0,02	0,02	0,10	1,05	0,06	ND	14,3	
2,0	1,0	17,31	0,38	0,02	0,02	0,02	0,10	1,09	0,06	ND	14,5	
2,4	1,0	17,10	0,38	0,02	0,02	0,02	0,10	1,08	0,06	ND	15,0	
0,5	1,5	18,36	0,42	0,03	0,02	0,03	0,09	1,05	0,05	ND	13,0	
2,0	1,5	18,23	0,40	0,02	0,02	0,02	0,08	1,09	0,06	ND	13,6	
2,4	1,5	18,14	0,41	0,02	0,02	0,02	0,09	1,07	0,06	ND	13,6	

Resultados de la fermentación a 72 horas mediante HPLC												
Tamaño de partícula molino de martillo (mm)	Dosis de enzima AGU por gramo DSC	Etanol % vol	Hidratos de carbono residuales % peso					Subproductos % peso			Sólidos totales %	Almidón residual %ps
			DP4+	DP3	Malta	Gluc	Fruc	Glyc	Láct	Acét		
0,5	1,0	18,99	0,40	0,02	0,02	0,05	0,10	1,10	0,06	ND	12,5	8,99
2,0	1,0	18,42	0,38	0,02	0,01	0,05	0,10	1,13	0,06	ND	12,8	11,34
2,4	1,0	18,54	0,39	0,02	0,02	0,05	0,10	1,14	0,06	ND	12,7	17,48
0,5	1,5	19,05	0,42	0,03	0,02	0,05	0,09	1,08	0,05	ND	11,8	6,81
2,0	1,5	18,78	0,40	0,02	0,02	0,05	0,09	1,11	0,06	ND	12,0	7,07
2,4	1,5	18,69	0,40	0,02	0,02	0,05	0,09	1,09	0,06	ND	12,2	8,72

Resultados y discusiones

Los resultados se muestran en la tabla 4 y figuras 3A, 3B, 3C, 3D. Los datos muestran que tamaño de molienda más pequeño proporciona rendimiento en etanol más alto y almidón residual más bajo. A dosis de glucoamilasa más baja, se requirió una dosis de enzima más alta para lograr los mismos resultados relativos.

- 5 Ejemplo 5. Impacto del tamaño de partícula molido, tipo de glucoamilasa, y dosis de amilasa ácida fúngica sobre la eficacia de la fermentación

Se evaluaron los resultados de una realización del método de la presente invención con tamaño de partícula variable del material de plantas molido, variando el tipo de glucoamilasa, y la dosis de amilasa ácida fúngica.

Materiales y método

- 10 Se obtuvo maíz entero y harina de maíz de Dakota Ethanol LLC en Wentworth, DS. El maíz entero se molió pasando a través de un filtro de 2,0 mm como en los ejemplos anteriores usando un molino de martillo de laboratorio. Las fermentaciones se ajustaron de un modo similar que en ejemplos anteriores según el esquema de la tabla 5.

Tabla 5: impacto del tamaño de partícula molida, tipo de glucoamilasa y dosis de amilasa ácida fúngica sobre la eficacia de la fermentación

Tamaño filtro (mm)	Nº12	Nº16	Nº20	Nº25	Nº30	Nº35	Bandeja	Tamaño filtro
	1,70	1,18	0,85	0,71	0,60	0,50	<0,50	Tamaño poro (mm)
2,0 mm	0,0	0,2	1,4	3,2	3,6	15,3	73,0	"molienda más fina"
Molino de martillo nº7 de planta	10,2	18,9	14,0	7,4	3,8	7,9	38,1	"molienda más gruesa"

Esquema experimental para el ejemplo 5											
Dosis AFAU por gramo DSC			Actividad AGU por gramo DSC								
A partir de SP 288	A partir de GA	AFAU total	A partir de SP 288	GA unidades/g DSC	AGU total unidades/g DSC	Molido de harina	GA L-400 usada	Nº fermentador			
0	0,20	0,20	0,00	1,10	1,10	Fina	Spirizyme+	1			
0,20	0,20	0,39	0,02	1,10	1,12	Fina	Spirizyme+	2			
0,59	0,20	0,78	0,05	1,10	1,15	Fina	Spirizyme+	3			
0,00	0,20	0,20	0,00	1,10	1,10	Gruesa	Spirizyme+	4			
0,20	0,20	0,39	0,02	1,10	1,12	Gruesa	Spirizyme+	5			
0,59	0,20	0,78	0,05	1,10	1,15	Gruesa	Spirizyme+	6			
0,00	0,08	0,20	0,00	1,10	1,10	Fina	Distillase	7			
0,20	0,08	0,39	0,02	1,10	1,12	Fina	Distillase	8			
0,59	0,08	0,78	0,05	1,10	1,15	Fina	Distillase	9			
0,00	0,08	0,20	0,00	1,10	1,10	Gruesa	Distillase	10			
0,20	0,08	0,39	0,02	1,10	1,12	Gruesa	Distillase	11			
0,59	0,08	0,78	0,05	1,10	1,15	Gruesa	Distillase	12			

Resultados a 72 horas												
Fermentador nº	Etanol %	Hidratos de carbono residuales % peso						Subproductos % peso			Sólidos totales %	Almidón residual %ps
		DP4+	DP3	Malta	Gluc	Fruc	Glyc	Láct	Acét			
1	17,84	0,36	0,01	0,01	0,01	0,12	0,89	0,07	ND	15,31	17,09	
2	18,17	0,36	0,01	0,01	0,01	0,12	0,89	0,06	ND	15,12	16,53	
3	18,57	0,36	0,01	0,01	0,02	0,12	0,90	0,06	ND	14,72	16,31	
4	19,46	0,45	0,02	0,03	0,28	0,16	0,92	0,04	ND	14,36	15,14	
5	19,65	0,44	0,02	0,04	0,57	0,17	0,92	0,04	ND	14,49	14,97	
6	19,74	0,42	0,01	0,04	0,59	0,19	0,90	0,04	ND	14,40	13,81	
7	14,42	0,37	0,01	0,01	ND	0,05	0,65	0,16	ND	20,24	36,27	
8	15,89	0,37	0,01	0,01	ND	0,10	0,77	0,07	ND	16,68	27,24	
9	17,25	0,37	ND	0,01	0,01	0,11	0,86	0,06	ND	15,97	20,43	
10	17,19	0,46	0,01	0,01	0,01	0,10	0,80	0,05	ND	18,19	31,43	
11	18,35	0,44	0,01	0,01	0,03	0,14	0,87	0,05	ND	16,16	24,07	
12	19,30	0,42	0,01	0,01	0,06	0,15	0,92	0,05	ND	14,95	18,01	

Resultados y discusión

Los resultados del fermentador final se muestran en las figuras 4A, 4B y 4C. Enzimas glucoamilasas convencionales tal como Distillase de Genencor International contenían un nivel muy bajo de actividad amilasa ácida fúngica. Spirizyme Plus contenía aproximadamente 2,5 veces más de actividad AFAU por ml de enzima y exhibía mejor comportamiento para hidrolizar almidón sin procesar. La amilasa ácida fúngica SP 288 contenía un nivel relativamente bajo de glucoamilasa.

Fue posible llegar a entender la importancia del tamaño de la molienda, nivel de dosis de glucoamilasa, y nivel de dosis de amilasa ácida fúngica sobre el rendimiento de la fermentación. Se obtuvieron resultados mejorados cuando se combinó molienda “más fina” con glucoamilasa que contenía niveles enriquecidos de amilasa ácido fúngica. Con una molienda más gruesa, niveles de dosis más altas de glucoamilasa que incluyen amilasa ácida fúngica dan rendimiento mejorado de la fermentación. La glucoamilasa que incluye amilasa ácido fúngica proporciona beneficiosa medida que disminuye el tamaño de molienda.

Ejemplo 6. Impacto de la carga de sólidos secos en el fermentador y la temperatura sobre la cinética del fermentador y rendimiento en etanol

Se empleó una realización de la presente invención para producir etanol a partir de maíz. Este proceso producía cerveza de maíz rica en alcohol, y destilado de grano seco rico en proteína, rico en grasa y rico en fibra. La comparación con procesos de sacarificación y licuefacción convencionales indican rendimiento superior del presente método.

Materiales y métodos

El ejemplo 6 se ajustó de un modo similar a los ejemplos anteriores excepto que variaron los sólidos iniciales de fermentación y la temperatura como se describe en la presentación de los resultados.

Resultados

Una característica interesante del presente proceso de fermentación de almidón sin procesar es la capacidad para realizar la velocidad de fermentación a través del incremento del contenido de sólidos o la temperatura inicial de fermentación. La carga de sólidos, temperatura, tamaño de molienda, dosis de glucoamilasa, dosis de amilasa ácida fúngica, y dosis de levadura se puede combinar para incrementar el rendimiento de la fermentación de almidón sin procesar. Las figuras 5A, 5B, 5C, 5D, 5E, 5F, 5G, 5H y 5J ilustran la influencia de la temperatura a diferente carga de sólidos.

Los valores de almidón residual señalados en este ejemplo sugieren que se puede usar la temperatura para mejorar la eficacia de fermentaciones de almidón sin procesar a fermentación de gravedad intermedia, que se definen como niveles sólidos de fermentación que tendrían un rendimiento en etanol entre 15% a 18%. La temperatura de fermentación se podría usar para acelerar fermentaciones de almidón sin procesar de modo que terminen en menos de 48 horas, aunque aún no hayan logrado niveles de alcohol de 15% a 18%, con niveles de almidón residual aceptables. El incremento de los ajustes de la fermentación ayudaría a acelerar la transformación enzimática de almidón nativo a glucosa, lo que parece que es la etapa de velocidad limitante en el proceso de almidón sin procesar. El rendimiento de la fermentación usando ajuste de temperatura más alta es un aspecto del proceso para intervalos de etanol intermedios, especialmente cuando se ve desde la perspectiva de los ejemplos anteriores que establecen que las fermentaciones de almidón sin procesar pueden tolerar un nivel más alto de almidón residual en los granos secos destilados residuales y con destilados de grano seco con sustancias solubles, y aún producen calidad excelente de DDG o DDGS según el análisis inmediato. Alternativamente, la sustancia seca de la fermentación de almidón sin procesar se puede incrementar aproximadamente un 20% para incrementar la velocidad de fermentación, mientras se produce más alto contenido de alcohol en el fermentador y más DDGS con calidad excelente incluso si los niveles de almidón residual son altos. Equilibrando los aspectos anteriores, rendimiento frente a optimización de capacidad económica se puede hacer con una disminución significativa de la dificultad. La facilidad de operar a gravedad alta, capacidad de proceso alta mientras se produce DDGS vendible se realiza significativamente por el proceso de almidón sin procesar.

Ejemplo 7. Aspectos ventajosos de producción de etanol por el presente proceso

Se realizaron una diversidad de fermentaciones y los resultados se evaluaron y recopilaron para demostrar la producción incrementada de alcohol y producción de destilado de grano seco del presente proceso.

Producción de etanol

El presente método producía etanol que estaba contenido en cerveza de maíz con más etanol de 18% en volumen. Los procesos producían al menos 18% de volumen de etanol y hasta 23% de volumen de etanol en 48 a 96 horas de incubación y fermentación. La cerveza contenía estos niveles altos de etanol incluso cuando también incluía niveles altos de almidón residual. Después de 24 horas de incubar y fermentar la cerveza de maíz contenía 9-16,5 o 12-15% de volumen de etanol. Después de 48 horas de incubar y fermentar la cerveza de maíz contenía 13-20% de volumen

de etanol. La producción de etanol era lineal hasta un nivel de 14-16% de volumen. Una recopilación de los resultados de la producción de etanol a partir de varios procesos se ilustra al menos en las figuras 6A y 6B.

5 La cerveza contenía aproximadamente 0,4 a 0,5% en peso menos de glicerol que la fermentación convencional a condiciones de fermentación idénticas (figura 7). La cerveza contenía menos aceite extraído de la fracción de germen, dando como resultado menos olor y emisiones VOC menores en el vapor de agua durante el secado del producto residual de alimento para animales (tabla 1). La cerveza contenía menos aceite extraído de la fracción de germen, dando como resultado olor reducido y emisiones de CO menores en el vapor de agua durante el secado del producto residual de alimento para animales (tabla 1).la cerveza contenía menos aceite de fusel (figura 8), que inhibe el crecimiento de las células de levadura y fermentación si estos compuesto de alcohol se reciclan desintencionadamente en los posos de depuración de destilación. Los aceites de fusel también son componentes indeseables de las operaciones de fabricación de alcohol potable, por lo que el presente método ofrece un método de producción mejorado de alcohol potable. La cerveza también contiene menos ácido láctico y acético en relación con el proceso convencional. La cerveza también contiene recuentos de células de levadura más altos, lo que contribuye a mejorar productos alimentarios.

15 Además, el presente proceso mantiene las levaduras en o por encima de 300 células/ml en estos numerosos procesos. Se observó crecimiento de levaduras en al menos 40% de las levaduras a partir de 0-20 horas de incubación y fermentación y/o al menos 15-20% de las levaduras después de 60 horas de incubación y fermentación. Estos recuentos y crecimiento de levadura eran más altos que los observados en el proceso convencional.

20 Ejemplo 8. El presente proceso mantiene niveles bajos de glucosa, maltosa (DP2), maltotriosa (DP3) y dextrinas (DP4+)

Se compararon los niveles de de glucosa, maltosa (DP2), maltotriosa (DP3) y dextrinas (DP4+) producidos por un realización de la presente invención con un proceso convencional. El presente método mostraba niveles disminuidos de de glucosa, maltosa (DP2), maltotriosa (DP3) y dextrinas (DP4+) respectivamente. La comparación del nivel de glucosa con el proceso convencional indica rendimiento superior del presente método.

Materiales y métodos

Experimento 1

30 Se obtuvo maíz entero y harina de maíz de Dakota Ethanol LLC en Wentworth, DS. El maíz entero para los ejemplos de fermentación de etanol continua se molió a través de un filtro de 0,5 mm como en ejemplos anteriores usando un molino de martillo a escala de laboratorio. El maíz entero para los ejemplos SSF se molió a través de un filtro n° 4 usando un molino de martillo Bliss de escala comercial, que logró que aproximadamente 50% de la harina molida pasase a través de un filtro de 0,5 mm tal y como se midió en la prueba de malla de la harina.

35 Las fermentaciones en lotes se ajustaron de un modo similar que en el ejemplo 1. Se evaluó la fermentación de etanol continua en un sistema con bancada superior que consiste en un tanque refrigerado de pasta fría seguido de cinco (5) fermentadores que funcionan de modo continuo y termina con un recipiente de cerveza que recolecta la cerveza fermentada. El volumen de cada etapa de fermentación era aproximadamente dos (2) litros. Cuando funciona con una velocidad de caudal de masa de 1,5 a 2,0 ml por minuto, el tiempo medio de fermentación era aproximadamente noventa y seis (96) horas. Los sólidos medios de llenado del fermentador eran aproximadamente 30-35% de sólidos secos de maíz, dependiendo del contenido de maíz del sustrato. La pasta de masa para alimentar la fermentación se preparó cada 3 a 4 días y se mantuvo entre 6 a 12 grados centígrados para desalentar el crecimiento bacteriano en el tanque de alimentación.

40 El procedimiento de preparación de la masa no esterilizaba la masa antes de la fermentación, y la serie de fermentación se hizo sin adición de antibiótico para inhibir contaminantes bacterianos. La masa se almacenó a una temperatura fría para reducir la cantidad de trabajo requerido para la preparación del sustrato. Se añadió 15 a 20 ml de licor de urea al 50% al tanque de pasta fría, que tenía un volumen final de masa de aproximadamente 9.000 litros.

45 Cada fermentador de la serie continua se alimentó a partir del fermentador anterior, mientras que el primer fermentador se alimentó directamente del tanque de pasta fría. La temperatura de fermentación se mantuvo constante a 28°C (82°F) a lo largo de las cinco (5) etapas de fermentación. La glucoamilasa se dosificó en el primer fermentador para proporcionar una dosis de aproximadamente 2,0 a 2,4 AGU por gramo de sustancia seca de almidón. Se añadió levadura Fali, obtenida de Fleischmann's Yeast, a una velocidad de aproximadamente 0,65 gramos por litro de pasta preparada, y se dividió en lotes en la pasta fría cada vez que se preparaba masa fresca.

