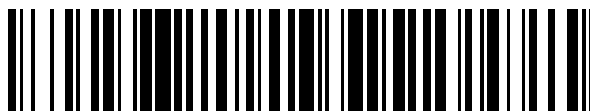


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 970**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

C12P 7/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/US2012/000290**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO2012173660**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12732891 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2721163**

54 Título: **Co-productos de procesos de producción de biocombustible y métodos de preparación**

30 Prioridad:

17.06.2011 US 201161498389 P

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**BUTAMAX ADVANCED BIOFUELS LLC (100.0%)
Route 141 & Henry Clay DuPont Experimental
Station Building 356
Wilmington, Delaware 19880-0356, US**

72 Inventor/es:

**LOWE, DAVID, J. y
ROESCH, BRIAN, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 617 970 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

Co-productos de procesos de producción de biocombustible y métodos de preparación

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos de generación de co-productos y composiciones útiles como co-productos procedentes de procesos de producción de biocombustible. Por ejemplo, la invención se refiere a co-productos para piensos destinados a animales procedentes de al menos una corriente de alimentación de proceso, tal como ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceites, lípidos procedentes de la evaporación de residuos finos de destilación, jarabe, granos de destilador, granos de destilador y solubles, sólidos procedentes de maceración antes de la fermentación y sólidos procedentes de residuos de destilación tras la fermentación.

Técnica anterior

15 Los biocombustibles son una amplia gama de combustibles que, en cierto modo, proceden de biomasa. Los biocombustibles están acaparando mayor interés y atención públicos, debido a factores tales como los repuntes del precio del petróleo, la necesidad de una mayor seguridad energética, la concienciación sobre las emisiones de gases de efecto invernadero procedentes de los combustibles fósiles y las ayudas por parte de los gobiernos. Los biocombustibles proporcionaron un 1,8% del combustible mundial para transporte en 2008. La inversión en la producción de biocombustibles superó los 4.000 millones de dólares en el mundo en 2007 y está creciendo. De acuerdo con la Agencia Internacional de la Energía, los biocombustibles tienen el potencial de satisfacer más de un cuarto de la demanda mundial de combustibles para el transporte en 2050.

20 Además de los biocombustibles, los procesos de producción de biocombustible (por ejemplo, procesos de producción de etanol y butanol) también producen sub-productos tales como granos secos de destilador y solubles (DDGS) ("sub-productos de destilador"). Los sub-productos de destilador pueden proporcionar una ventaja económica al producto de alcohol. Por ejemplo, los DDGS pueden convertirse para uso en piensos destinados a animales, ingredientes alimentarios y productos industriales. El desarrollo de usos alternativos para los co-productos de destilador minimizar la necesidad y el coste de eliminación de los sub-productos de fermentación. El documento US 2007/0243235 divulga un método de generación de co-productos de destilador de un proceso de producción de butanol, tal como granos de destilador secos (DDG) o húmedos (DWS) que se pueden combinar con destiladores solubles para formar, por ejemplo, granos secos de destilador con solubles (DDGS).

30 Puede haber variabilidad en el perfil de nutrientes de los co-productos de destilador. Esta variabilidad depende de, por ejemplo, las diferentes fuentes de materias primas usadas en el proceso de producción de biocombustible. Por tanto, es necesario desarrollar métodos para generar co-productos de destilador y métodos para adaptar nutricionalmente los co-productos de destilador para una pienza particular para animales o un mercado de piensos destinados a animales (por ejemplo, ganado, rumiantes, vacuno, animales productores de leche, porcino, caprino, ovino, aves de corral, equinos, acuicultura o mascotas domésticas tales como perros, gatos y conejos). Por ejemplo, lisina es un aditivo nutricional importante para piensos destinados a animales debido a su amino ácido limitante cuando se optimiza el crecimiento de determinados animales tales como cerdos y pollos para la producción de carne. El complemento de lisina permite el uso de proteína de planta de bajo coste (maíz, por ejemplo, en lugar de soja) al tiempo que se mantienen elevadas tasas de crecimiento y se limita la contaminación procedente de la excreción de nitrógeno. Además, se requieren co-productos de destilador de calidad reproducible y coherente con un período de caducidad ampliado.

40 La presente invención cumple estas y otras necesidades, y proporciona ventajas relacionadas adicionales, como puede resultar evidente por medio de la descripción de las realizaciones siguientes.

Sumario de la invención

45 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Se divulga un método de generación de co-productos de destilador que comprende proporcionar un proceso de producción de alcohol con al menos dos corrientes de alimentación de proceso, en el que al menos dos corrientes de alimentación de proceso se combinan para generar co-productos de destilador. En algunas realizaciones, al menos dos corrientes de alimentación de proceso incluyen al menos dos de (i) ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceite, (ii) lípidos procedentes de la evaporación de residuos de destilación finos, (iii) jarabe, (iv) granos de destilador (DG), (v) granos de destilador y solubles (DGS), (vi) sólidos procedentes de maceración antes de fermentación; (vii) sólidos procedentes de residuos de destilación completos tras la fermentación, (viii) aceite, y (ix) microorganismos. En algunas realizaciones, los ácidos grasos proceden de la hidrólisis de aceite de maíz. En algunas realizaciones, los DG son granos de destilador secos (DDG) o granos de destilador húmedos (WDG). En algunas realizaciones, los DGS son granos de destilador secos y solubles (DDGS) o granos de destilador húmedos y solubles (WDGS). En algunas realizaciones, el proceso de producción de alcohol es un proceso de producción de butanol.

55 Se divulgan métodos para generar co-productos de destilador para piensos destinados a animales procedentes de

- un proceso de alcohol que comprende proporcionar un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, butanol) con al menos una corriente de alimentación de proceso, en el que se usa al menos una corriente de alimentación de proceso para generar los co-productos de destilador para piensos destinados a animales con un contenido mejorado de proteínas brutas y grasas brutas. En algunas realizaciones, pueden existir al menos dos o al menos tres corrientes de alimentación de proceso, en el que las corrientes de alimentación de proceso se combinan para generar co-productos de destilador para piensos destinados a animales. En algunas realizaciones, las corrientes de alimentación de destilador pueden incluir (i) ácidos grasos, (ii) lípidos, (iii) jarabe, (iv) granos de destilador (DG), (v) granos de destilador y solubles (DGS), (vi) sólidos procedentes de maceración antes de fermentación, (vii) sólidos procedentes de residuos de destilación completos tras fermentación; (viii) aceite y/o (ix) microorganismos. En algunas realizaciones, los ácidos grasos pueden proceder de la hidrólisis de aceite. En algunas realizaciones, los ácidos grasos proceden de la hidrólisis de aceite de maíz (COFA). En algunas realizaciones, los lípidos pueden proceder de la evaporación o residuos de destilación finos. En algunas realizaciones, los DG son granos de destilador secos (DDG), granos de destilador húmedos (WDG), granos de destilador secos y solubles (DDGS) o granos de destilador húmedos y solubles (WDGS). En algunas realizaciones, los piensos destinados a animales pueden tener un contenido de proteínas brutas de al menos aproximadamente un 20%. En algunas realizaciones, los piensos destinados a animales pueden tener un contenido de proteínas brutas de al menos aproximadamente un 25%. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para piensos destinados a animales tienen un contenido de grasas menor de un 15%. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para piensos destinados a animales tienen un contenido de grasa menor de un 10%. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para piensos destinados a animales tienen un contenido de ácidos grasos menor de aproximadamente un 10%. En algunas realizaciones, el contenido de ácidos grasos proporciona energía adicional y nutrientes para una composición de pienso destinado a animales que comprende los co-productos de destilador para piensos destinados a animales. En algunas realizaciones, el proceso de producción de alcohol es un proceso de producción de butanol. En algunas realizaciones, el butanol producido en el proceso de producción de butanol se usa como lavado de disolvente para al menos una corriente de alimentación del proceso de producción de butanol. En algunas realizaciones, se combina una primera corriente de alimentación con una segunda corriente de alimentación para producir co-productos de destilador para piensos destinados a animales con mayor estabilidad de almacenamiento. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para piensos destinados a animales tienen un perfil de color mejorado.
- Se divulgan co-productos de destilador para una composición de pienso destinado a animales que comprende al menos aproximadamente un 20% en peso de proteína bruta de los co-productos de destilador y menos de aproximadamente un 10% en peso de proteína bruta, en la que la composición tiene un perfil de nutrientes mejorado para piensos destinados a animales o el mercado de piensos destinados a animales. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales comprenden además menos de aproximadamente un 10% en peso de ácidos grasos. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales además comprenden menos de aproximadamente un 10% en peso de éster de ácido graso. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales comprenden además no más de aproximadamente un 5% en peso de lisina. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales tiene un perfil de nutrientes para el mercado de pienso para vacuno, animales productores de leche, ganado, porcino, aves de corral, equinos, acuicultura o mascotas domésticas. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales además comprenden complementar los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales con uno o más componentes seleccionados entre amino ácidos, vitaminas, minerales, nutrientes, mejoradores de aroma, estimuladores de digestión o mejoradores de color.
- Se divulgan métodos de generación de co-productos de destilador para pienso destinado a animales, que comprenden proporcionar un proceso de producción de butanol con al menos tres corrientes de alimentación de proceso, en el que al menos tres corrientes de alimentación de proceso se combinan para generar co-productos de destilador para pienso destinado a animales que tienen un contenido de proteína bruta de al menos aproximadamente un 20%. En algunas realizaciones, las corrientes de alimentación de proceso incluyen al menos tres de (i) ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceite, (ii) lípidos procedentes de la evaporación de residuos de destilación finos, (iii) jarabe, (iv) granos de destilador (DG), (v) granos de destilador y solubles (DGS), (vi) sólidos procedentes de maceración antes de fermentación; y (vii) sólidos procedentes de residuos de destilación completos tras fermentación. En algunas realizaciones, los ácidos grasos procedente de la hidrólisis de aceite de maíz (COFA). En algunas realizaciones, los DG son granos de destilador secos (DDG), granos de destilador húmedos (WDG), granos de destilador secos y solubles (DDGS) y granos de destilador húmedos y solubles (WDGS). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para pienso destinado a animales tienen un contenido de grasas brutas menos de un 10%. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para pienso destinado a animales tienen un contenido de ácidos grasos menor de aproximadamente un 10%.
- Se divulgan métodos de producción de un componente alimentario animal de alto valor a partir de un proceso de producción de butanol, que comprende proporcionar un proceso de producción de butanol con al menos una corriente de alimentación de proceso para optimizar el contenido de proteína bruta y grasa bruta para pienso destinado a animales o el mercado de pienso destinado a animales.
- Se divulgan métodos de mitigación del impacto de contaminantes de fermentación sobre la producción de co-