Experimento 2

55 Se ajustó un proceso de fermentación continua empleando el procedimiento descrito anteriormente para el experimento 1. Se tomaron mediciones de ácido láctico y acético a diversos tiempos y etapas durante el proceso de fermentación continua de etapas múltiples. Hacia el final del proceso, el pH inicial de la pasta aumentó a propósito,

como se muestra, para modificar el sistema microbiológicamente. En ciertas circunstancias, el pH de la pasta se bajo intermitentemente para mantener la contaminación bajo control (ver, por ejemplo, las figuras 16 A, 16B y 16C).

Experimento 3

5 Los datos en el experimento 3 se crearon a partir de los ejemplos de sistemas de fermentación continua descritos en los ejemplos 1, 2 y 8. Se midió el almidón residual usando un ensayo de almidón disponible comercialmente (el ensayo de almidón Megazyme®). Este ensayo funciona para muestras con contenido de almidón en el intervalo 0-100%, que lo hace aplicable para análisis de almidón residual así como pruebas de almidón en grano sin procesar. Este método es una prueba basada en transformación enzimática que usa alfa-amilasa y amiloglucosidasa para transformar almidón en glucosa. Después se mide la glucosa resultante mediante HPLC y se calcula el contenido de almidón.

Resultados y discusión

15 Las figuras 9A y 9B ilustran que el presente proceso mantenía niveles bajos de glucosa durante sacarificación y fermentación simultánea (SSF) y fermentaciones continuas de almidón sin procesar. Aunque no es limitante del presente proceso, se cree que este nivel bajo de glucosa reduce reacciones potenciales tales como reversión, condensación, o reacciones de pardeamiento de Maillard. Tales reacciones en cambio pueden reducir el rendimiento en etanol. Los datos recopilados en este ejemplo demuestran que el proceso mantenía la glucosa a niveles o por debajo de 3% en peso, para la totalidad del proceso y a niveles o por debajo de 1% en peso durante aproximadamente el 90% del proceso. En particular, el proceso mantenía la glucosa a niveles de o por debajo de 1% en peso desde 12-24 horas de incubación y fermentación.

20 Las figuras 10-12 ilustran que el presente proceso mantenía niveles bajos de dextrina durante SSF y fermentación continua de almidón sin procesar. Las figuras 10A y 10B ilustran que el presente proceso mantenía la maltosa (DP2) a niveles de o por debajo de aproximadamente 0,2% en peso durante sacarificación y fermentación simultánea y por debajo de aproximadamente 0,34% en peso durante fermentación continua de almidón sin procesar. Los datos mostrados en la figura 11A demuestran que el proceso mantenía niveles bajos de maltotriosa (DP3) durante sacarificación y fermentación simultánea a niveles de o por debajo de 0,2% en peso y a niveles o por debajo de 0,1% en peso. Los datos mostrados en la figura 11B demuestran que el presente proceso mantenía niveles bajos de maltotriosa (DP3) durante una fermentación continua de almidón sin procesar a niveles de o por debajo de 0,25% en peso.

30 Los datos mostrados en la figura 12A demuestran que el proceso mantenía niveles bajos de dextrinas (DP4+) durante sacarificación y fermentación simultánea a niveles de o por debajo de 1% en peso y a niveles o por debajo de 0,5% en peso. Los datos mostrados en la figura 12B demuestran que el presente proceso mantenía niveles bajos de dextrinas (DP4+) durante sistema continuo de almidón sin procesar a niveles de o por debajo de 0,3% en peso.

35 Los resultados del experimento 2 muestran que los niveles iniciales de pH de las pasta de hasta aproximadamente 5,8 en el presente método (figura 16A) dieron como resultado rendimientos en etanol aceptables y mantenían los contaminantes ácidos de la fermentación en una intervalo tolerable (por ejemplo, la fermentación no se inhibía). El porcentaje de ácido láctico permanecía menor de 0,45 (en la mayoría de los casos menor de 0,35) (figura 16B). El porcentaje de ácido acético permanecía menor de 0,18 (en la mayoría de los casos menor de 0,06) (figura 16C). Esta realización del presente método daba como resultado niveles invariablemente bajos de ácido láctico y acético a niveles de pH estables. Esto resultaba en mayor producción de etanol, que al menos probablemente en parte debido a menos estrés de las levaduras.

45 Los resultados del experimento 3 demuestran que una realización continua del presente método produce niveles de almidón residual más bajos que los producidos por el proceso convencional (figura 17). Los niveles de almidón residual producidos usando esta realización del presente método permanecen más bajos que los niveles de almidón residual del proceso convencional (figura 17). El porcentaje de almidón producido usando esta realización del presente método permanece aproximadamente veinte (por ejemplo, 21) o menos (figura 17) mientras que el porcentaje de almidón producido usando el proceso convencional era tan alto como 27 (figura 17).

Discusión

50 Aunque no es limitante de la presente invención, se cree que a medida que la glucosa se forma durante la fermentación, es rápidamente metabolizada por la levadura, lo que resulta en niveles de glucosa más bajos. El ligero incremento en glucosa observado al final de la fermentación sugiere una caída en la viabilidad de la levadura. De nuevo, sin limitar la presente invención, esto se puede explicar por una disminución en la viabilidad de la levadura y fermentación que da como resultado una velocidad de la producción de glucosa que excede la velocidad de utilización metabólica (la fermentación de glucosa no mantiene el ritmo de la producción).

55 Según una realización de la presente invención, se puede emplear temperatura por etapas para minimizar la producción residual de glucosa. Esto es, se puede reducir la temperatura de la fermentación a medida que la fermentación avanza. Se cree que, en general, por cada 10°C (18°F) de incremento de la temperatura, la velocidad de una reacción enzimática es aproximadamente el doble. En una realización del presente método, por ejemplo, la

acción enzimática se puede ralentizar disminuyendo la temperatura de la mezcla de fermentación después de un periodo de tiempo, tal como después de 30 horas. Se cree que el enfriamiento también mantiene la viabilidad de las levaduras, de modo que la fermentación puede continuar utilizando la glucosa que se ha formado. Existen variaciones comerciales convencionales de los procesos de etapas múltiples de fermentación continua. Uno de tales procesos convencionales incluyen realizar una etapa de sacarificación antes de la fermentación para proporcionar glucosa fermentable para una fermentación de levadura más rápida. El presente proceso no requiere una etapa de sacarificación antes de la fermentación y produce resultados mejorados. Otro proceso convencional continuo incluye airear el 1^{er} fermentador, y posiblemente el segundo fermentador para realzar el crecimiento de levaduras. El presente proceso proporciona resultados mejorados y no requiere aireación del fermentador. Algunos sistemas convencionales continuos emplean un método de reciclar levadura. El presente método no requiere reciclado de levaduras y proporciona resultados mejorados. Esta realización de la presente invención puede emplear sacarificación y fermentación simultánea de almidón sin procesar y puede operar a gravedad alta. En una realización, el método de la presente invención puede producir etanol a velocidades rápidas a pesar de la aparente falta de sustrato adecuado fermentable.

Una realización de producción continua de etanol del presente método mantenía niveles de acidez bajos a lo largo del ciclo de fermentación. Estos experimentos indican que una realización del presente método que emplea fermentación continua creaba niveles de ácido láctico y ácido acético bajos y manejables. Los niveles bajos de ácido láctico y acético pueden ser ventajosos para mantener un pH estable en la fermentación, y también puede disminuir el estrés de la levadura e incrementar la producción de etanol.

Una realización de producción continua de etanol del presente método mantenía niveles de almidón bajos a lo largo del ciclo de fermentación. La comparación del nivel de almidón residual presente con el proceso convencional proporciona una indicación de la realización ventajosa del presente método. El equilibrio de masa del presente proceso de almidón sin procesar sugiere que los almidones residuales de hecho pueden ser más altos en este proceso en relación con el convencional, mientras que aún logran rendimiento de etanol más alto y equilibrio de masa inmediato mejorado.

Ejemplo 9. El presente proceso produce DDGS son menos cuajado y compactación.

El DDGS según una realización de la presente invención se comparó con el producido por un proceso convencional. El presente método produce un DDGS inventado que muestra menos cuajado comparado con DDGS producido por el proceso convencional. El presente DDGS con menos cuajado es superior al DDGS convencional.

30 Materiales y métodos

El DDGS se recolectó como un subproducto de la producción de etanol a partir de procesos de licuefacción convencionales de temperatura alta y a partir de procesos de la presente invención. La prueba de cuajado/caída se llevo a cabo rellenado un cilindro de 500 ml con aproximadamente 400 ml de DDGS. Se prestó atención en evitar envasado físico de DDGS cuando se llenaba el cilindro. Después del llenado, se colocó un disco de 4,4 cm de diámetro y 78 gramos de peso encima de DDGS, seguido de la colocación de 1,5 kg de perdigones de plomo (en una bolsa de plástico de tamaño apropiado) encima del disco. La preparación del ensayo se completó cubriendo cada cilindro con una bolsa de plástico y sellando el aparato con una tira de goma para evitar pérdida de humedad. El peso aplicado al DDGS se usa para exagerar el efecto y acercar las condiciones a las DDGS se expone durante el transporte, por ejemplo, en un vagón. El nivel de DDGS se anota al principio del almacenamiento y a diversos tiempos durante el almacenamiento a una temperatura de 50°C. La altura medida del DDGS caído (cuajado) se comparó con la altura inicial del DDGS. La altura medida se comparó con la altura inicial como una estimación de la tendencia del producto a caer o cuajar.

Resultados

El DDGS de la presente invención muestra menos caída de cuajado a lo largo del tiempo (figura 13) cuando se compara con el DDGS del proceso convencional. Durante un tiempo de compactación de veinticinco horas el DDGS según la presente invención cayó sólo un 4-5% del volumen inicial comparado al 10-14% de la caída de volumen para DDGS del proceso convencional.

Discusión

La compactación de DDGS en condiciones controladas sirve de modelo al cuajado de DDGS observado en los contenedores de vehículos de transporte, por ejemplo vagones y camiones. El DDGS producido usando el proceso de esta invención muestra menos cuajado relacionado con caída que los del proceso convencional, lo que indica rendimiento superior del presente método.

Aunque no es limitante de la presente invención, se cree que la compactación observada concuerda con lo sugerido por la teoría de transición vítrea. Por ejemplo, la temperatura de transición vítrea incrementa con el peso molecular para polímeros tales como los encontrados en DDGS. El presente DDGS incluye niveles más altos de tales polímeros y debería mostrar una temperatura más alta de transición vítrea. Se cree que la humedad del producto, temperatura de almacenamiento, y composición química puede influir en la transición de DDGS de un cristal amorfo

a una fase de caucho amorfa. El DDGS en la fase de caucho compacta más inmediatamente que DDGS en la fase de cristal.

Ejemplo 10. El presente proceso puede emplear maíz rico en proteína para producir DDGS rico en proteína y niveles altos de etanol

- 5 En una realización, la presente invención puede incluir fermentar maíz rico en proteína para producir DDGS rico en proteína y niveles altos de etano. Esto proporciona flexibilidad ventajosa para procesar maíz rico en proteína.

Materiales y métodos

10 Se tomó DDGS como un co-producto de la producción de etanol a partir de la fermentación de diversos híbridos de maíz con fermentaciones ajustada de un modo similar que en el ejemplo 1. Todas las fermentaciones se ajustaron usando condiciones idénticas. Se probaron diferentes híbridos de maíz usando diversos tamaños de molienda usando un molino de martillo a escala de laboratorio. El tamaño de la malla del molino de martillo variaba de 0,5 mm a 4,0 mm para crear tamaño de partículas de harina que están en el intervalo desde finas (malla de 0,5 mm) a gruesas (4,0 mm).

Resultados

15 La figura 15A ilustra la dependencia del nivel de proteína en DDGS del tamaño de molienda. Esta figura ilustra la correlación inversa entre el tamaño de molienda y la proteína: a medida que incrementa el tamaño de partícula el contenido de proteína en DDGS disminuye para cada híbrido de maíz probado (figura 15A). La figura 15B ilustra la dependencia del nivel de almidón en DDGS del tamaño de molienda. Esta figura ilustra una correlación positiva entre el tamaño de molienda y el contenido de almidón: a medida que el tamaño de partícula aumenta el contenido de almidón en DDGS aumenta para cada híbrido de maíz probado (figura 15B). La figura 15C ilustra la dependencia de la producción de etanol del tamaño de molienda. Esta figura ilustra que a medida que el tamaño de partícula disminuye hay un incremento en la producción de etanol (figura 15C).

Discusión

25 El tamaño de partícula reducido que se da de la molienda del maíz permite crear rendimientos en etanol más altos y DDGS más rico en proteína. También se ve una fuerte correlación entre el contenido inicial de proteína del maíz y el contenido en proteína resultante en el DDGS. En el proceso convencional, es indeseable un maíz más rico en proteína porque baja el contenido de almidón fermentable. El proceso convencional, está más limitado por la viscosidad que aparece de la licuefacción, limita la capacidad del procesador de mantener fermentables mediante el incremento el nivel de sólidos de la fermentación. El presente método está menos limitado por la viscosidad, de modo que se pueden incrementar los sólidos fermentables para mantener la concentración de producción potencial de etanol mientras que simultáneamente se produce un DDGS más rico en proteína. El DDGS más rico en proteína se puede usar para cualquiera de una variedad de propósitos.

35 Se debe señalar que se hace un esfuerzo significativo en la industria actual para potenciar el uso de híbridos de "maíz muy fermentable". Los híbridos de "maíz muy fermentable" pueden tener una concentración de almidón más alta y no una concentración alta de proteína. Este ejemplo demuestra que se pueden usar variedades de híbridos de maíz más ricas en proteína que el normal maíz amarillo n°2 para obtener niveles altos de producción de etanol. A pesar del contenido de almidón más bajo del maíz amarillo n°2 normal, se puede incrementar los sólidos secos de fermentar para mantener los niveles de % de etanol en el fermentador mientras se produce un DDGS más rico en proteína.

40 Ejemplo 11. El proceso de almidón sin procesar permite la producción de co-producto con características inventadas

En una realización, la presente invención proporciona acceso mejorado a la fracción de proteína prolamina (tal como zeína) de los granos de cereal. El alto contenido en proteína de DG y DDGS es útil en la composición.

Resultados y discusión

45 Esto da como resultado DDG/DDGS con proporciones variables de proteína prolamina (tal como zeína) y almidón residual. Las figuras 14A y 14B muestran la relación de: torta húmeda, almidón de jarabe, y niveles de proteína. A medida que el almidón residual en la torta húmeda se reduce la proteína en la torta húmeda aumenta. Esto indica una relación inversa. Una respuesta similar se da en la fracción de jarabe.

50 Se debe señalar que, como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones del apéndice, las formas singulares "a", "un" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. También se debe señalar que el término "o" generalmente se usa en el sentido que incluye "y/o" a menos que el contenido dicte claramente otra cosa.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente de esta especificación son indicadoras del nivel de experiencia normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

55

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir etanol a partir de maíz molido cuyo método comprende:
 proporcionar una composición acuosa que comprende maíz molido de tamaño tal que más de 50% del maíz molido pase a través de un filtro de 0,5 mm, y amilasa ácida fúngica y una glucoamilasa bajo condiciones de sacarificación para producir azúcares fermentables a pH de menos de 6, a temperatura de 25°C a 40°C, y con un contenido de sólidos de 20 a 50 por cien en peso; y
 fermentar los azúcares en presencia de una levadura bajo condiciones para producir etanol en la que dichas condiciones incluyen un pH de menos de 6, en la que dicho método produce al menos 18 por cien de volumen de etanol.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la composición acuosa de maíz molido, amilasa ácida fúngica y glucoamilasa se mantiene a un pH de 4,0 a 5,0.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la cantidad de dicha amilasa ácida fúngica en relación con sólidos secos en dicha composición está entre 1,0 y 10 unidades de amilasa ácida fúngica por gramo de dichos sólidos secos.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la cantidad de dicha amilasa ácida fúngica en relación con sólidos secos en dicha composición está entre 0,5 y 6 unidades de amilasa ácida fúngica por gramo de dichos sólidos secos.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la producción de glucosa y la fermentación de glucosa a etanol se lleva a cabo en un proceso simultáneo.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la composición acuosa de maíz molido, amilasa ácida fúngica y glucoamilasa se mantiene a un pH de 4,0 a 5,0.
7. El método de la reivindicación 5, en el que la cantidad de dicha amilasa ácida fúngica en relación con sólidos secos en dicha composición está entre 1,0 y 10 unidades de amilasa ácida fúngica por gramo de dichos sólidos secos.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la cantidad de dicha amilasa ácida fúngica en relación con sólidos secos en dicha composición está entre 0,5 y 6 unidades de amilasa ácida fúngica por gramo de dichos sólidos secos.
9. El método de la reivindicación 5, en el que la concentración de glucosa durante la fermentación se mantiene al menos a aproximadamente 1 por cien en peso.
10. El método de la reivindicación 5, en el que durante la producción de etanol, el pH se mantiene a 3-4,5 durante la primera mitad del ciclo de llenado y a 4,5-6,0 durante la segunda mitad del ciclo de llenado.
11. El método de la reivindicación 1, en el que dichas condiciones de sacarificación incluyen:
 una temperatura de 30°C a 35°C, un contenido de sólidos de 25 a 45 por cien en peso, una cantidad de dicha amilasa ácida fúngica en relación con sólidos secos en dicha composición que está entre 0,1 y 10 de unidades de amilasa ácida fúngica por gramo de dichos sólidos secos, y una cantidad de dicha glucoamilasa en relación con sólidos secos de dicha composición que está entre 0,5 y 6 unidades de glucoamilasa por gramos de dichos sólidos secos; y
 dichas condiciones que producen etanol comprende una temperatura inicial de aproximadamente 35°C cuya temperatura desciende durante la fermentación a una temperatura de aproximadamente 30°C; y
 en la que la producción de glucosa y la fermentación de glucosa a etanol se lleva a cabo en un proceso simultáneo.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho método es un método continuo.
13. El método de la reivindicación 11, en el que dicho método se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de hasta entre 48 a 96 horas.
14. El método de la reivindicación 1, en el que los azúcares fermentan en ausencia de proteasa añadida.