productos de destilador para pienso destinado a animales, que comprenden separar al menos una corriente de alimentación de un proceso de producción de butanol antes de la fermentación.

5 Se divulgan métodos de reducción de la contaminación por micotoxina en los co-productos de destilador para pienso destinado a animales que comprenden separar las corrientes de alimentación de un proceso de producción de butanol contribuyendo a co-productos de destilador para la producción de pienso destinado a animales, y eliminar y purificar corrientes de alimentación con potencial de contaminación por micotoxina.

10 Se divulgan métodos de reducción de la variabilidad del contenido de lípidos de co-productos de destilador para pienso destinado a animales que comprenden separar las corrientes de alimentación de un proceso de producción de butanol contribuyendo a co-productos de destilador para la producción de pienso destinado a animales, y combinar las corrientes de alimentación para lograr un contenido de lípidos controlado.

15 Se divulgan métodos para aumentar el contenido de triglicéridos de co-productos de destilador para pienso destinado a animales que comprenden combinar corrientes de alimentación que contienen triglicéridos de un proceso de producción de metanol con una relación creciente en comparación con las corrientes que contienen menor contenido de triglicéridos para co-productos de destilador particulares para una composición de pienso destinado a animales.

Se divulgan co-productos de destilador para pienso destinado a animales producidos por medio de un método de la invención.

20 Se divulgan co-productos de destilador para una composición de pienso destinado a animales que comprenden al menos aproximadamente un 20% o al menos aproximadamente un 25% de proteína bruta y menos de aproximadamente un 10% o menos de aproximadamente un 15% de gras bruta, en el que la composición tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a animales o el mercado de pienso destinado a animales. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales comprenden además menos de aproximadamente un 10% de éster isobutílico de ácido graso. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales comprenden además menos de aproximadamente un 5% de lisina. En algunas realizaciones, la composición tiene un perfil de nutrientes para el mercado de piensos para porcino, el mercado de piensos para productores de leche (por ejemplo, mercado de piensos para vacuno productor de leche), el mercado de piensos para vacuno, mercado de piensos para aves de corral (por ejemplo, mercado de piensos para pollo), mercado de piensos para equinos, mercado de piensos para acuicultura, mercado de piensos para ganado y/o mercado de piensos para mascotas domésticas.

30 Un producto final de los procesos de fermentación instantáneos es un alcohol de producto, por ejemplo, butanol o etanol. El producto final producido de acuerdo con los procesos se puede separar y/o purificar a partir de los medios de fermentación. Los métodos de separación y purificación se conocen, por ejemplo, sometiendo el medio a extracción, preevaporación o destilación. En algunas realizaciones, se puede separar el macerado, por ejemplo, por medio de centrifugación en la fase líquida y se pueden recuperar una fase sólida y productos finales tales como alcohol y sólidos. El alcohol se puede recuperar por medios tales como destilación y deshidratación en tamiz molecular o ultra-filtración.

En algunas realizaciones, el rendimiento de butanol puede ser mayor que aproximadamente un 8%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 12%, aproximadamente un 14%, aproximadamente un 16% o aproximadamente un 18% en volumen.

40 En algunas realizaciones, el butanol es 1-butanol (1-BuOH), 2-butanol (2-BuOH), butanol terciario (terc-BuOH) y/o isobutanol (iBuOH, i-BuOH o I-BUOH), ya sea individualmente o en forma de mezclas.

45 Características adicionales y ventajas de las realizaciones se describen en la presente memoria, así como la estructura y operación de diversas realizaciones, se describen con detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos. Nótese que las realizaciones descritas a continuación no están limitadas a las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. Dichas realizaciones se presentan en la presente memoria con fines únicamente ilustrativos. Las realizaciones adicionales resultarán evidentes para las personas expertas en la técnica relevante, basándose en las consideraciones incorporadas en la presente memoria.

Descripción de los dibujos

50 La Figura 1a ilustra esquemáticamente corrientes de alimentación de proceso de un método y un sistema a modo de ejemplo de la presente invención.

La Figura 1b ilustra un ejemplo de un proceso de molienda en húmedo para el procesado de materias primas.

La Figura 1c ilustra un ejemplo de un proceso de molienda en seco para el procesado de materias primas.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente un método y un sistema a modo de ejemplo de la presente invención en el que se retiran los sólidos antes de la fermentación.

La Figura 3 ilustra esquemáticamente un método y un sistema alternativos a modo de ejemplo de la presente invención en los que los sólidos se retiran antes de la fermentación.

La Figura 4 ilustra esquemáticamente un método y un sistema alternativos a modo de ejemplo de la presente invención, en los que el contenido de sólidos y aceite se retiran antes de la fermentación.

5 La Figura 5 ilustra esquemáticamente un método y un sistema alternativos a modo de ejemplo de la presente invención, en los que el contenido de sólidos se retira antes de la fermentación.

La Figura 6 ilustra esquemáticamente un método y un sistema alternativos a modo de ejemplo de la presente invención para la producción de un alcohol de producto.

10 La Figura 7 ilustra esquemáticamente un método y un sistema alternativos a modo de ejemplo de la presente invención para la producción de un alcohol de producto en el que se retiran los sólidos antes de la fermentación.

La Figura 8 ilustra esquemáticamente otros métodos y sistema alternativos a modo de ejemplo de la presente invención para la producción de un alcohol de producto en los que los sólidos se retiran antes de la fermentación.

La Figura 9 ilustra el balance de masas de la corriente de alimentación del proceso de co-productos de destilador a modo de ejemplo para pienso destinado a animales.

15 En los dibujos, los números de referencia iguales indican elementos idénticos o funcionalmente similares.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se comprende comúnmente por parte del experto ordinario en la técnica a la cual pertenece la presente invención. En caso de conflicto, se controlará la presente solicitud que incluye las definiciones. De igual forma, a menos que se requiera por parte del contexto, los términos en singular incluyen pluralidades y los términos en plural incluyen el singular. A menos que se indique lo contrario, los valores en porcentaje descritos en la presente memoria están en términos del porcentaje en peso de una corriente de alimentación de proceso, co-productos de destilador, o composiciones, según resulte apropiado.

20 Con el fin de definir la presente invención, se proporcionan los siguientes términos y definiciones en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria, se comprende que los términos "comprende", "comprender", "incluye", "incluir", "tiene", "tener", "contiene" o "contener" o cualquiera de sus variaciones, implican la inclusión de un integrante afirmado o grupo de integrantes pero no la inclusión de cualquier otro integrante o grupo de integrantes. Por ejemplo, una composición, mezcla, proceso, método, artículo, o aparato que comprende un listado de elementos no necesariamente está limitado únicamente a esos elementos sino que puede incluir otros elementos no expresamente listados o inherentes a dicha composición, mezcla, proceso, método, artículo o aparato. Además, a menos que se afirme expresamente lo contrario, "o" es inclusivo y no exclusivo. Por ejemplo, la condición A o B se cumple por parte de uno cualquiera de los siguientes: A es cierto (o presente) y B es falso (o no presente), A es falso (o no presente) y B es cierto (o presente) y tanto A como B son ciertos (o presentes).

35 También, se pretende que los artículos indefinidos "un" y "una" que preceden a un elemento o componente de la invención no sean restrictivos con respecto al número de casos, es decir, apariciones del elemento o componente. Por tanto, "un" o "una" deberían leerse para que incluyan uno o al menos uno, y la forma de palabra en singular del elemento o componente también incluye el plural, a menos que el número haga referencia obviamente el singular.

40 El término "invención" o la expresión "presente invención" tal y como se usa en la presente memoria es un término o expresión no limitante y no se pretende que haga referencia a cualquier realización individual de la invención particular sino que englobe todas las posibles realizaciones como se reivindica en el presente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" que modifica la cantidad de un ingrediente o reaccionante de la invención empleado, se refiere a la variación de la cantidad numérica que puede ocurrir, por ejemplo, a través de procedimientos típicos de medición y manipulación de líquidos usados para preparar los concentrados o soluciones en el mundo real; a través de error inadvertido en los presentes procedimientos; a través de las diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para preparar las composiciones o para llevar a cabo los métodos; y similares. El término "aproximadamente" también engloba cantidades que difieren debido a condiciones de equilibrio diferentes para una composición que procede de una mezcla inicial particular. Si están o no modificadas por el término "aproximadamente", las reivindicaciones incluyen equivalentes a las cantidades. En algunas realizaciones, el término "aproximadamente" significa dentro de un 10% del valor numérico presentado, alternativamente dentro de un 5% del valor numérico presentado.

"Alcohol" o "producto de alcohol", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier alcohol que se pueda producir por medio de un microorganismo en un proceso de fermentación que utilice biomasa como fuente de sustrato de carbono fermentable. Los alcoholes incluyen, pero sin limitación, alcoholes de alquilo C₁ a C₈. En

algunas realizaciones, los alcoholes son alcoholes de alquilo C₂ a C₈. En otras realizaciones, los alcoholes son alcoholes de alquilo C₂ a C₅. Se apreciará que los alcoholes de alquilo C₁ a C₈ incluyen, pero sin limitación, metanol, etanol, propanol, butanol y pentanol. De igual forma, los alcoholes de alquilo C₂ a C₈ incluyen, pero sin limitación, etanol, propanol, butanol y pentanol.

- 5 "Butanol", tal y como se usa en la presente memoria con especificidad a los isómeros de butanol: 1-butanol (1-BuOH), 2-butanol (2-BuOH), butanol terciario (terc-BuOH) y/o isobutanol (iBuOH, i-BuOH o I-BUOH), ya sea individualmente o en sus mezclas.

"Biomasa", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un producto natural que contiene polisacáridos hidrolizables que proporcionan azúcares fermentables que incluyen cualesquiera azúcares y almidón procedentes de recursos naturales tales como maíz, caña de azúcar, trigo, material celulósico y lignocelulósico y materiales que comprenden celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, oligosacáridos, disacáridos y/o monosacáridos y sus mezclas. La biomasa puede también comprender componentes adicionales tales como proteínas y/o lípidos. La biomasa puede proceder de una fuente individual o la biomasa puede comprender una mezcla procedente de más de una fuente. Por ejemplo, la biomasa puede comprender una mezcla de zuros de maíz y tallos de maíz, o una mezcla de hierba y hojas. La biomasa incluye, pero sin limitarse a, cultivos bioenergéticos, residuos agrícolas, residuos sólidos municipales, residuos sólidos industriales, lodos procedentes de la fabricación de papel, residuos de corral, residuos de madera y forestales. Los ejemplos de biomasa incluyen, pero sin limitarse a, granos de maíz, zuros de maíz, fibra de maíz, residuos de cultivos tales como vainas de maíz, tallos de maíz, hierbas, trigo, centeno, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, paja de arroz, pasto aguja (*Panicum virgatum*), papel residual, bagazo de caña de azúcar, sorgo, caña de azúcar, soja, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas y briquetas de madera, serrín, arbustos y matorrales, verduras, frutas, flores, estiércol de animales y sus mezclas. Por ejemplo, se puede formar un macerado, jugo, molasa o hidrolizado a partir de biomasa por medio de cualquier procesado conocido en la técnica para el procesado de biomasa con fines de fermentación tales como molienda, tratamiento y/o licuefacción y comprende azúcar fermentable y puede comprender agua. Por ejemplo, la biomasa celulósica y/o lignocelulósica se puede procesar para obtener un hidrolizado que contiene azúcares fermentables por medio de cualquier método conocido por el experto en la técnica. Se divulga un pretratamiento de bajo contenido en amoníaco en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2007/0031918A1. Típicamente, la sacarificación enzimática de biomasa celulósica y/o lignocelulósica hace uso de un consorcio de enzimas para romper la celulosa inferior y la hemicelulosa con el fin de producir un hidrolizado que contiene azúcares que incluyen glucosa, xilosa y arabinosa. Las enzimas de sacarificación apropiadas para la biomasa celulósica y/o lignocelulósica se revisan en Lynd et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:506-577, 2002).

"Materia prima" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una alimentación de un proceso de fermentación, conteniendo la alimentación una fuente de carbono fermentable con o sin sólidos no disueltos, y cuando resulte aplicable, conteniendo la alimentación una fuente de carbono fermentable antes o después de que la fuente de carbono fermentable se haya liberado a partir de almidón o se obtenga a partir de la ruptura de azúcares complejos por medio de un procesado tal como licuefacción, sacarificación u otros procesos. La materia prima incluye o procede de biomasa. Las materias primas apropiadas incluyen, pero sin limitarse a, centeno, trigo, maíz, macerado de maíz, caña, macerado de caña, cebada, material celulósico, material lignocelulósico y sus mezclas.

La "fuente de carbono fermentable" o "sustrato de carbono fermentable", tal y como se usa en la presente memoria, significa una fuente de carbono susceptible de ser metabolizada por microorganismos para la producción de un alcohol fermentativo. Las fuentes de carbono fermentables apropiadas incluyen, pero sin limitación, monosacáridos tales como glucosa o fructosa; disacáridos tales como lactosa o sacarosa; oligosacáridos; polisacáridos tales como almidón o celulosa; azúcares C₅ tales como xilosa y arabinosa; sustratos de un carbono incluyendo metano; y sus mezclas.

45 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "azúcares fermentables" se refiere a uno o más azúcares (por ejemplo, oligosacáridos y monosacáridos) que se pueden convertir en productos finales por medio de fermentación con un microorganismo de fermentación.

"Azúcar" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y/o sus mezclas. El término "disacárido" también incluye carbohidratos que incluyen almidones, dextranos, glicógenos, celulosa, pentosanos, así como también azúcares.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "molido" se refiere a un material vegetal que se ha reducido de tamaño, tal como por medio de trituración, machacado, fraccionamiento o gracias a cualquier otro medio de reducción de tamaño de partícula.

55 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "macerado" se refiere a una mezcla de sustrato fermentable en un líquido usado en la producción de un producto fermentado. Este término se refiere a cualquier etapa de fermentación desde la mezcla inicial del sustrato fermentable con una o más enzimas de hidrolizado de almidón y organismos de fermentación hasta la terminación de la operación de fermentación. A veces tal y como se usa en la presente memoria, el término "macerado" y "suspensión de materia prima" se pueden usar de forma sinónima.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fermentación" se refiere a la ruptura anaerobia enzimática y/o anaerobia de sustancias orgánicas por parte de microorganismos para producir compuestos orgánicos más simples. Aunque la fermentación tiene lugar en condiciones anaerobias, no se pretende que el término únicamente se limite a condiciones anaerobias estrictas, ya que la fermentación también puede tener lugar en condiciones microaerobias o aerobias (por ejemplo, en presencia de oxígeno).

"Caldo de fermentación", tal y como se usa en la presente memoria, significa la mezcla de agua, azúcares (fuentes de carbono fermentables), sólidos disueltos, opcionalmente microorganismos que producen alcohol, alcohol de producto, y otros constituyentes del material mantenidos en un recipiente de fermentación o fermentador en el cual se produce el alcohol de producto por medio de reacción de los azúcares con alcohol, agua, y dióxido de carbono (CO₂) mediante los microorganismos presentes. Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "caldo de fermentación" se puede usar de forma sinónima con "medio de fermentación".

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "co-productos de destilador" se refiere a sub-productos de un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, butanol o etanol) que se pueden aislar antes o durante la fermentación. Los co-productos de destilador incluyen productos no fermentables que quedan tras retirar el alcohol de un macerado fermentado y los sólidos aislados a partir del macerado. Tal y como se usa en la presente memoria, los co-productos de destilador se pueden usar en una diversidad de aplicaciones de pienso destinado a animales o no destinada a animales. Los ejemplos de co-productos de destilador incluyen, pero sin limitarse a, ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceites, lípidos procedentes de la evaporación de residuos sólidos de destilación finos, jarabes, granos de destilador, granos de destilador y solubles, sólidos procedentes de macerado antes de la fermentación, y sólidos procedentes de residuos sólidos de fermentación completos tras la fermentación, biodiesel y acil glicéridos.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "co-productos de destilador para pienso destinado a animales" se refiere a co-productos de destilador que son apropiadas para su uso en o como pienso destinado a animales. Los ejemplos de co-productos de destilador para pienso destinado a animales incluyen, pero sin limitarse a, ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceites, lípidos procedentes de la evaporación de residuos sólidos de destilación finos, jarabes, granos de destilador, granos de destilador y solubles, sólidos procedentes de macerado antes de la fermentación, y sólidos procedentes de residuos sólidos de fermentación completos tras la fermentación.

Tal y como se usa en la presente memoria, las expresiones "granos de destilador" o "DG" se refieren a productos no fermentables que quedan tras retirar el alcohol (por ejemplo, etanol y/o butanol) a partir de un macerado fermentado. Los granos de destilador que se secan se conocen como "granos secos de destilador" o "DDG". Los granos de destilador que no están secos se conocen como "granos de destilador húmedos" o "WDG".