FIG. 1A

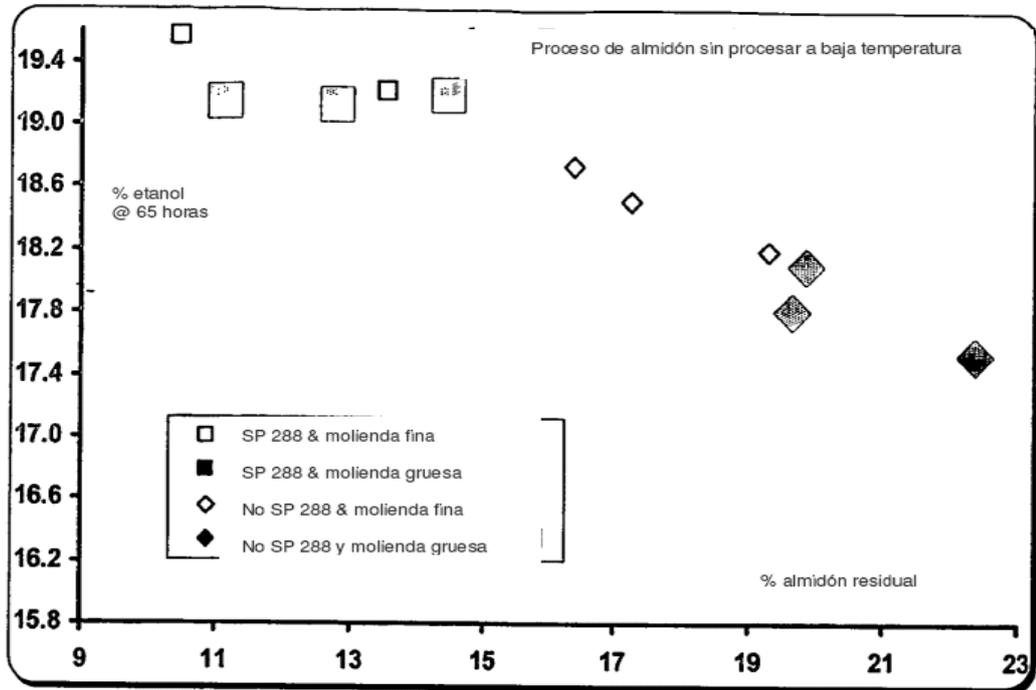


FIG. 1B

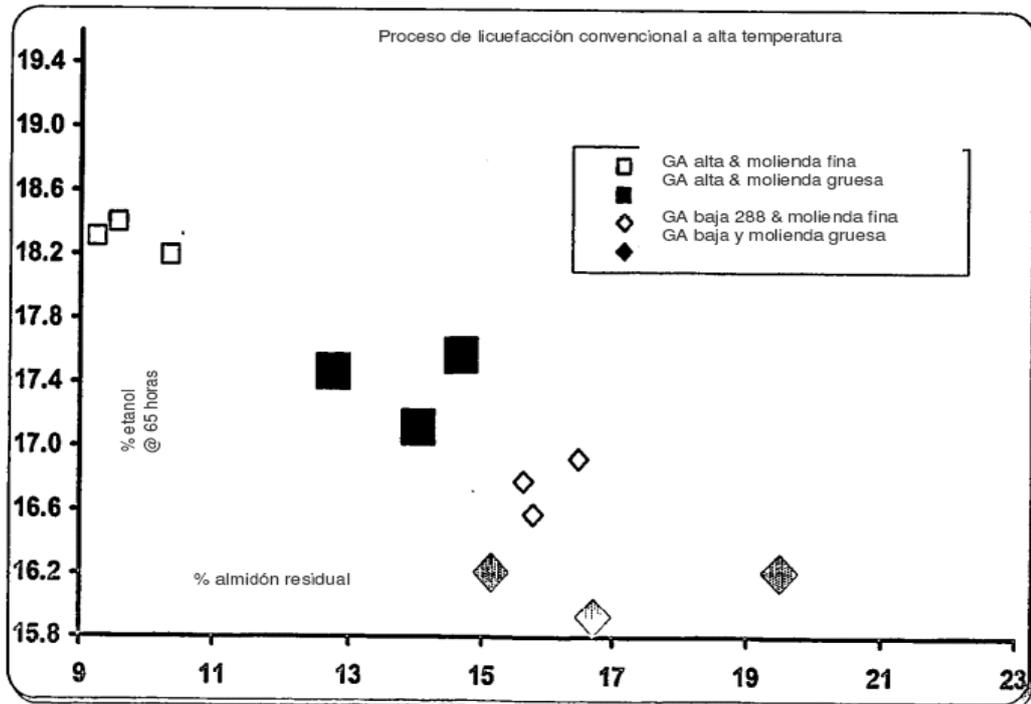


FIG. 1C

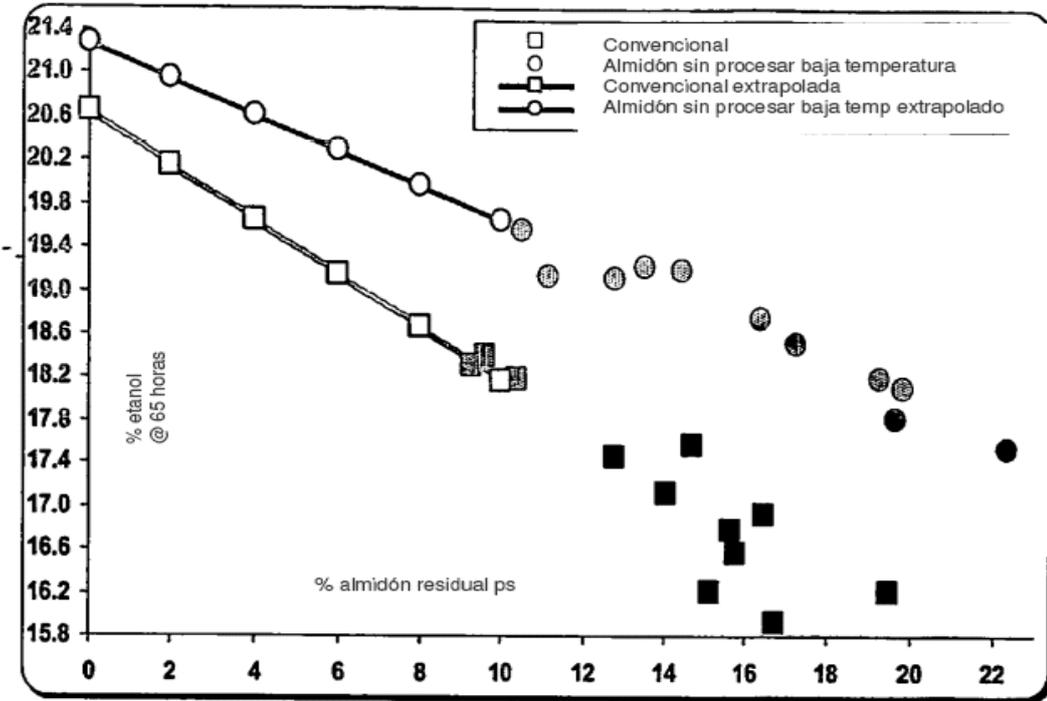


FIG. 1D

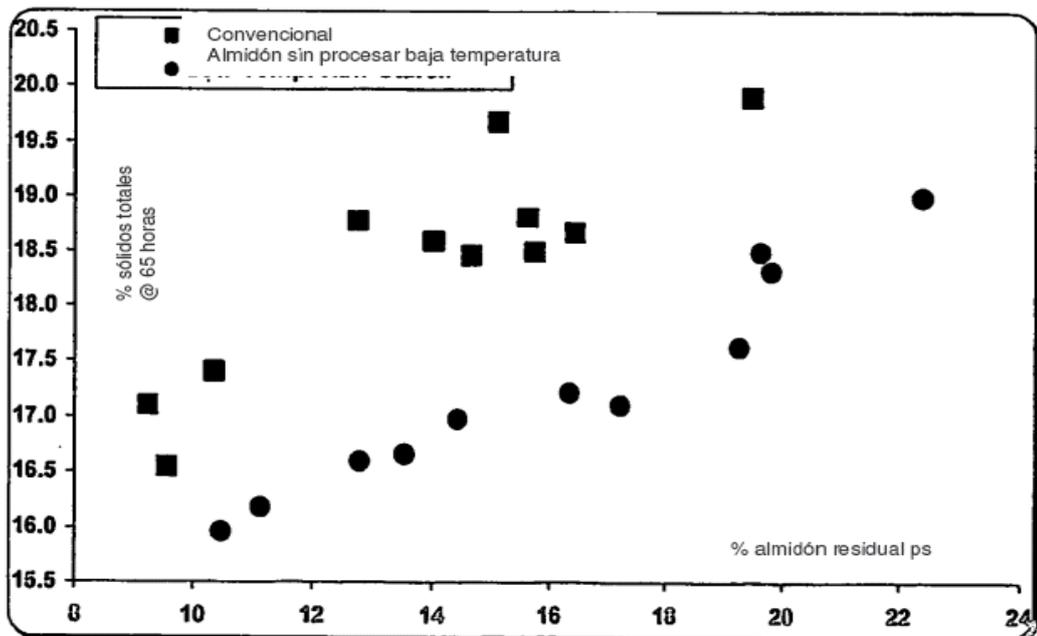


FIG. 1E

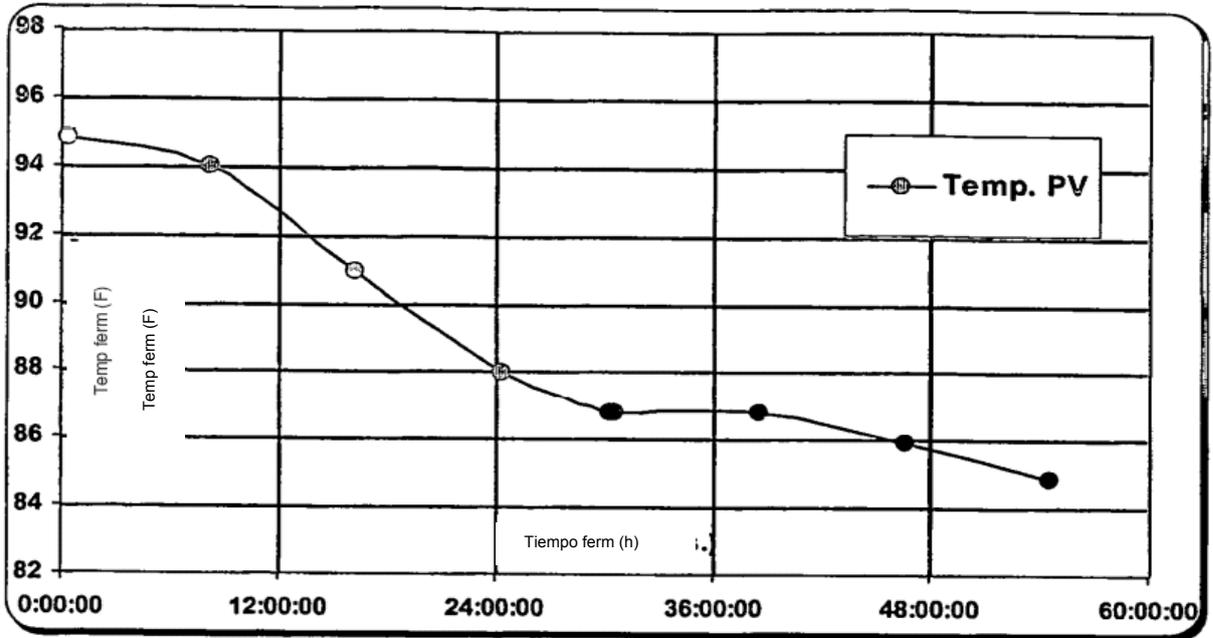


FIG. 2A

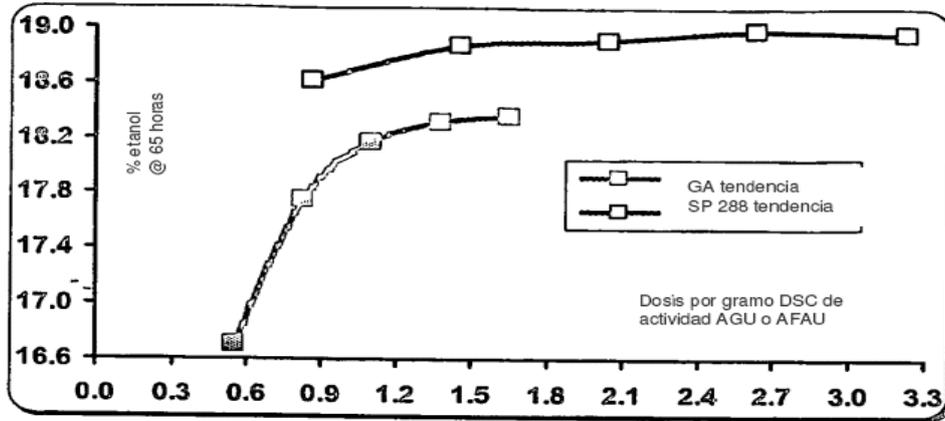


FIG. 2B

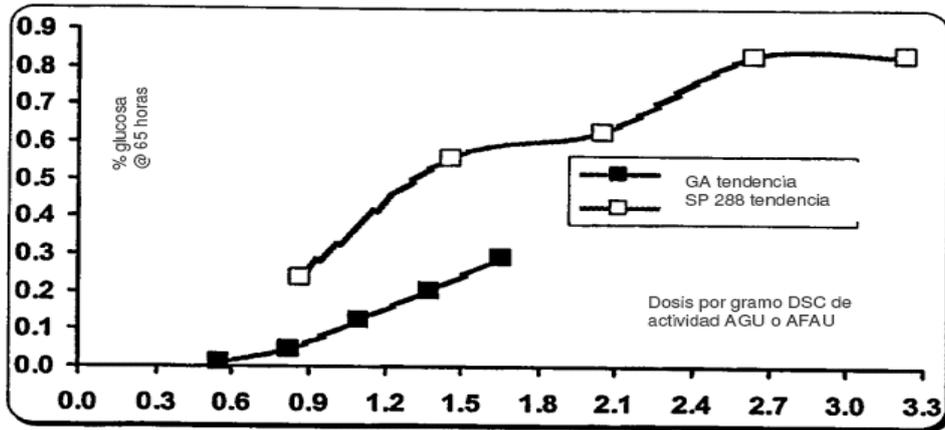


FIG. 2C

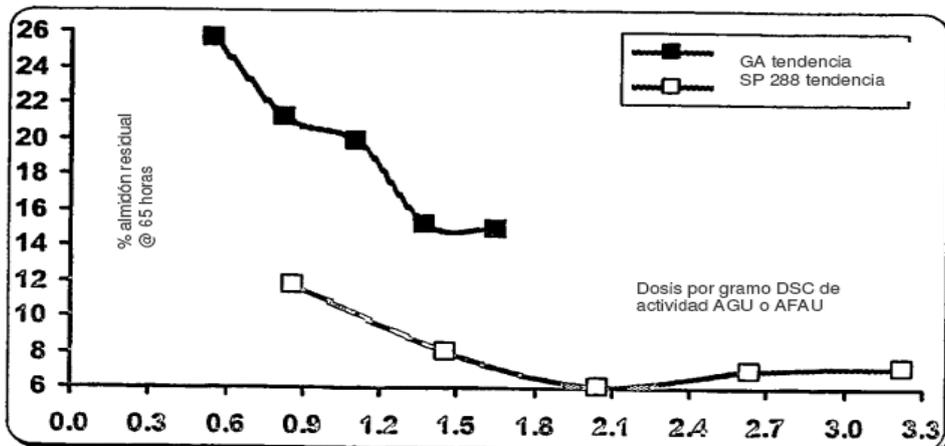


FIG. 3A

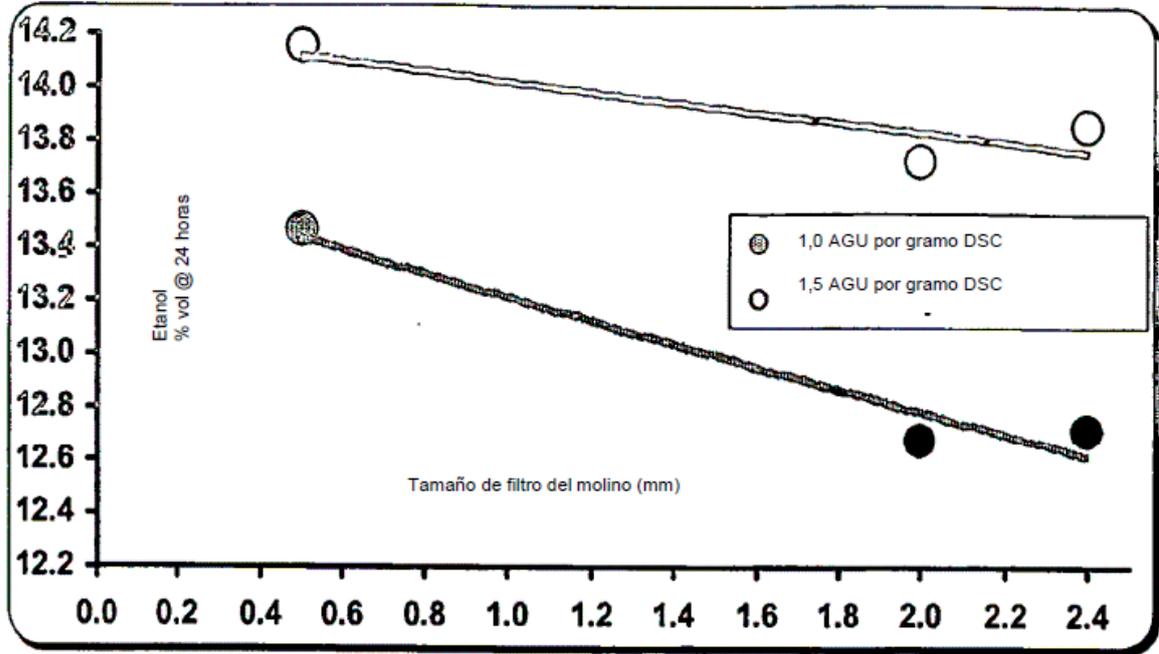


FIG. 3B

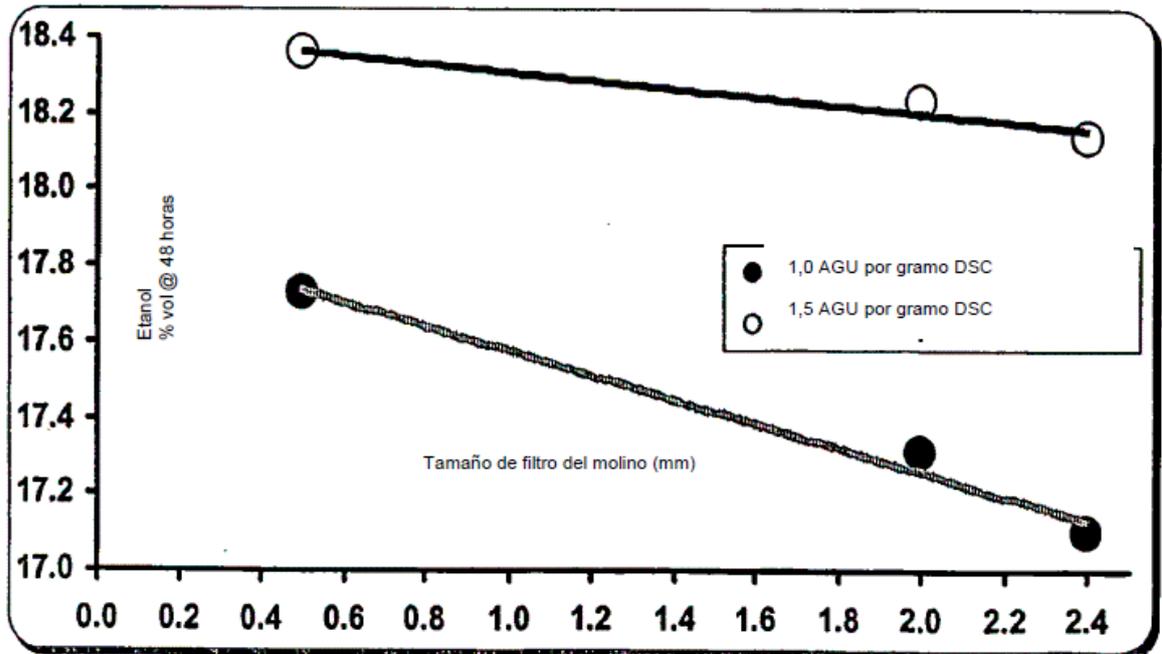


FIG. 3C

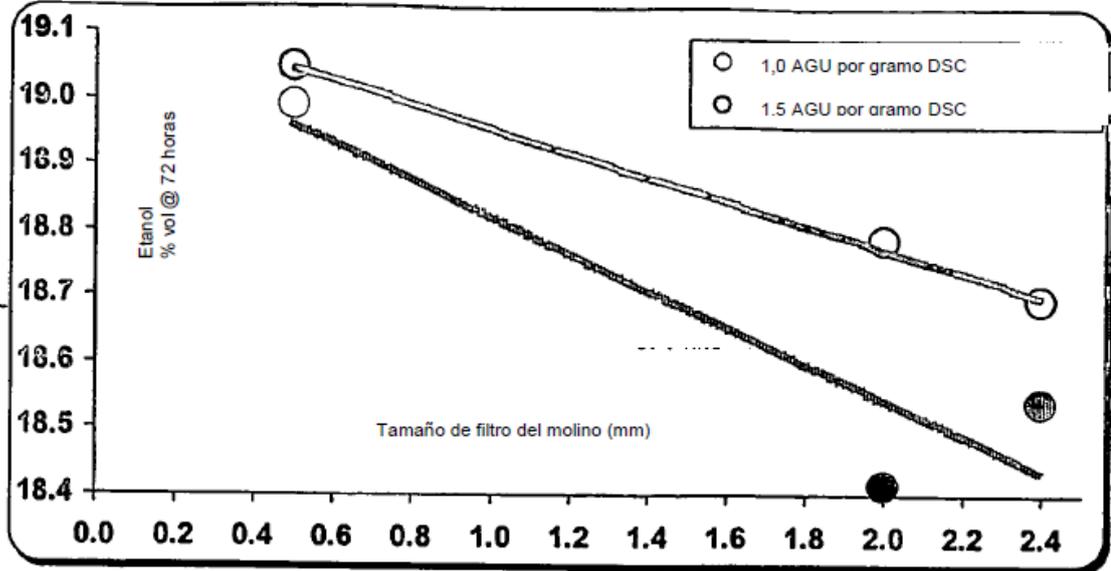


FIG. 3D

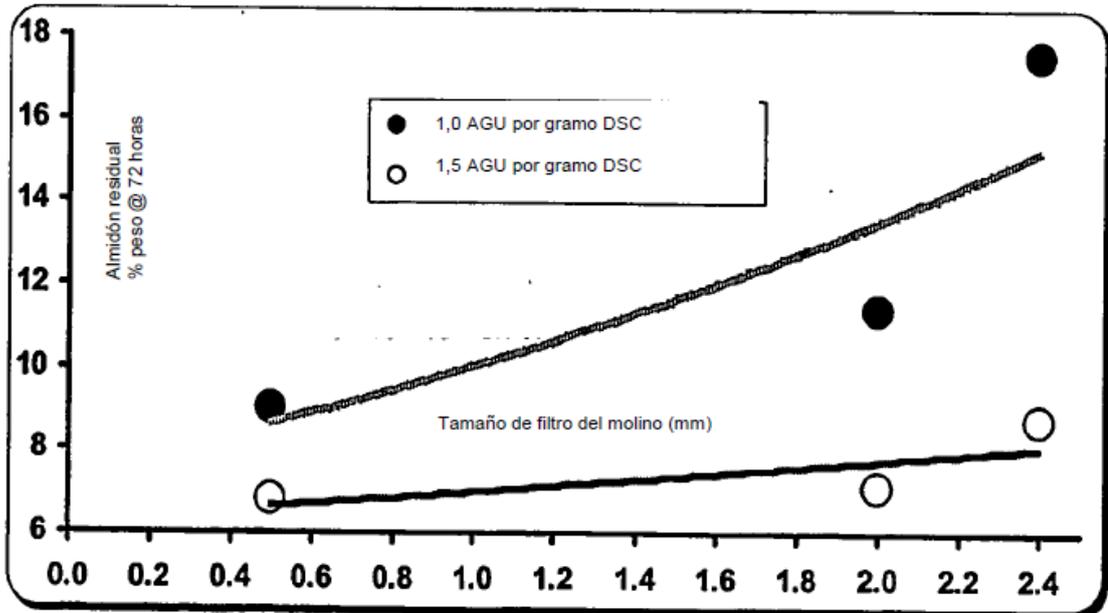


FIG. 4A

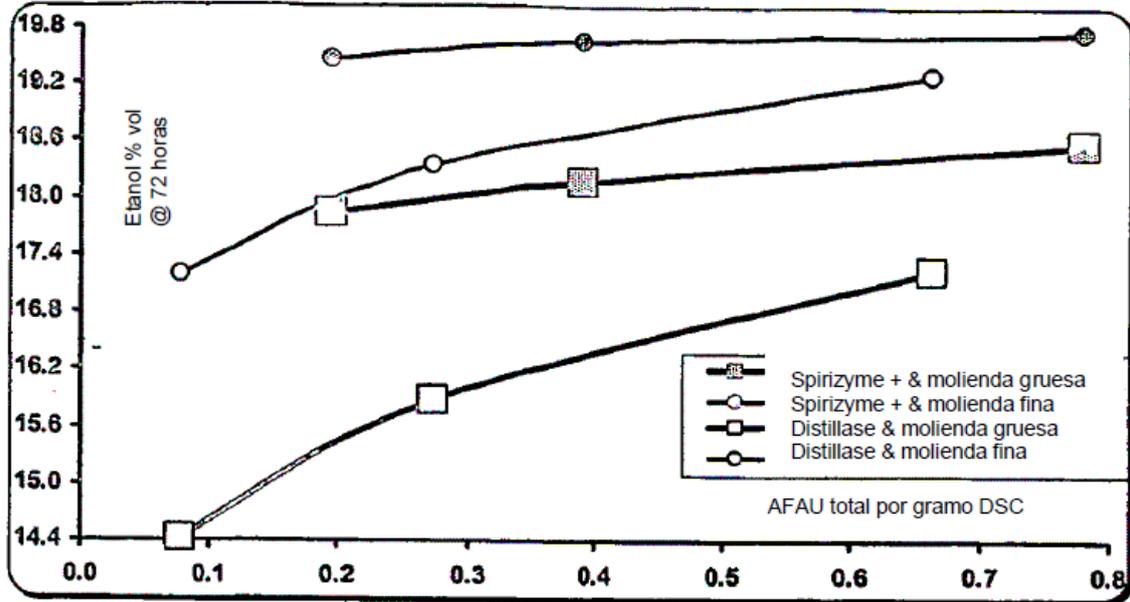


FIG. 4B

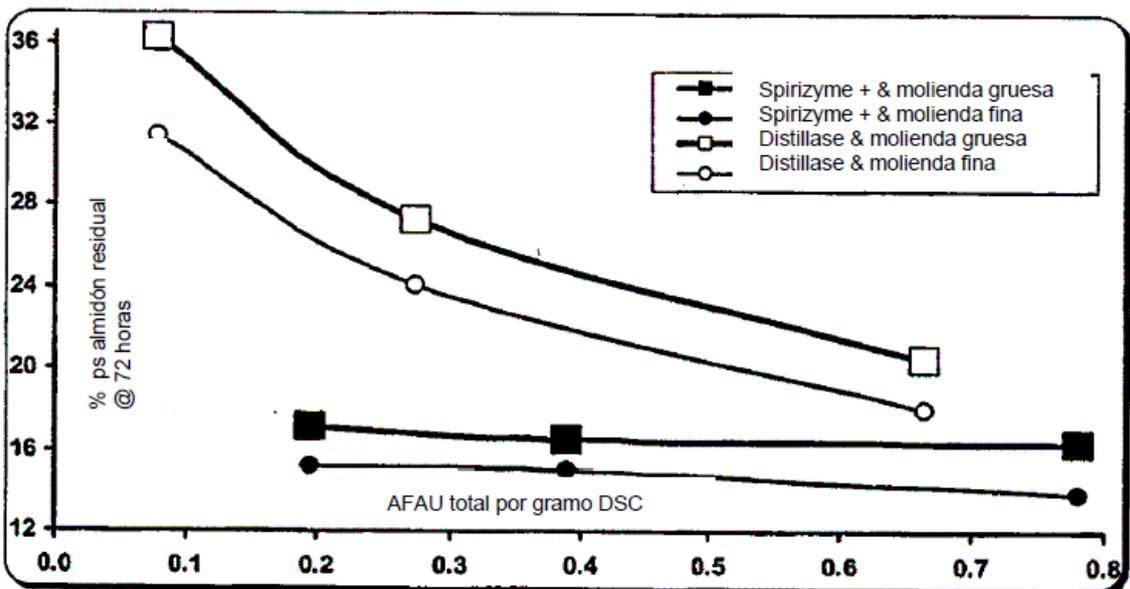


FIG. 4C

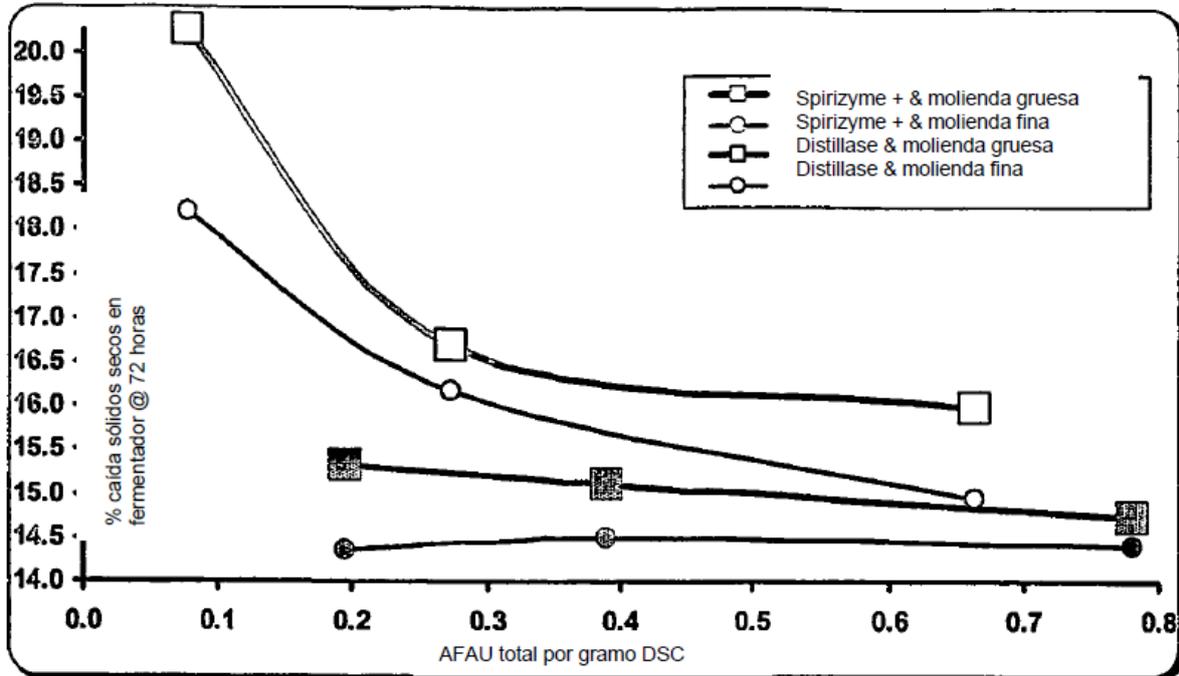


Fig. 5A

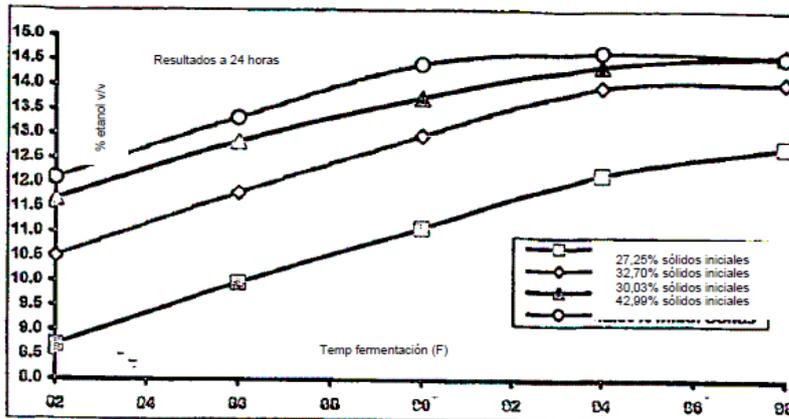


Fig. 5B

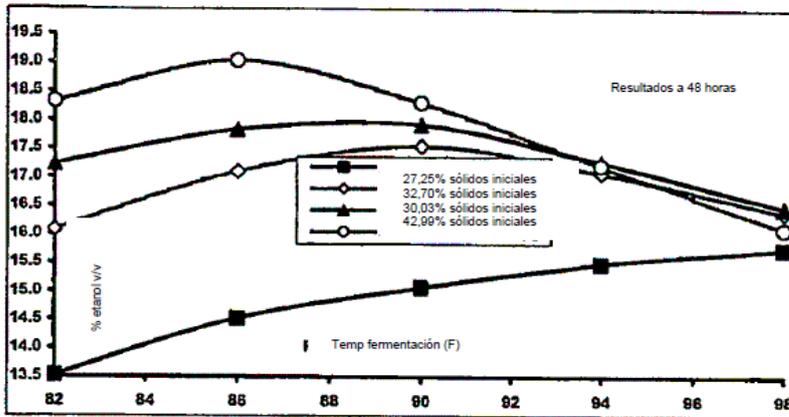


Fig. 5C

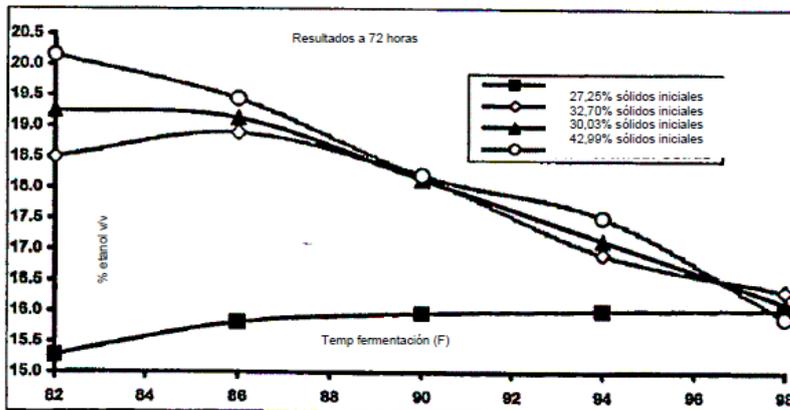
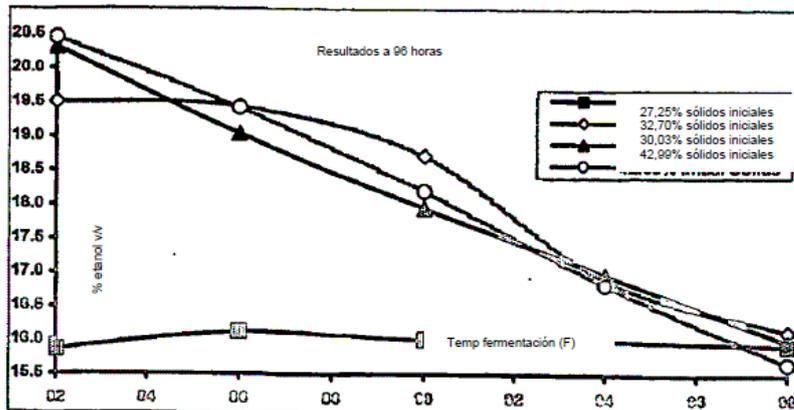