Tal y como se usa en la presente memoria, las expresiones "granos de destilador y solubles" o "DGS" hacen referencia a productos no fermentables que quedan tras retirar el alcohol (por ejemplo, etanol y/o butanol) del macerado fermentado que se han mezclado con los solubles. Los granos de destilador y los solubles que están secos se conocen como "granos secos de destilador y solubles" o "DDGS". Los granos de destilador y los solubles que no están secos se conocen como "granos de destilador húmedos y solubles" o "WDGS".

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceites" usada con respecto a una corriente de alimentación de proceso, significa un sub-producto de ácido graso producido mediante la hidrólisis de un aceite durante un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol o butanol). El sub-producto de ácido graso se puede formar por medio de centrifugación a hidrólisis de residuos sólidos de destilación completos tras la fermentación en un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol o butanol). El sub-producto de ácido graso puede, por ejemplo, producirse por medio de hidrólisis de aceite de maíz para formar "ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceite de maíz".

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "lípidos" hace referencia a cualquier grupo heterogéneo de grasas y sustancias similares a grasas incluyendo ácidos grasos, grasas neutras, ceras y esteroides, que sean solubles en agua e insolubles en disolventes no polares. Los ejemplos de lípidos incluyen monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "lípidos procedentes de evaporación" usada con referencia a una corriente de alimentación de proceso significa un sub-producto lipídico producido por medio de evaporación y centrifugación de residuos sólidos de destilación finos tras la fermentación en un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol y/o butanol).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "jarabe" o "solubles de destilador condensados" (CDS) usado con referencia a una corriente de alimentación de proceso significa un sub-producto producido por medio de evaporación de residuos sólidos de destilación finos tras la fermentación en un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol y/o butanol).

Tal y como se usa en la presente memoria, "corriente de alimentación de proceso" se refiere a cualquier sub-producto formado antes o durante un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol o butanol). Los ejemplos de corrientes de alimentación de proceso incluyen, pero sin limitarse a, COFA, lípidos procedentes de

- evaporación, jarabe, DG, DDG, WDG, DGS, DDGS y WDGS. Otro ejemplo de corriente de alimentación de proceso son los sólidos retirados (por ejemplo, mediante centrifugación) a partir de un macerado antes de la fermentación en un proceso de producción de etanol o butanol (por ejemplo, los sólidos retirados de un macerado de maíz antes de la fermentación). Estos sólidos se denominan en la presente memoria "torta húmeda" cuando aún no se han secado, y se denominan en la presente memoria "torta seca" cuando se han secado. Otro ejemplo de una corriente de alimentación de proceso son los sólidos retirados (por ejemplo, mediante centrifugación) a partir de residuos sólidos de destilación completos tras la fermentación en un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol y/o butanol). Estos sólidos se denominan en la presente memoria "torta húmeda WS" cuando todavía no se han secado y se denominan en la presente memoria "torta seca WS" cuando se han secado.
- 5
- 10 La expresión "fase acuosa" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a la fase acuosa de una mezcla bifásica obtenida por medio de contacto de un caldo de fermentación con un agente de extracción. En algunas realizaciones, la expresión "caldo de fermentación" puede hacer referencia a la fase acuosa en extracción fermentativa bifásica. Además, los sólidos no disueltos (por ejemplo, sólidos de grano) pueden estar presentes en el caldo de fermentación, de forma que la mezcla bifásica incluya los sólidos no disueltos que se pueden dispersar en la fase acuosa.
- 15
- La expresión "fase orgánica" tal y como se usa en la presente memoria hace referencia a la fase no acuosa de una mezcla bifásica obtenida por medio de contacto de un caldo de fermentación con un agente de extracción.
- "Agente de extracción" tal y como se usa en la presente memoria hace referencia a un disolvente usado para extraer un alcohol tal como butanol o usado para extraer un éster de alcohol (por ejemplo, producido por medio de catálisis de un alcohol y un ácido carboxílico o un lípido). En ocasiones, tal y como se usa en la presente memoria, el término "disolvente" se puede usar de forma sinónima con "agente de extracción". En algunas realizaciones, los agentes de extracción pueden ser disolventes orgánicos. En algunas realizaciones, los agentes de extracción pueden ser disolventes orgánicos inmiscibles con agua.
- 20
- La expresión "inmiscible con agua" se refiere a un componente químico tal como un agente de extracción o un disolvente, que es incapaz de mezclarse con una disolución acuosa tal como un caldo de fermentación, de manera tal que se forme una fase líquida.
- 25
- La expresión "ácido carboxílico" tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier compuesto orgánico con fórmula química general $-COOH$ en la que un átomo de carbono se une a un átomo de oxígeno por medio de un doble enlace para formar un grupo $(-C=O)$ y a un grupo hidroxilo $(-OH)$ por medio de un enlace sencillo. Un ácido carboxílico puede estar en forma de ácido carboxílico protonado, en forma de una sal de ácido carboxílico (por ejemplo, sal de amonio, sodio o potasio) o en forma de mezcla de ácido carboxílico protonado y sal de ácido carboxílico. La expresión ácido carboxílico puede describir especies químicas individuales (por ejemplo, ácido oleico) o una mezcla de ácidos carboxílicos como la que se puede producir, por ejemplo, mediante la hidrólisis de ésteres de ácido graso procedentes de biomasa o triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y fosfolípidos.
- 30
- La expresión "ácido graso" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un ácido carboxílico (por ejemplo, ácido monocarboxílico alifático) que tiene C_4 a C_{28} átomos de carbono (más comúnmente C_{12} a C_{24} átomos de carbono), que bien es saturado o bien insaturado. Los ácidos grasos también pueden ser ramificados o no ramificados. Los ácidos grasos pueden proceder de, o estar presentes en forma esterificada, en una grasa vegetal o animal, aceite o cera. Los ácidos grasos pueden aparecer de forma natural en forma de glicéridos en grasas o aceites grasos o se pueden obtener por medio de hidrólisis de grasas o por medio de síntesis. La expresión ácido graso puede describir una especie química individual o una mezcla de ácidos grasos. Además, la expresión ácido graso también engloba ácido grasos libres.
- 35
- 40
- La expresión "alcohol graso" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un alcohol que tiene una cadena alifática de C_4 a C_{22} átomos de carbono, que bien es saturada o insaturada.
- 45
- La expresión "aldehído libre" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un aldehído que tiene una cadena alifática de C_4 a C_{22} átomos de carbono, que bien es saturada o insaturada.
- La expresión "amida graso" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una amida que tiene una cadena alifática larga de C_4 a C_{22} átomos de carbono, que bien es saturada o insaturada.
- 50
- La expresión "éster graso" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un éster que tiene una cadena alifática larga de C_4 a C_{22} átomos de carbono, que bien es saturada o insaturada.
- Tal y como se usa en la presente memoria, el término "heterólogo" con referencia a un polinucleótido o polipéptido se refiere a un polinucleótido o polipéptido que no aparece de forma natural en la célula anfitriona. Se pretende que este término incluya proteínas que están codificadas por medio de genes que aparecen de forma natural, genes mutados, genes sintéticos y/o genes sobre-expresados.
- 55
- Tal y como se usa en la presente memoria, el término "homólogo" con referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que aparece de forma natural en la célula anfitriona.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "producto final" se refiere a cualquier producto derivado de una fuente de carbono que se convierte enzimáticamente a partir de un sustrato fermentable. En algunas realizaciones, el producto final es un alcohol, tal como etanol o butanol.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "co-producto" se refiere a un producto generado con otro producto, es decir, un producto generado de forma conjunta. En ocasiones, tal y como se usa en la presente memoria, el término "co-producto" se usa de forma sinónima con el término "sub-producto".

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "sub-producto" se refiere a un producto secundario generado durante la producción de otro producto.

10 Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "perfil de nutrientes" se refiere a la composición de nutriente de un alimento o dieta.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "organismo de fermentación" se refiere a cualquier microorganismos de célula que se apropiado para su uso en la fermentación para producir, de forma directa o indirecta, un producto final.

15 Tal y como se usan en la presente memoria, las expresiones "productor de etanol", "microorganismo productor de etanol" o "etanológico" se refieren a un organismo de fermentación que es capaz de producir etanol a partir de una fuente de carbono fermentable (por ejemplo, mono- u oligosacárido).

Tal y como se usan en la presente memoria, las expresiones "productor de butanol", "microorganismo productor de butanol" o "butanológico" se refieren a un microorganismo de fermentación que es capaz de producir butanol a partir de una fuente de carbono fermentable (por ejemplo, mono- u oligosacárido).

20 Tal y como se usan en la presente memoria, las expresiones "productor de isobutanol", "microorganismo productor de isobutanol" o "isobutanológico" se refieren a un microorganismo de fermentación que es capaz de producir isobutanol a partir de una fuente de carbono fermentable (por ejemplo, mono- u oligosacárido).