Fig. 5D



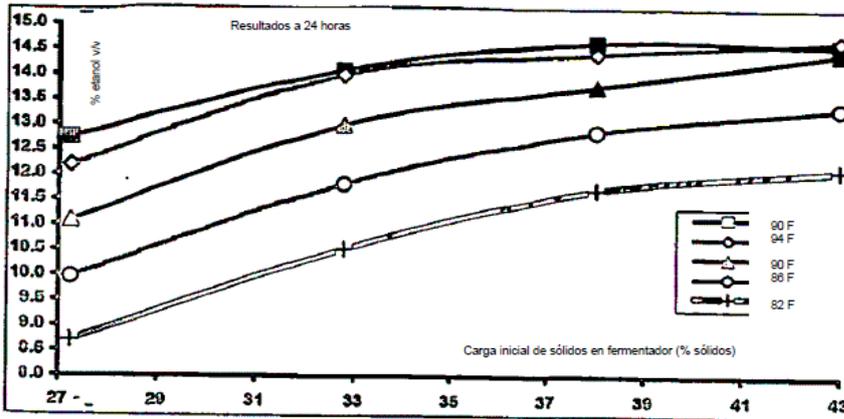


Fig. 5E

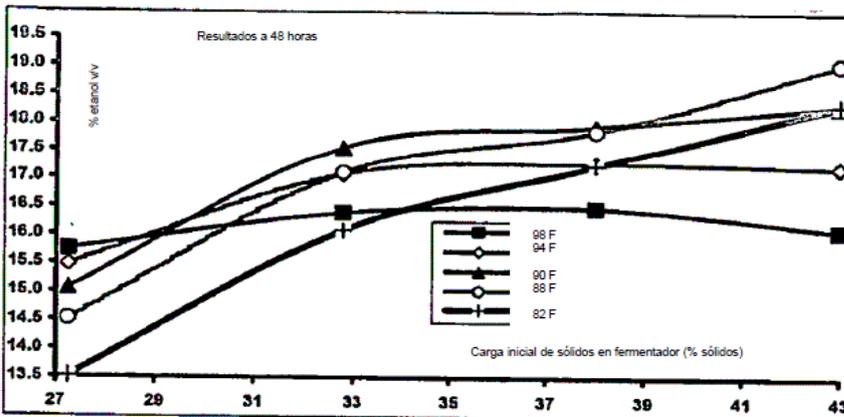


Fig. 5F

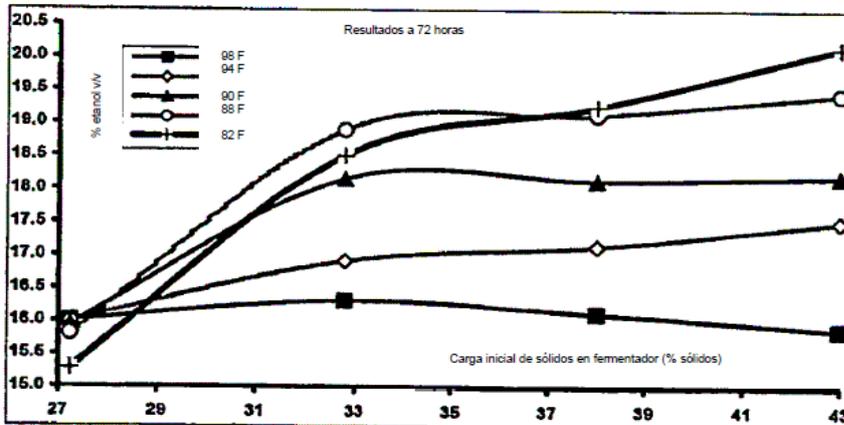


Fig. 5G

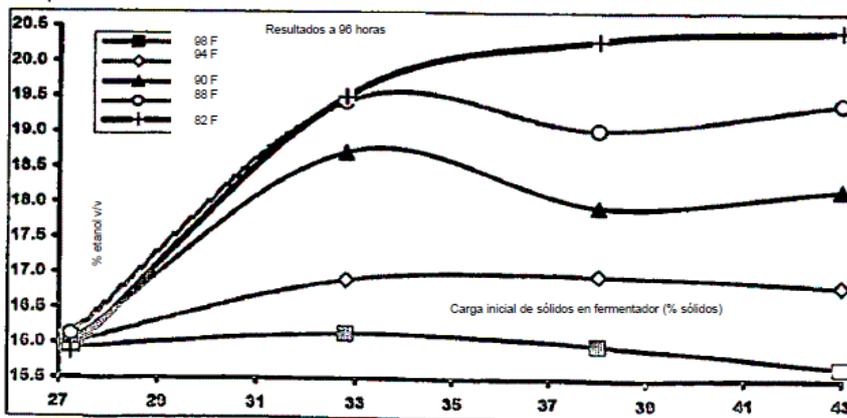


Fig. 5H

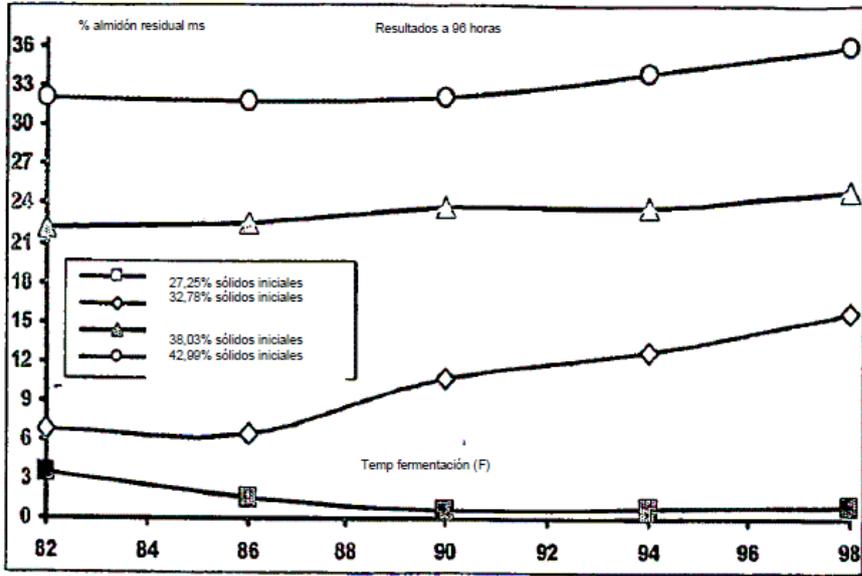


Fig. 5I

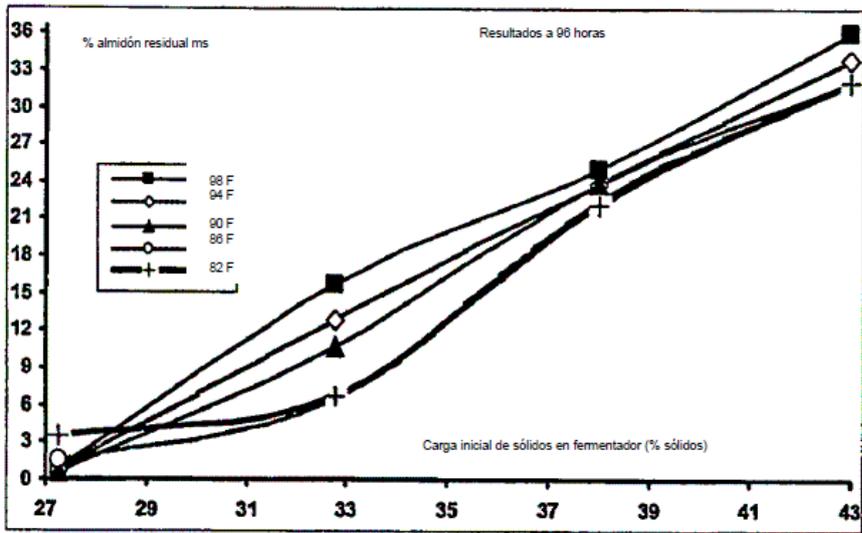


Fig. 5J

Fig. 6A

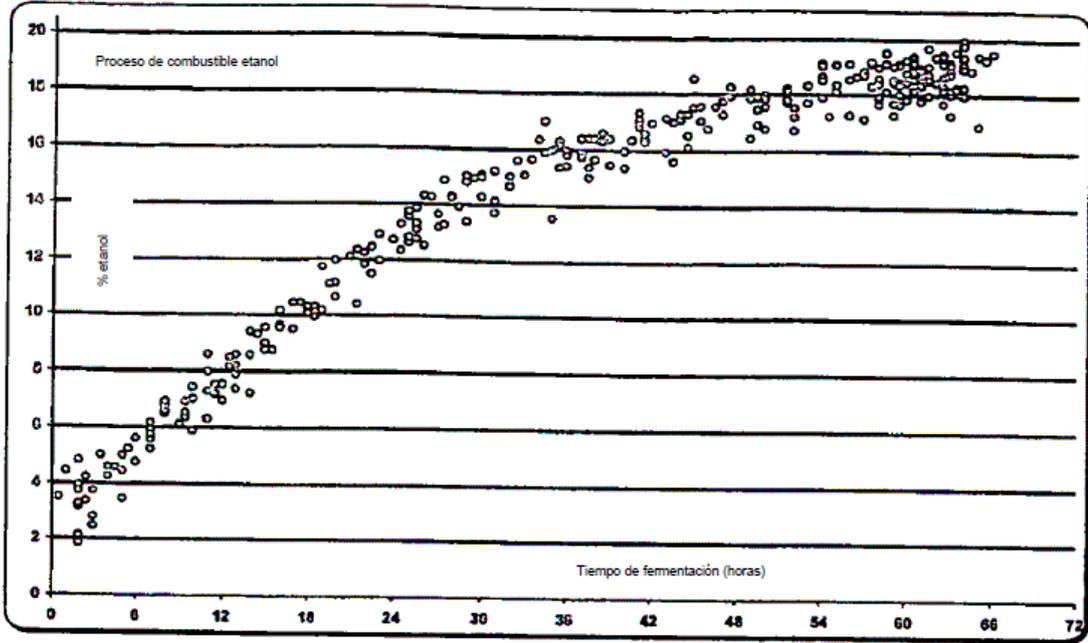


Fig. 6B

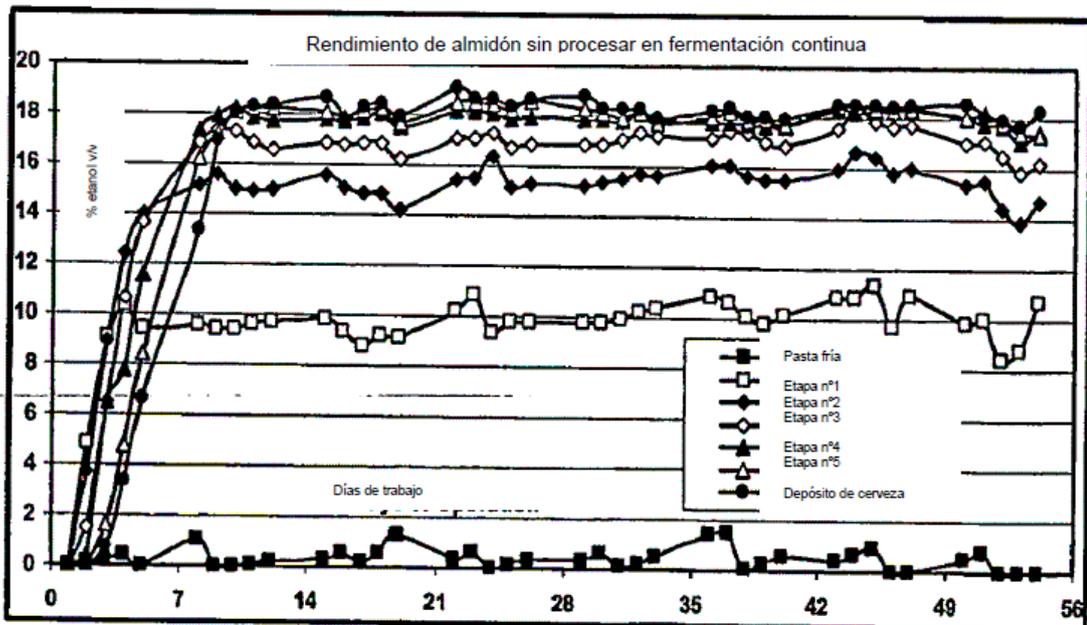


Fig. 7

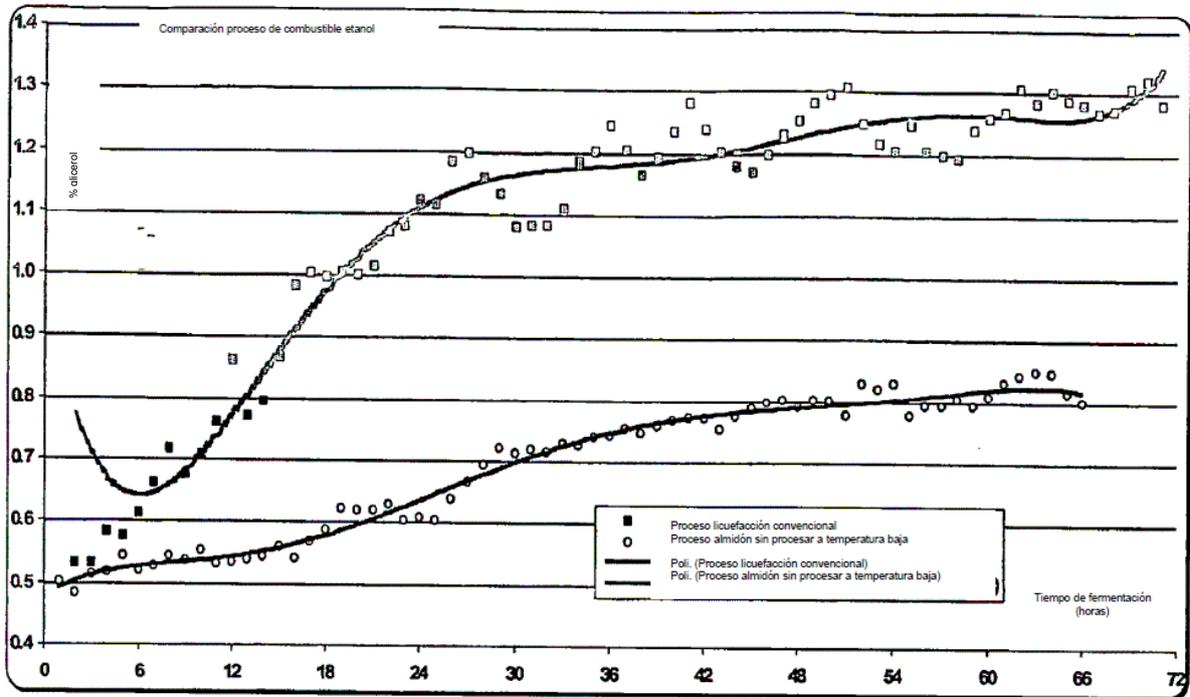


Fig. 8