25 Tal y como se usa en la presente memoria, los términos "recuperado", "aislado" y "separado" con referencia a una proteína, células, ácido nucleico o amino ácido, se refieren a un proteína, célula, ácido nucleico o amino ácido que se retira de al menos un componente con el cual se asocia de forma natural.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "procedente de" engloba las expresiones "originado a partir de", "obtenido", "obtenido a partir de" y "aislado a partir de". En algunas realizaciones, el término "procedente de" se refiere a un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que se produce a partir de una célula en la cual el nucleótido está presente de forma natural o en el que el nucleótido se ha insertado.

30 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "rendimiento" se refiere a la cantidad de producto final generado usando los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, el término se refiere al volumen de producto final, y en otras realizaciones, el término se refiere a la concentración del producto final.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "COFA" se refiere a un ácidos grasos de aceite de maíz (por ejemplo, ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de aceite de maíz).

35 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "FABE" se refiere a ésteres butílicos de ácido graso (por ejemplo, ésteres isobutílicos).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "FAEE" se refiere a ésteres etílicos de ácido graso (por ejemplo, ésteres etílicos).

40 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "FAME" se refiere a ésteres metílicos de ácido graso (por ejemplo, ésteres metílicos).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "WS" se refiere a las fracciones inferiores de sedimentos sólidos de destilación de una columna de fermentación.

45 Los alcoholes tales como etanol y butanol se pueden producir por medio de fermentación de azúcares. Estos azúcares fermentables pueden proceder de cualquier fuente de biomasa incluyendo maíz, caña de azúcar, material celulósico o lignocelulósico y esta biomasa se puede procesar, por ejemplo, por medio de licuefacción y/o sacarificación para formar un macerado que se fermenta por parte de un microorganismo tal como una levadura. Durante el proceso de fermentación, se generan diversas corrientes de alimentación de proceso y los co-productos y/o sub-productos de estas corrientes se pueden utilizar para fabricar productos tales como alimentos para animales, combustibles (por ejemplo, biodiesel), productos industriales (por ejemplo, resinas, plásticos, lubricantes) así como también otros productos para consumo y uso industrial.

50 La presente invención proporciona co-productos y/o sub-productos de un proceso de fermentación de alcohol y métodos de producción de los co-productos y/o sub-productos. La presente invención proporciona co-productos de

destilador y métodos para producir co-productos de destilador, incluyendo co-productos de destilador para pienso destinado a animales, y métodos para producir co-productos de destilador. Los co-productos de destilador para pienso destinado a animales de la invención se pueden usar como pienso destinado a animales o se pueden usar como componentes para pienso destinado a animales.

5 En algunas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol o butanol) con al menos una corriente de alimentación de proceso, en el que se usa al menos una corriente de alimentación de proceso para generar co-productos de destilador para pienso destinado a animales que tienen un contenido de proteína bruta de al menos aproximadamente un 20% o al menos aproximadamente un 25%. En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones de la presente invención incluyen una o más corrientes de alimentación de proceso de un proceso de producción de alcohol. En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones de la presente invención incluyen al menos dos o al menos tres corrientes de alimentación de proceso de un proceso de producción de alcohol (por ejemplo, butanol o etanol). En algunas realizaciones, una corriente de alimentación de proceso es (i) ácidos grasos, (ii) lípidos, (iii) jarabe, (iv) granos de destilador (DG), (v) granos de destilador y solubles (DGS), (vi) sólidos procedentes de un macerado antes de fermentación; (vii) sólidos procedentes de residuos sólidos de destilación tras la fermentación, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas realizaciones, los ácidos grasos pueden proceder de la hidrólisis de aceite. En algunas realizaciones, los ácidos grasos procedente de la hidrólisis de aceite de maíz. En algunas realizaciones, los lípidos proceden de la evaporación de residuos sólidos de destilación finos. En algunas realizaciones, los DG son granos de destilador secos (DDG), granos de destilador húmedos (WDG), granos de destilador secos y solubles (DDGS), granos de destilador húmedos y solubles (WDGS) o cualquiera de sus combinaciones. En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones de la presente invención incluyen dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más corrientes de alimentación de proceso de un proceso de producción de alcohol. En algunas realizaciones, las corrientes de alimentación de proceso se reciclan en un proceso de producción de alcohol.

Los sistemas y procesos de la presente invención producen co-productos de destilador que tienen contenidos controlados y optimizados de uno o más de proteína, grasa, fibras, ceniza, lípido, aminoácidos, vitaminas y minerales, que se pueden usar como pienso destinado a animales de alto valor o se pueden usar para producir pienso destinado a animales de alto valor. Los amino ácidos incluyen, por ejemplo, amino ácidos esenciales tales como histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina así como también otros amino ácidos tales como alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, hidroxilisina, hidroxiprolina, ornitina, prolina, serina y tirosina. Los minerales incluyen, por ejemplo, calcio, cloruro, cobalto, cobre, fluoruro, yodo, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, selenio, sodio, azufre y cinc. Las vitaminas incluyen, por ejemplo, vitaminas A, C, D, E, K y B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, biotina, vitamina B6, vitamina B12 y folato).

Los co-productos de destilador se pueden modificar para un pienso destinado a animales particular o un mercado de pienso destinado a animales basado en la selección de una corriente de alimentación de proceso particular de un proceso de producción de alcohol usado para producir co-productos de destilador. Los co-productos de destilador pueden ser también modificados para un pienso particular destinado a animales o mercado de pienso destinado a animales, al seleccionar las corrientes de alimentación particulares de un proceso de producción de alcohol objeto de combinación para producir los co-productos de destilador. Los co-productos de destilador de la presente invención tienen la ventaja económica de permitir tasas de inclusión elevadas de los co-productos de destilador en el pienso destinado a animales. De igual forma, la producción de co-productos de destilador de la presente invención requiere menos energía.

Un sistema y proceso a modo de ejemplo de la presente invención se describe haciendo referencia a la Figura 1a. La Figura 1a ilustra un sistema y proceso a modo de ejemplo para fermentación que indica corrientes de alimentación de proceso de la presente invención. Aunque se describe la Figura 1a con referencia a las corrientes de alimentación de proceso a modo de ejemplo, debería comprenderse que dependiendo de la alimentación animal particular deseada, las corrientes de alimentación de proceso combinadas y las operaciones unitarias y sus ajustes de proceso se pueden variar a partir del sistema y el proceso a modo de ejemplo de la Figura 1a.

Los alcoholes tales como etanol y butanol se pueden producir a partir de materias primas procedentes de biomasa. Esta materia prima se puede procesar por medio de molienda en seco o húmedo y la materia prima también se puede someter a licuefacción y/o sacarificación para crear una suspensión de materia prima o macerado que comprende azúcares fermentables y sólidos no disueltos. Para una descripción de los métodos y sistemas para el procesado de biomasa para fermentación y separación de los sólidos no disueltos, véase por ejemplo, la patente internacional PCT N.º publicación WO 2011/160030.

En referencia a la Figura 1, el macerado (o la suspensión de materias primas) que comprende una o más fuentes de carbono fermentable y uno o más microorganismos se pueden añadir a la fermentación 100 en la que cual se fermenta el macerado por parte de los microorganismos para producir un alcohol tal como etanol o butanol. En algunas realizaciones, el macerado se fermenta con un microorganismo (por ejemplo, levadura) a temperaturas dentro del intervalo de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 38°C y también de aproximadamente 25°C a aproximadamente 35°C; a un intervalo de pH de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 6,5; también de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 6,0; de

aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente 5,0 y también de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente 4,5 durante un período de tiempo de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 120 horas, preferentemente de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 120 horas y más preferentemente de aproximadamente 24 a aproximadamente 90 horas para producir un alcohol producto tal como butanol. En algunas realizaciones, el proceso de producción de alcohol (por ejemplo, etanol o butanol) comprende la fermentación de azúcares de maíz, cebada, trigo, centeno, avena o azúcar de caña.

La corriente de fermentación 105 que comprende al alcohol puede transferirse a una columna de cerveza 120. El alcohol se puede vaporizar dentro de la columna de cerveza 120, y la corriente 122 vaporizada rica en alcohol se puede enviar a la recuperación de alcohol 190 (por ejemplo, destilación) para el procesado posterior del alcohol. La corriente inferior 125 de la columna de cerveza es residuo sólido de destilación completo que contiene sólidos no fermentados (por ejemplo, sólidos de grano de destilador), materiales disueltos y agua. La corriente inferior 125 se puede procesar en la separación de sólidos 140 y se puede separar en sólidos 145 (por ejemplo, torta húmeda) y una corriente líquida conocida como residuo 142 sólido de destilación fino. La separación de sólidos se puede lograr gracias a un número de medios incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, separación por tamices, hidrociclón, o cualesquiera otros medios para separar líquidos de sólidos. El residuo 142 sólido de destilación fino se puede conducir a un sistema de evaporación 160 (por ejemplo, un sistema de cuatro (4) efectos por dos (2) cuerpos) para la retirada de agua. Los ejemplos de sistemas de evaporación se describen en la patente de EE.UU. N.º de publicación 2011/0315541, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. El sistema de evaporación 160 evapora cada vez más agua procedente del residuo 142 sólido de destilación fino para producir finalmente un jarabe 165. En algunas realizaciones, el sistema de evaporación 160 evapora agua a partir del residuo 142 sólido de destilación fino de manera que la concentración en peso de agua en el jarabe 165 sea de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 80%, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 70%, o de aproximadamente un 55% a aproximadamente un 65%. En algunas realizaciones, el jarabe 165 se puede combinar con una torta húmeda 145 en un mezclador 150 para producir una alimentación mixta 155 que se seca en un secador 180 para dar lugar a DDGS.

Como se ha comentado anteriormente, la materia prima se puede procesar por medio de procesos de molienda en seco o en húmedo. La molienda en húmedo es un proceso de multi-etapa que separa la biomasa (por ejemplo, maíz) en sus componentes clave (germen, fibra de pericarpio, almidón y gluten) con el fin de capturar valor procedente de cada co-producto por separado. Usando maíz como materia prima, este proceso produce diversos co-productos; almidón, alimentación de gluten, metal de gluten y corrientes de aceite de maíz. Estas corrientes se pueden recombinar y procesar para producir productos adaptados para la industria de alimentación. Haciendo referencia a la Figura 1b, la materia prima (por ejemplo, maíz) se conduce a tanques de inmersión en los cuales se sumerge, por ejemplo, en una disolución de dióxido de sodio durante aproximadamente 30-50 horas a aproximadamente 49-54°C (120-130°F). Los nutrientes liberados en el agua se pueden recoger y evaporar para producir extractos fermentados y condensados (o licor de inmersión). El germen se puede retirar de la materia prima sumergida y se puede procesar de forma adicional para recuperar aceite y harina de germen. Tras la retirada del germen, la parte restante de la materia prima se puede procesar para retirar el salvado y producir una suspensión de almidón y gluten. La suspensión se puede procesar de forma adicional para separar el almidón y la proteína de gluten que se puede secar para formar harina de gluten. La corriente de almidón se puede procesar de forma adicional por medio de fermentación para producir un alcohol o se puede utilizar para las industrias alimentaria, de papel o textil. Por ejemplo, la corriente de almidón se puede utilizar para producir edulcorantes. La harina de gluten y la corriente de alimentación de gluten que contienen ambas la proteína, grasa, y fibra, se pueden usar en alimentaciones para vacuno de ternera y producción de leche, aves de corral, porcino, ganado, equinos, acuicultura y mascotas domésticas. La alimentación de gluten también se puede usar como vehículo para los micro-nutrientes añadidos. La harina de gluten también contiene metionina y xantófilos que se pueden usar como ingrediente de pigmento, por ejemplo, en alimentos para aves de corral (por ejemplo, el pigmento proporciona yemas de huevo con pigmentación amarilla). Los extractos fermentados y condensados que contienen proteínas, factores de crecimiento, vitaminas B, y minerales se pueden usar como ingrediente de alimentación líquida de alta energía. Los extractos condensados también se pueden usar como aglutinante de pellas.

El fraccionamiento retira la fibra y el germen, que contienen una mayoría de los lípidos presentes en el maíz completo molido dando como resultado un maíz fraccionado que tiene un elevado contenido de almidón (endospermas). El fraccionamiento en seco no separa el germen de la fibra y, por tanto, es menos costoso que la molienda en húmedo. No obstante, el fraccionamiento no retira la totalidad de la fibra o germen, y no tiene como resultado la eliminación total de los sólidos. Además, existe cierta pérdida de almidón en el fraccionamiento.

También se puede utilizar la molienda en seco para el procesado de la materia prima. Haciendo referencia a la Figura 1c, se puede moler la materia prima, por ejemplo, usando un molino de martillos para generar una harina que después se puede mezclar con agua para formar una suspensión. La suspensión se puede someter a licuefacción mediante la adición de una enzima tal como una amilasa para hidrolizar almidón hasta azúcares, formando un macerado. El macerado se puede calentar ("cocción") para inactivar la enzima y después se puede enfriar para la adición a la fermentación. El macerado enfriado (es decir, caldo de fermentación), el microorganismo, y la enzima tal como glucoamilasa, se pueden añadir a la fermentación para la producción de alcohol (por ejemplo, etanol o butanol). Tras la fermentación, se puede conducir el caldo de fermentación a destilación para la recuperación del alcohol. La corriente inferior de la columna de destilación, que es residuo sólido de destilación completo que

5 contiene sólidos no fermentados (por ejemplo, sólidos de grano de destilador), los materiales disueltos y el agua se pueden recoger para el procesamiento posterior. El residuo sólido de destilación completo se puede separar en sólidos (por ejemplo, torta húmeda) y residuo sólido de destilación fino. La separación de los sólidos se puede lograr gracias a un número de medios que incluyen, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, separación por tamices, hidrociclón o cualesquiera otros medios para separar líquidos de sólidos. El residuo sólido de destilación fino se puede conducir a evaporación formando solubles de destilador condensados (CDS) o jarabe. El residuo sólido de destilación fino puede comprender nutrientes solubles, sólidos de grano pequeños (o partículas finas) y microorganismos (por ejemplo, levaduras). Los sólidos (torta húmeda) se pueden combinar con jarabe y después se pueden secar para formar Granos Secos de Destilador con Solubles (DDGS). El jarabe contiene proteína, grasa, y fibra así como también vitaminas y minerales tales como fósforo y potasio; y se puede añadir a pienso destinado a animales por su valor nutricional y apetencia. DDGS contiene proteína, grasa y fibra; y proporciona una fuente de proteína de bypass. DDGS se puede usar en pienso destinado a animales para vacuno de ternera y de producción de leche, aves de corral, porcino, ganado, equinos, acuicultura y mascotas domésticas.

15 Como se ha descrito anteriormente, la materia prima se puede licuar para producir una suspensión de materia prima que comprende azúcares fermentables y sólidos no disueltos. Si la suspensión de materia prima se alimenta directamente al fermentador, los sólidos no disueltos pueden interferir con retirada eficaz y recuperación del alcohol (por ejemplo, etanol o butanol) a partir del fermentador. Por ejemplo, cuando se utiliza extracción líquido-líquido para extraer el alcohol del caldo de fermentación, la presencia de sólidos disueltos puede provocar ineficiencias en el sistema que incluyen, pero sin limitarse a, disminución de la tasa de transferencia de masa del alcohol al agente de extracción mediante interferencia con el contacto entre el agente de extracción y el caldo de fermentación y reducción de la eficiencia de recuperación y reciclaje del agente de extracción debido a que al menos una parte del agente de extracción y el alcohol se quedan "retenidos" en los sólidos que se retiran finalmente como DDGS. De este modo, con el fin de evitar y/o minimizar estos problemas, al menos una parte de los sólidos no disueltos se puede retirar de la suspensión de materias primas antes de la adición de la suspensión de materia prima hasta el fermentador. La actividad de extracción y la eficiencia de la producción de alcohol aumentan cuando se lleva a cabo la extracción en un caldo de fermentación que contiene una disolución acuosa en la que se han retirado los sólidos no disueltos con respecto a la extracción llevada a cabo en un caldo de fermentación que contiene una disolución acuosa en la que los sólidos disueltos no se han retirado (véase, por ejemplo, la patente internacional PCT N.º publicación WO 2011/160030).

30 La retirada de sólidos de la suspensión de materias primas tiene diversas ventajas adicionales. Por ejemplo, debido a que los sólidos no disueltos no se envían al recipiente de fermentación, los microorganismos no entran en contacto con los sólidos no disueltos. Dado que los sólidos no disueltos no están expuestos a microorganismos así como un agente de extracción, alcohol de producto u otros sub-productos de la fermentación, se puede memorar el procesamiento de estos sólidos para pienso destinado a animales. Además, la retirada de los sólidos no disueltos antes de la fermentación puede permitir la separación y el reciclaje de microorganismos. La capacidad para reciclar los microorganismos puede reducir o eliminar la necesidad de cultivar microorganismos adicionales para el proceso de fermentación y la necesidad de equipos adicionales para la proliferación microbiana (por ejemplo, tanques de propagación).

40 La separación de la suspensión de materias primas produce una fase sólida (por ejemplo, una torta húmeda) que se puede procesar de forma adicional. La torta húmeda puede incluir una parte de azúcares fermentables. Como ejemplo de procesamiento de la torta filtrante, la torta húmeda se puede lavar con agua para recuperar los azúcares fermentables presentes en la torta húmeda, y los azúcares fermentables recuperados se pueden reciclar y, por ejemplo, se pueden usar en el proceso de licuefacción. Tras el lavado, la torta húmeda se puede procesar de forma adicional por ejemplo para formar el pienso destinado a animales.

45 El proceso para la retirada de sólidos se puede modificar para que incluya la descarga de una corriente de aceite a partir del proceso de separación. Por ejemplo, si el maíz está presente en la materias primas, también se puede producir aceite de maíz durante la preparación de las materias primas. El aceite no se puede descargar por separado de los sólidos no disueltos, y finalmente puede estar presente en la torta húmeda. Cuando la torta húmeda se retira por medio de centrifugación u otro medio de separación como se describe en la presente memoria, una parte del aceite procedente de la materias primas (por ejemplo, aceite de maíz procedente de materias primas de maíz) puede permanecer en la torta húmeda. La torta húmeda se puede lavar, por ejemplo, con agua adicional en una centrífuga u otro dispositivo de separación. En algunas realizaciones, el aceite se puede separar de la torta húmeda y, por ejemplo, se puede convertir en un agente de extracción para su uso posterior en el mismo proceso de fermentación o en un proceso de fermentación diferente.