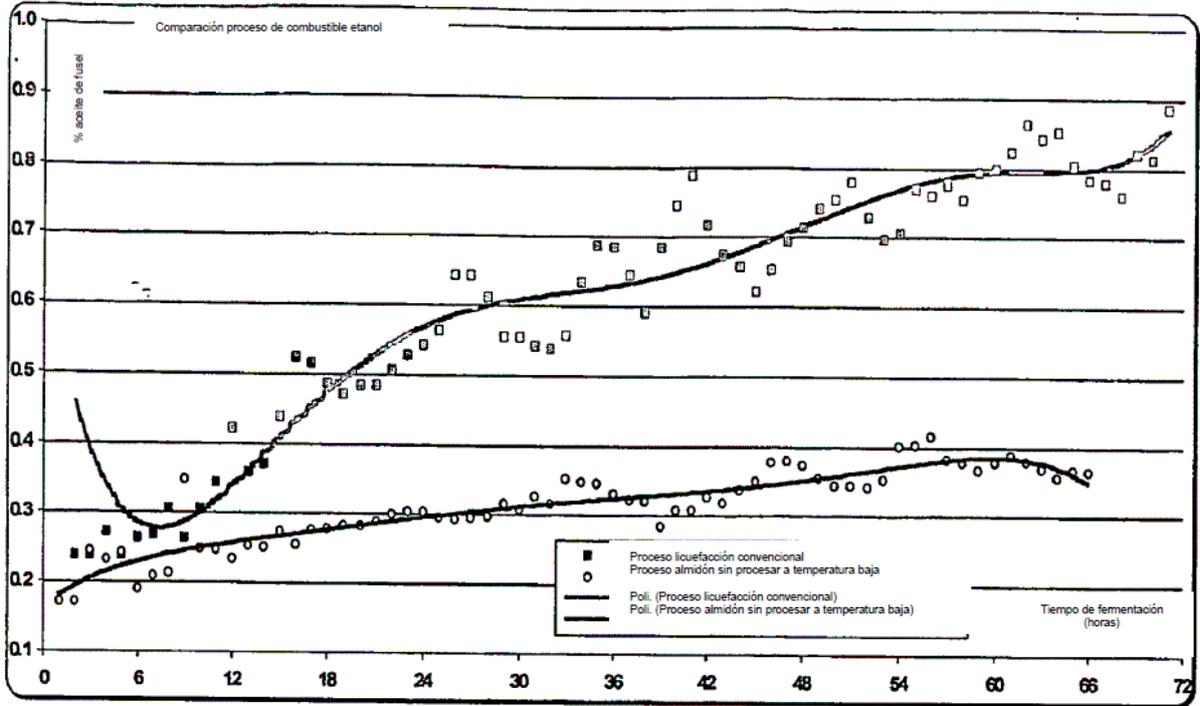


Fig. 9A

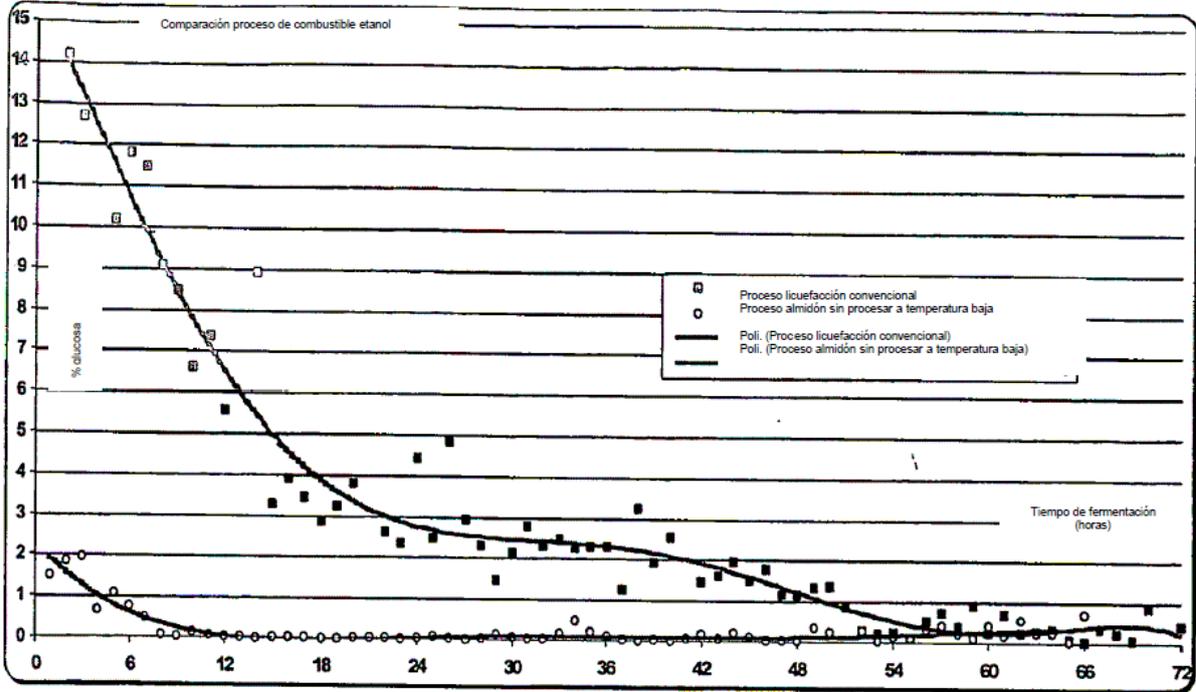


Fig. 9B

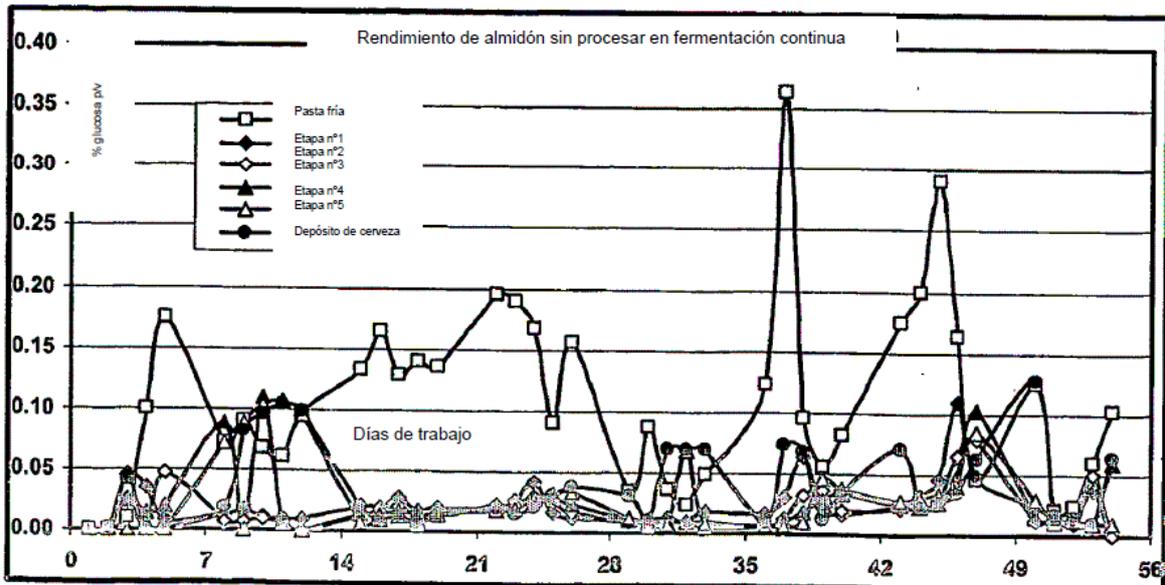


Fig. 10A

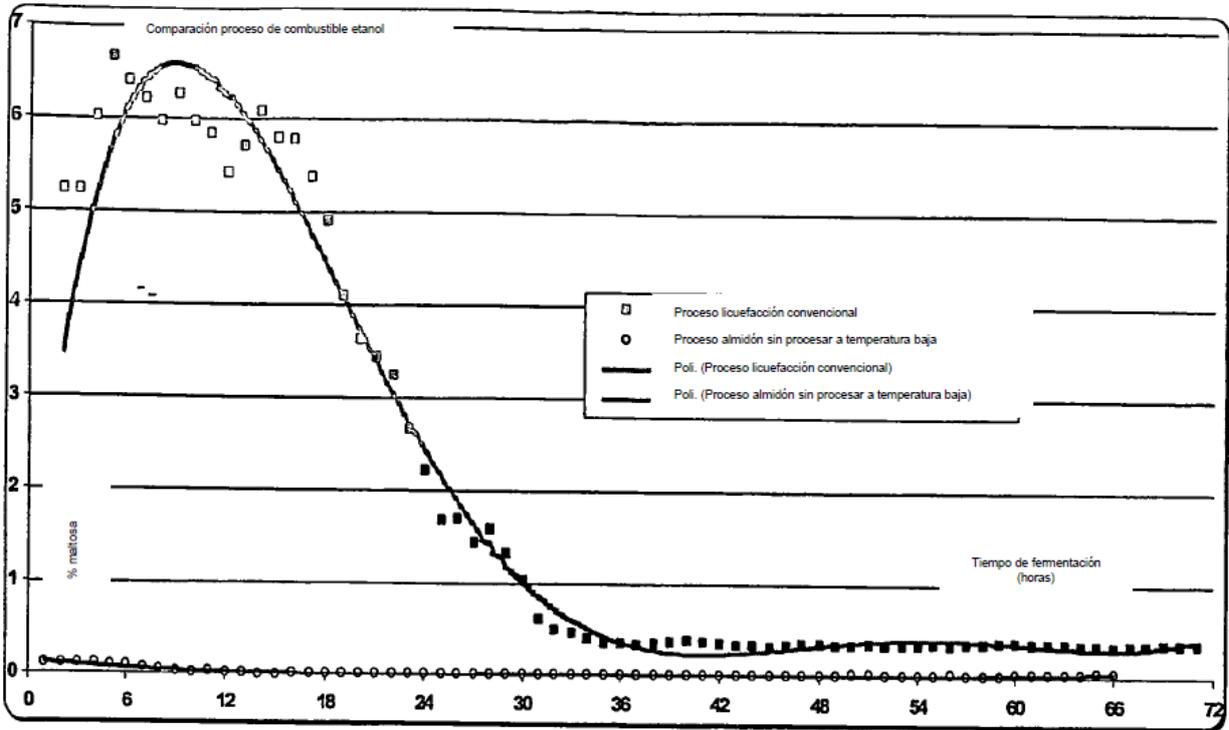


Fig. 10B

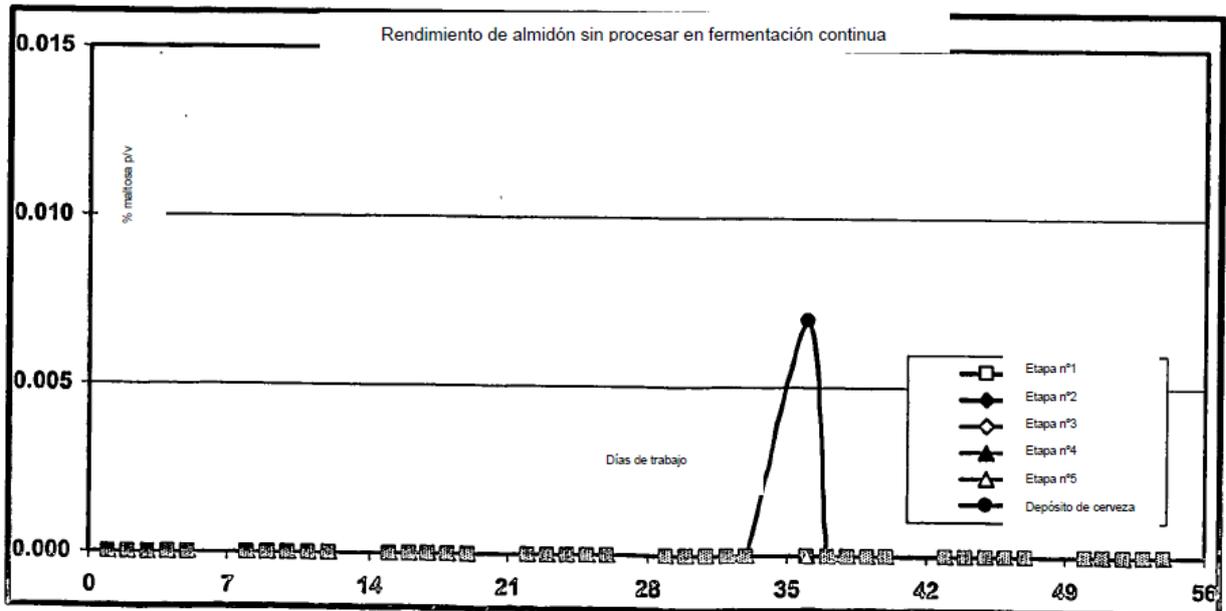


Fig. 11A

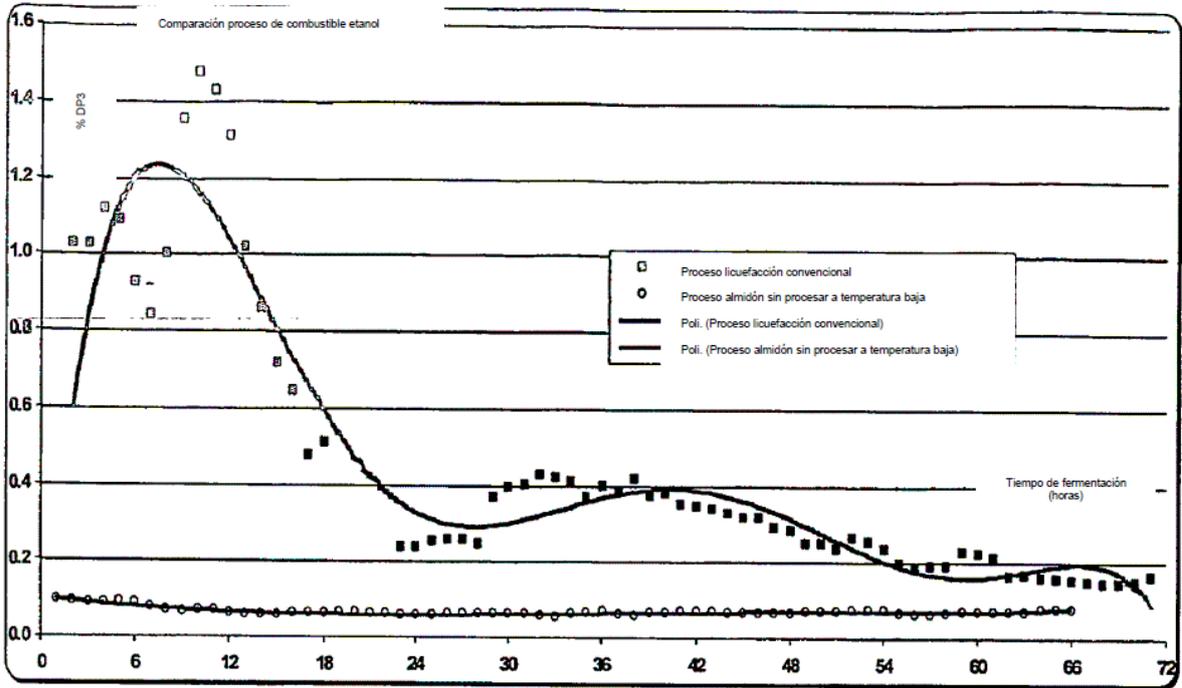


Fig. 11B

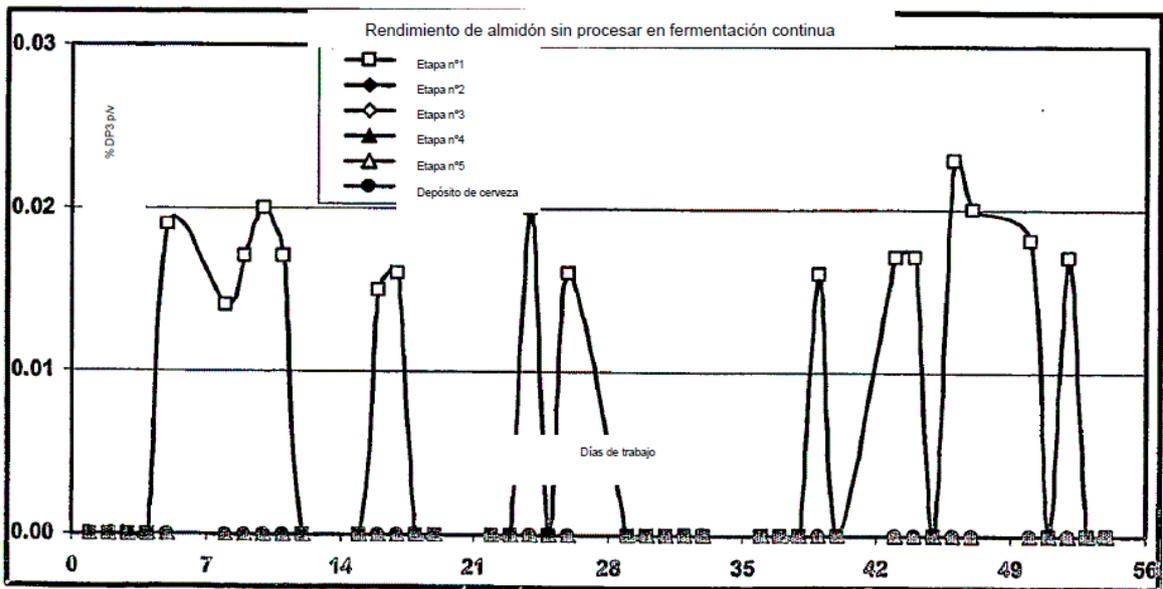


Fig. 12A

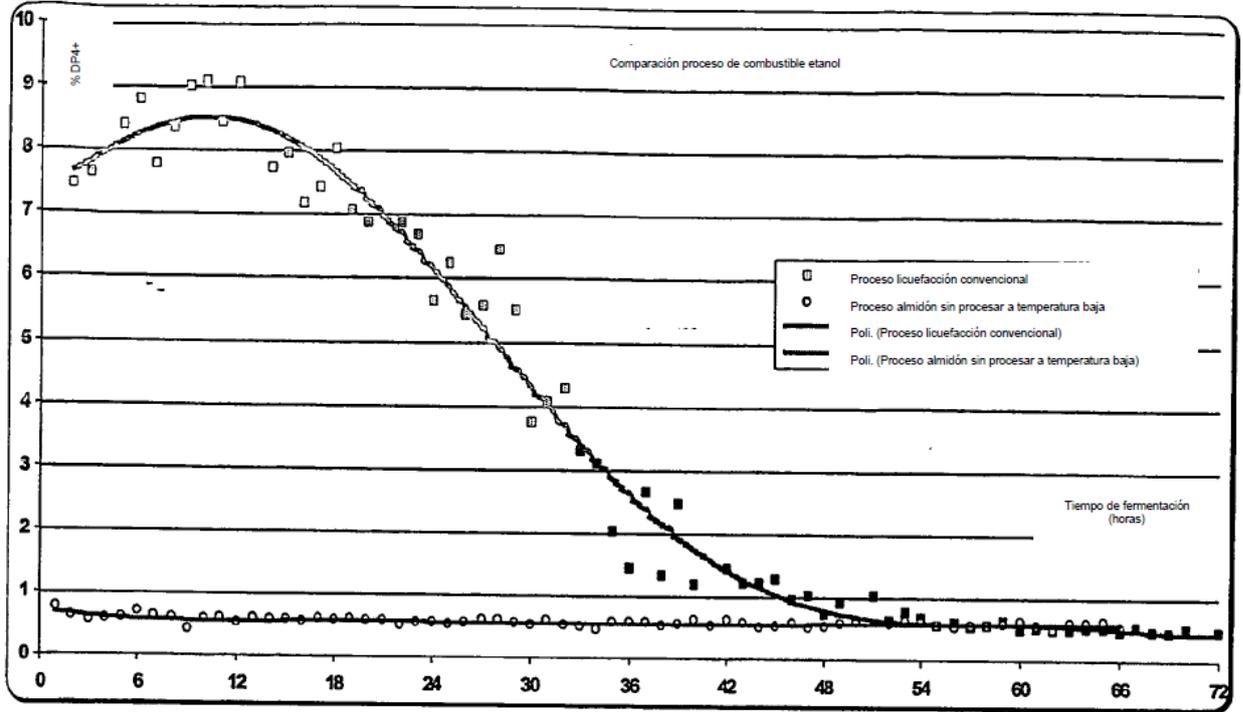


Fig. 12B

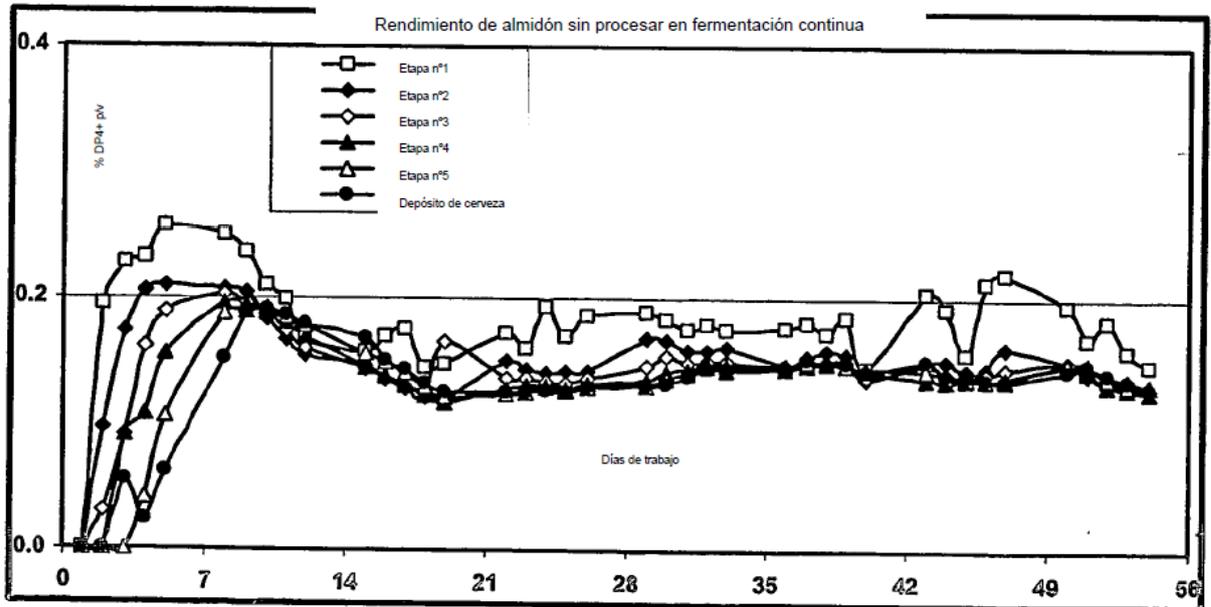
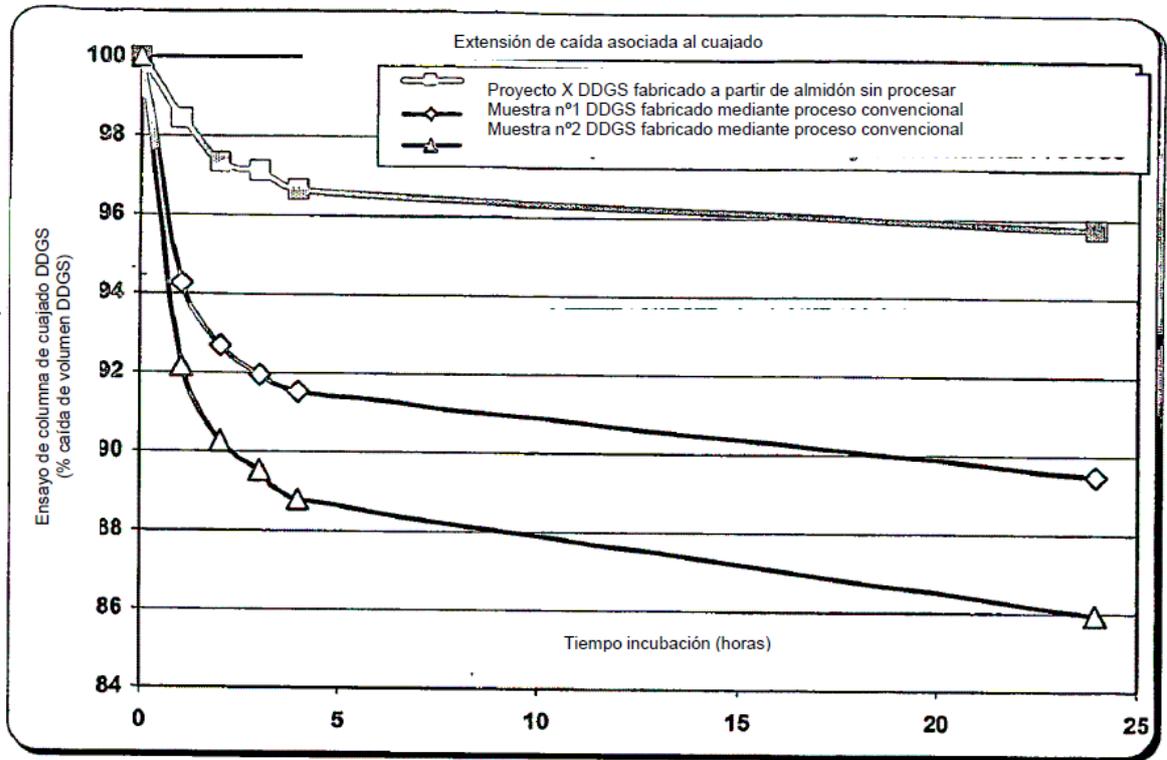