55 Un sistema y proceso a modo de ejemplo de la presente invención se describe haciendo referencia a la Figura 2. La materia prima se puede licuar para generar un macerado licuado (o suspensión de alimentación) que comprende los sólidos no disueltos y azúcares fermentables. El macerado licuado puede penetrar en la separación de sólidos 210 para formar la torta húmeda 215 que comprende los sólidos no disueltos y una disolución clarificada de azúcares 212 fermentables disueltos (por ejemplo, macerado fino). Los sólidos no disueltos se pueden separar del macerado licuado (o suspensión de materias primas) por un número de medios que incluyen, sin limitarse a, centrifugación en recipiente con decantador, centrifugación en tricantador, centrifugación en pila de discos, centrifugación con filtración, centrifugación con decantador, filtración, filtración a vacío, filtro de bandas, filtración a presión, filtración

usando un tamiz, separación en tamiz, rejilla, rejilla porosa, flotación, hidrociclón, prensa filtrantes, prensa de tornillo, decantador de gravedad, separación vorticial o sus combinaciones. La torta húmeda 215 se puede conducir al lavado de sólidos 230 para recuperar los azúcares fermentables a partir de una torta húmeda 215. Se forma la torta 235 húmeda lavada y los líquidos de lavado totales generados en el lavado de sólidos 230 se pueden reciclar y, por ejemplo, se pueden usar en el proceso de licuefacción. La torta 235 húmeda lavada se puede combinar con jarabe 265 en el desecador 280 para producir DDGS.

El macerado fino 212 y los microorganismos se pueden añadir a la fermentación 200 en la que el macerado se fermenta por medio del microorganismo para producir la corriente de fermentación 205 que comprende un alcohol tal como etanol o butanol. La corriente de fermentación 205 se puede conducir a una columna de cerveza 220 para producir una corriente 222 rica en alcohol y una corriente inferior 225. La corriente 222 rica en alcohol se puede enviar a la recuperación de alcohol 290 para la recuperación del alcohol de producto. La corriente inferior 225 que comprende residuos sólidos de destilación fino, con la mayoría de los sólidos retirados antes de la fermentación, se puede concentrar por medio de evaporación por medio del sistema de evaporación 260 para formar un jarabe 265.

Como se ha descrito anteriormente, se puede procesar la materia prima para producir una suspensión de materias primas que comprende azúcares fermentables y sólidos no disueltos. Las Figuras 3 y 5 proporcionan sistemas a modo de ejemplo y procesos que se pueden utilizar para procesar las materias primas. En algunas realizaciones, como se muestra, por ejemplo en la Figura 3, el sistema incluye un recipiente de licuefacción 310 configurado para licuar una materia prima para crear una suspensión de materias primas. En particular, la materia prima 312 se puede introducir en una entrada en el recipiente de licuefacción 310. La materia prima 312 puede ser cualquier material de biomasa apropiada conocido en la industria que incluye, pero sin limitación a, centeno, trigo, caña o maíz, que contiene una fuente de carbono fermentable tal como almidón.

El proceso de licuefacción de las materias primas implica la hidrólisis de almidón de la materia prima 312 para dar lugar a azúcares solubles en agua. Se puede usar cualesquiera procesos de licuefacción, así como el correspondiente recipiente de licuefacción, normalmente utilizado en la industria incluyendo, pero sin limitarse a, el proceso de ácido, el proceso de enzima-ácido o el proceso de enzima. Dichos procesos se pueden usar solos o en combinación. En algunas realizaciones, el proceso de enzima se puede utilizar y se introduce una enzima 314 apropiada, por ejemplo, alfa-amilasa, en una entrada del recipiente de licuefacción 310. También se introduce agua en el recipiente de licuefacción 310.

El proceso de licuefacción de la materia prima 312 crea una suspensión 315 de materias primas que incluye azúcar (por ejemplo, carbono fermentable) y sólidos no disueltos procedentes de la materia prima o biomasa. Los sólidos no disueltos son partes no fermentables de la materia prima 312. En algunas realizaciones, la materia prima 312 puede ser maíz, tal como molido en seco, granos de maíz no sometidos a separación y las partículas no disueltas pueden incluir germen, fibra y gluten. La suspensión 315 de materias primas se puede descargar a partir de una salida del recipiente de licuefacción 310. En algunas realizaciones, la materia prima 312 es maíz o granos de maíz y la suspensión 315 de materias primas es una suspensión de macerado de maíz.

La separación 320 configurada para retirar los sólidos no disueltos de la suspensión 315 de materias primas tiene una entrada para recibir la suspensión 315 de materias primas. La separación 320 agita o centrifuga la suspensión 315 de materias primas para crear una fase líquida o disolución acuosa 322 y una fase sólida o torta húmeda 325.

La disolución acuosa 322 puede incluir azúcar, por ejemplo, en forma de oligosacáridos, y agua. La disolución acuosa puede comprender al menos aproximadamente 10% en peso de oligosacáridos, al menos aproximadamente 20% en peso de oligosacáridos o al menos aproximadamente 30% en peso de oligosacáridos. La disolución acuosa 322 se puede descargar fuera de la salida ubicada cerca de la parte superior de la separación 320. La disolución acuosa tiene una viscosidad menor de aproximadamente 20 centipoise, o menor de aproximadamente 15 centipoise, o menor de aproximadamente 10 centipoise, o menor de aproximadamente 5 centipoise. La disolución acuosa puede comprender menos de aproximadamente 20 g/l de glucosa monomérica, o menos de aproximadamente 10 g/l, o menos de aproximadamente 5 g/l de glucosa monomérica. La metodología apropiada para determinar la cantidad de glucosa monomérica se conoce bien en la técnica. Dichos métodos apropiados que se conocen en la técnica incluyen HPLC.

La torta húmeda 325 puede incluir sólidos no disueltos. La torta húmeda 325 puede descargarse a partir de una salida ubicada cerca de la parte inferior de la separación 320. La torta húmeda 325 puede también incluir una parte del azúcar y agua. La torta húmeda 325 puede lavarse con agua adicional en la separación 320 una vez que la disolución acuosa 322 se ha descargado a partir de la separación 320. Alternativamente, la torta húmeda 325 se puede lavar con agua adicional en otro dispositivo de separación (por ejemplo, centrífuga). El lavado de la torta húmeda 325 recupera el azúcar o la fuente de azúcar (por ejemplo, oligosacáridos) presentes en la torta húmeda, y el azúcar recuperado y el agua se pueden reciclar hasta la licuefacción 310. Tras el lavado, la torta húmeda 325 se puede procesar de forma adicional para formar DDGS a partir de cualquier proceso conocido apropiado. La formación de DDGS a partir de la torta húmeda 325 formada en la separación 320 tiene diversas ventajas. Dado que los sólidos no disueltos no se desplazan hasta el fermentador, el agente de extracción y/o el alcohol no quedan retenidos en DDGS, DDGS no se ve sometido a las condiciones del fermentador, y DDGS no entra en contacto con los microorganismos presentes en el fermentador. Todos estos efectos proporcionan ventajas para el procesado

posterior y la comercialización de DDGS, por ejemplo, como pienso destinado a animales.

5 La separación 320 puede ser cualquier centrífuga convencional utilizada en la industria, incluyendo, por ejemplo, una centrífuga de cuenco decantador, centrífuga de tricantador, centrífuga de pila de discos, centrífuga de filtración o centrífuga con decantador. En algunas realizaciones, la retirada de los sólidos no disueltos de la suspensión 315 de materias primas se puede lograr por medio de filtración, filtración a vacío, filtro de bandas, filtración a presión, filtración usando tamices, separación por tamices, rejillas, rejillas porosas, flotación, hidrociclón, prensa filtrante, prensa de tornillo, decantador por gravedad, separador vorticial o cualquier método que se pueda usar para separar sólidos de líquidos.

10 Si se usa maíz como materia prima, los sólidos no disueltos se pueden retirar del macerado de maíz para formar dos corrientes de producto, por ejemplo, una disolución acuosa de oligosacáridos que contiene una concentración baja de sólidos en comparación con el macerado de maíz y una torta húmeda que contiene una concentración elevada de sólidos en comparación con el macerado de maíz. Además, se puede generar una tercera corriente que contiene aceite de maíz si, por ejemplo, se utiliza una centrífuga con tricantador para la retirada de sólidos del macerado de maíz. Se puede usar una centrífuga con tricantador para la separación de tres fases tal como separación de fase
15 líquidas (por ejemplo, corriente acuosa y corriente oleosa) y una fase sólida (por ejemplo, sólidos) (véase, por ejemplo, Flottweg Tricanter®, Flottweg AG, Vilsbiburg, Alemania; Tricanter® Oil Separation System, ICM, Inc., Colwich, KS;). Las dos fases líquidas se pueden separar y decantar a partir del cuenco por medio de dos sistemas de descarga para evitar la contaminación cruzada y la fase de sólidos se puede retirar por medio de un sistema de descarga por separado. Como tal, se puede generar un número de corrientes de producto usando diferentes técnicas de separación o una de sus combinaciones.
20

La fermentación 300 configurada para fermentar la disolución acuosa 322 para producir un alcohol tiene una entrada para recibir la disolución acuosa 322. La fermentación 300 puede incluir un caldo de fermentación. El microorganismo 302 se puede introducir en la fermentación 300 y se puede incluir en el caldo de fermentación. El microorganismo 302 consume el azúcar de la disolución acuosa 322. En algunas realizaciones, el microorganismo
25 302 consume el azúcar de la disolución acuosa 322 y produce un alcohol tal como etanol o butanol. La corriente 306 que comprende el alcohol se puede descargar de la fermentación 300 y se puede procesar de forma adicional para la recuperación del alcohol.