Fig. 13



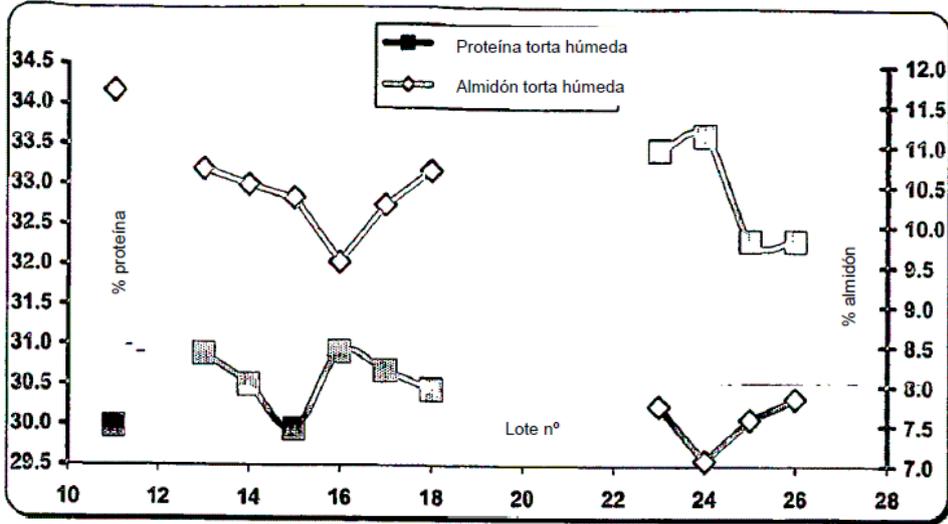


Fig. 14A

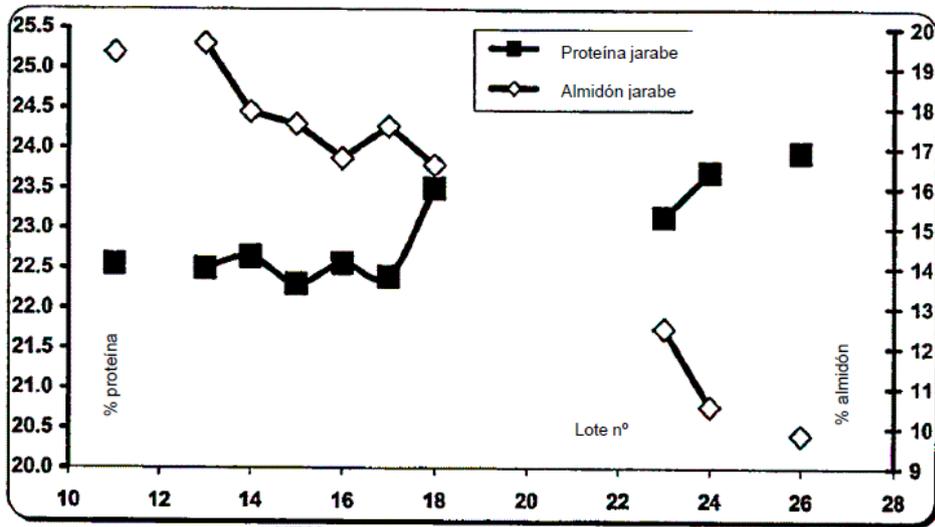


Fig. 14B

Fig. 15A

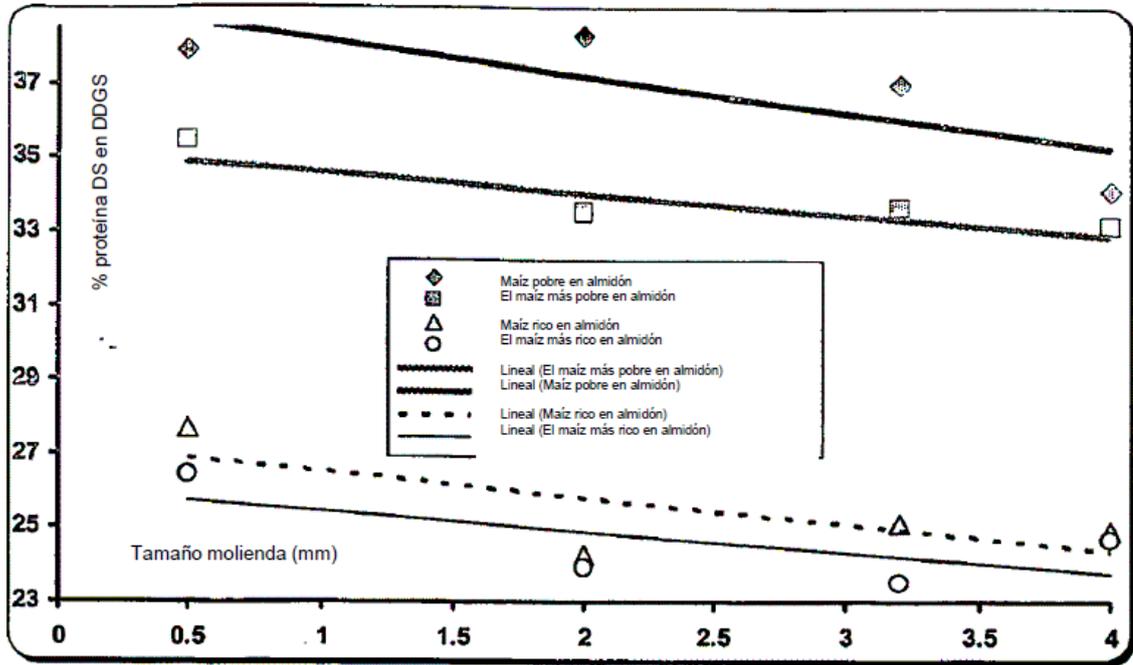


Fig. 15B

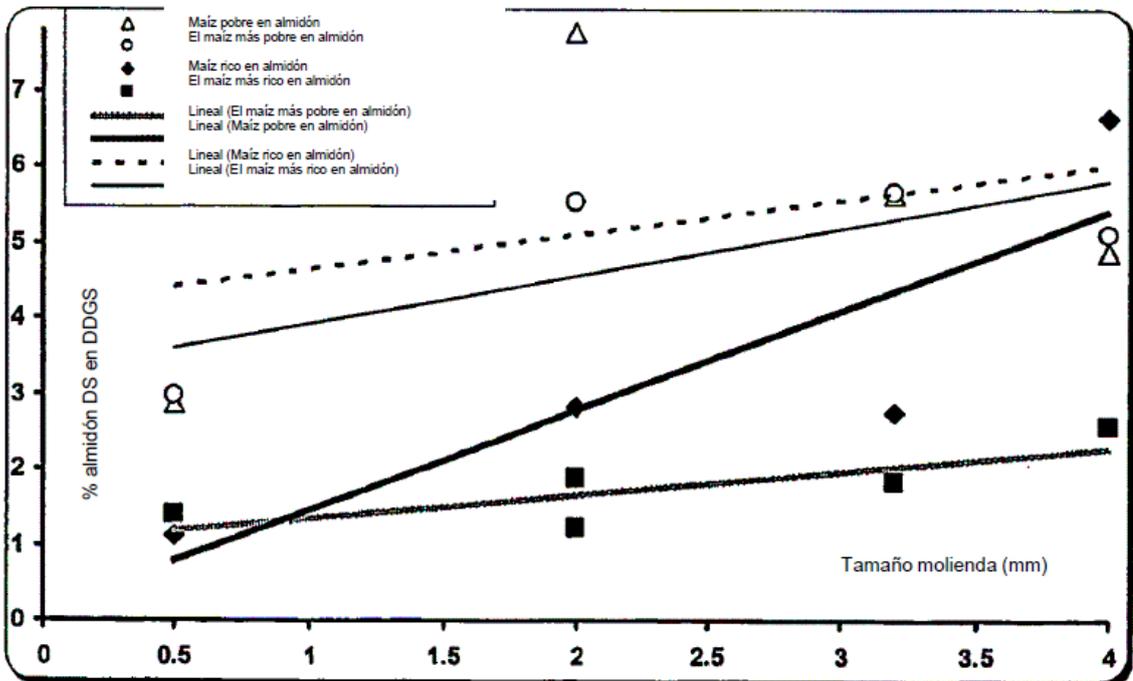


Fig. 15C

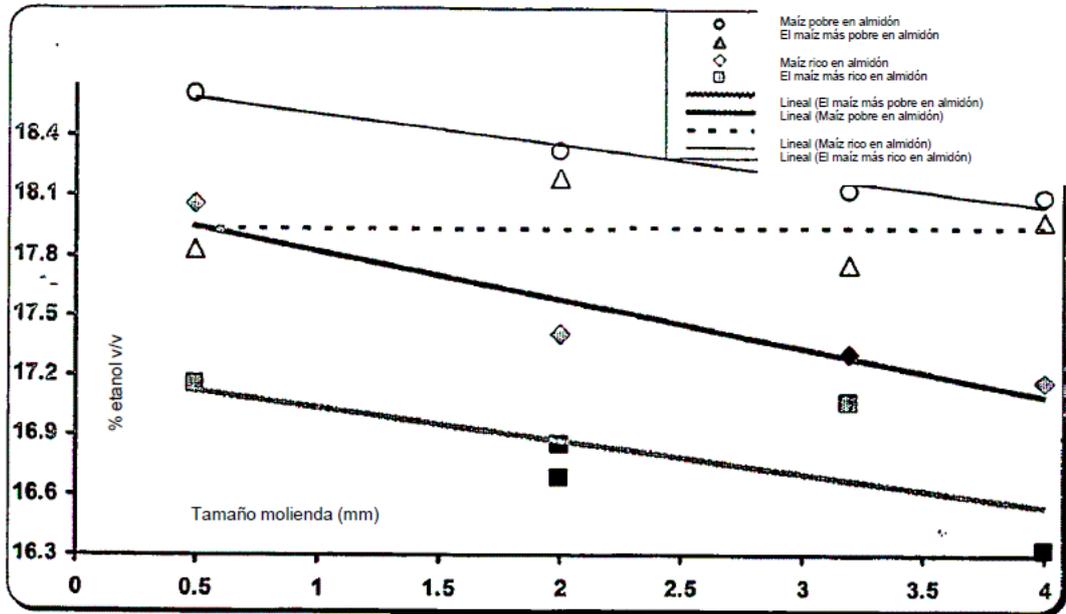


Fig. 15D

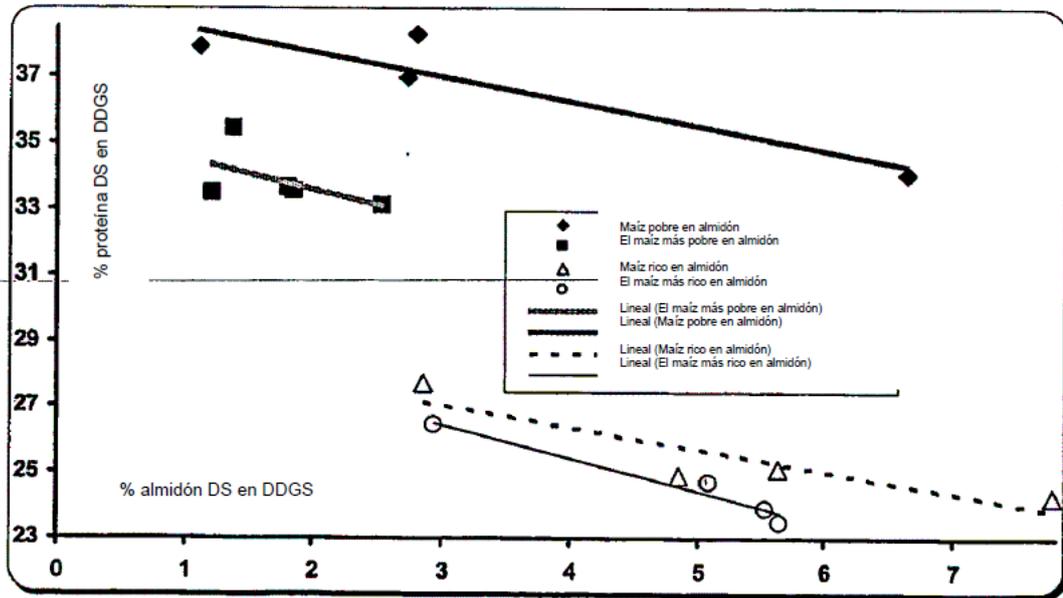


Fig. 16A

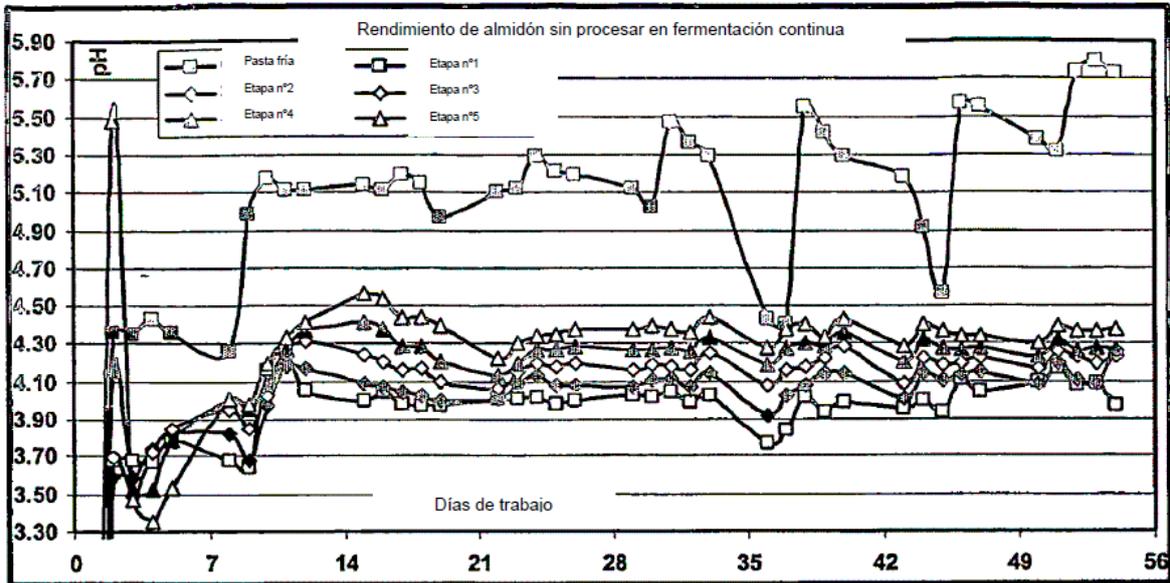


Fig. 16B

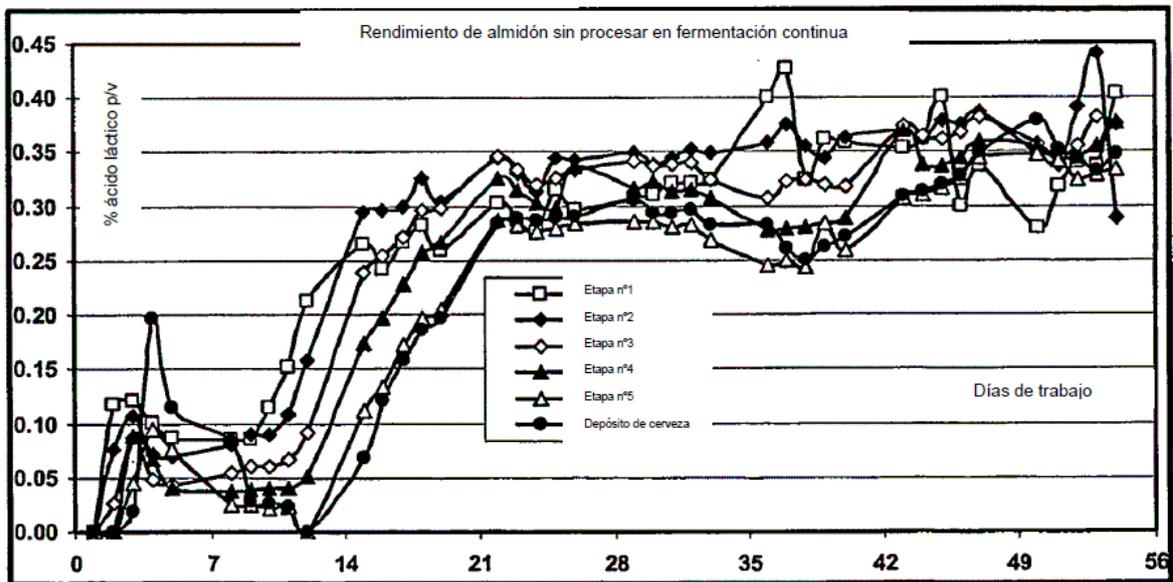


Fig. 16C

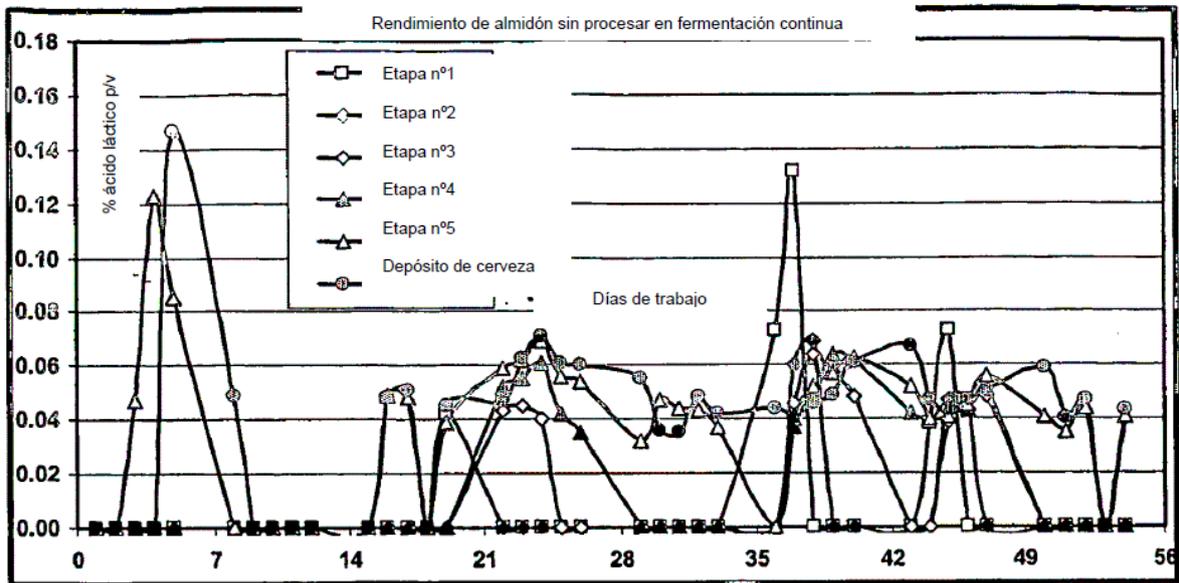


Fig. 17