30 En algunas realizaciones, la sacarificación simultánea y la fermentación (SSF) pueden tener lugar dentro de la fermentación 300. Se puede usar cualquier proceso de sacarificación conocido utilizado en la industria incluyendo, pero sin limitarse a, el proceso de ácido, el proceso de enzima-ácido o el proceso de enzima. En algunas realizaciones, la enzima 308 tal como glucoamilasa, se puede introducir en una entrada de la fermentación 300 con el fin de catalizar la ruptura de los azúcares en forma de oligosacáridos presentes en la disolución acuosa 322 para dar lugar a monosacáridos.

35 En algunas realizaciones, el caldo de fermentación 304 se puede descargar de la salida de la fermentación 300. El caldo de fermentación 304 descargado puede incluir un microorganismo 302 tal como una levadura. El microorganismo 302 se puede separar fácilmente a partir del caldo de fermentación 304 usando cualquier dispositivo de separación apropiado, por ejemplo, una centrífuga. El microorganismo 302 se puede reciclar después hasta la fermentación 300, lo cual puede, con el tiempo, aumentar la tasa de producción del alcohol, dando como resultado de este modo un aumento de la eficiencia de la producción de alcohol.

40 En algunas realizaciones, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 4, los sistemas y los procesos de la presente invención, pueden incluir la descarga de un aceite 426 procedente de una salida de la separación 420. La Figura 4 es idéntica a la Figura 3, excepto por la corriente de aceite 426 que abandona la separación 420 y por tanto no se describe con gran detalle.

45 La suspensión 415 de materias primas se separa en una primera fase líquida o disolución acuosa 422 que contiene el azúcar fermentable, una fase sólida o torta húmeda 425 que contiene el sólido no disuelto, y una segunda fase líquida que contiene aceite 426 que puede abandonar la separación 420. En algunas realizaciones, la materia prima 412 es maíz y el aceite 426 es aceite de maíz. Se puede usar cualquier dispositivo de separación apropiado para descargar la disolución acuosa 422, la torta húmeda 425 y el aceite 426, por ejemplo, una centrífuga con tricantador. En algunas realizaciones, una parte del aceite procedente de la materia prima 412 tal como aceite de maíz cuando
50 la materia prima es maíz, permanece en la torta húmeda 425. En algunas realizaciones, la torta húmeda 425 incluye aceite de maíz en una cantidad menor de aproximadamente 20% en peso del contenido de sólidos secos de la torta húmeda 425.

55 En algunas realizaciones, cuando la materia prima 412 (por ejemplo, maíz) y el aceite de maíz 426 se retiran de la separación 420, el caldo de fermentación de la fermentación 400 incluye una cantidad reducida de aceite de maíz. Por ejemplo, el caldo de fermentación, sustancialmente libre del sólido no disuelto, puede incluir una parte de alcohol (por ejemplo, butanol) y una parte de aceite (por ejemplo, aceite de maíz) en una proporción de al menos aproximadamente 4:1 en base en peso, al menos aproximadamente 3:1 en base en peso, o al menos aproximadamente 2:1 en base en peso. El aceite de maíz puede contener, por ejemplo, al menos 15% en peso de ácidos grasos libres o al menos 16,7% en peso de ácidos grasos libres.

En algunas realizaciones, la separación 420 produce un perfil de producto que incluye una capa de sólidos no disueltos, una capa de aceite (por ejemplo, aceite de maíz) y una capa de sobrenadante que incluye los azúcares fermentables. La proporción de azúcares fermentables en la capa de sobrenadantes con respecto a la capa de sólidos no disueltos en base en peso puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1; la proporción de azúcares fermentables en la capa de sobrenadante con respecto a aceite de maíz en la capa de aceite de maíz en base en peso puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 50:1; y/o la proporción de sólidos no disueltos en la capa de sólidos no disueltos con respecto a aceite de maíz en la capa de aceite de maíz en base en peso puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 25:1.

Si el aceite 426 no se descarga por separado se puede retirar con la torta húmeda 425. Cuando la torta húmeda 425 se retira por medio de la separación 420, en algunas realizaciones, una parte del aceite de la materia prima 412, tal como el aceite de maíz cuando la materia prima es maíz, permanece en la torta húmeda 425. La torta húmeda 425 se puede lavar con agua adicional en la separación 420 una vez que se ha descargado la disolución acuosa 422 de la separación 420. El lavado de la torta húmeda 425 recupera el azúcar (por ejemplo, oligosacáridos) presente en la torta húmeda y el azúcar recuperado y el agua se pueden reciclar en la licuefacción 410. Tras el lavado, la torta húmeda 425 se puede combinar con solubles y después se puede secar para formar DDGS por medio de cualquier proceso conocido. La formación de DDGS a partir de la torta húmeda 425 formada en la separación 420 tiene diversas ventajas. En algunas realizaciones, el aceite 426 no se descarga por separado de la torta húmeda 425, sino que el aceite 426 se incluye como parte de la torta húmeda 425 y está presente de forma final en el DDGS. En dichos casos, el aceite se puede separar de DDGS y se puede convertir en un agente de extracción (por ejemplo, un agente de extracción para ISPR) para su uso posterior en el mismo proceso de fermentación de alcohol o en un proceso diferente.

El aceite 426 se puede separar de DDGS usando cualquier proceso conocido incluyendo, por ejemplo, un proceso de extracción con disolvente. En algunas realizaciones de la invención, DDGS se introducen en un recipiente de reacción y se lavan con un disolvente tal como hexano para retirar el aceite 426. Otros disolventes que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, isobutanol, isohexano, etanol, destilados de petróleo tales como éter de petróleo o sus mezclas. Tras la extracción del aceite 426, DDGS se pueden tratar para retirar cualquier disolvente residual. Por ejemplo, DDGS se pueden calentar para vaporizar cualquier disolvente residual usando cualquier método conocido en la técnica. Tras la retirada de disolvente, DDGS se pueden someter a un proceso de secado para retirar cualquier agua residual. Los DDGS procesados se pueden usar como complemento alimenticio para animales tales como aves de corral, ganado, rumiantes, vacuno, animales productores de leche, porcino, caprino, ovino, acuicultura (por ejemplo, salmón, bagre, trucha, gamba), equino y mascotas domésticas.

Tras la extracción a partir de DDGS, el aceite 426 resultante y la mezcla de disolvente se puede recoger para la separación del aceite 426 a partir del disolvente. En algunas realizaciones, la mezcla aceite 426/disolvente se puede procesar por medio de evaporación de manera que el disolvente se evapore y se pueda recoger y reciclar. El aceite recuperado se puede convertir en un agente de extracción (por ejemplo, un agente de extracción para ISPR) para su uso posterior en un proceso de fermentación de alcohol igual o diferente.

La retirada del componente de aceite de las materias primas resulta ventajosa para la producción de alcohol, ya que el aceite presente en el fermentador puede romperse en ácidos grasos y glicerina. La glicerina se puede acumular en el agua y reducir la cantidad de agua que se encuentra disponible para el reciclaje de todo el sistema. De este modo, la retirada del componente de aceite de las materias primas aumenta la eficiencia de la producción de alcohol, aumentando la cantidad de agua que se puede reciclar a través del sistema.

En algunas realizaciones, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 5, los sistemas y los procesos de la presente invención pueden incluir una serie de dos o más dispositivos de separación (por ejemplo, centrífugas). La Figura 5 es idéntica a la Figura 3, exceptuando la adición de un segundo dispositivo de separación 520' y por tanto no se describe con más detalle.

La disolución acuosa 522 descargada a partir de la separación 520 se puede recibir en una entrada de la separación 520'. La separación 520' es idéntica a la separación 520 y puede operar de la misma manera. La separación 520' puede retirar los sólidos no disueltos de la disolución acuosa 522 en la separación 520 para crear (i) una corriente acuosa 522' similar a la corriente acuosa 522, pero que contiene cantidades reducidas de sólidos no disueltos en comparación con la corriente acuosa 522 y (ii) una torta húmeda 525' similar a la torta húmeda 525. A continuación, se puede introducir la corriente acuosa 522' en la fermentación 500. En algunas realizaciones, puede haber uno o más dispositivos de separación adicionales tras la separación 520'. El microorganismo 502 y la enzima 508 se pueden añadir a la fermentación 500, produciendo la corriente de alcohol 506 que se puede procesar de forma adicional para la recuperación de alcohol.

El caldo de fermentación 504 se puede descargar de la fermentación 500. El caldo de fermentación 504 descargado puede incluir un microorganismo 502. El microorganismo 502 se puede separar a partir del caldo de fermentación 504 usando cualquier dispositivo de separación apropiado, por ejemplo, una centrífuga. El microorganismo 502 se puede recircular después hasta la fermentación 500, lo que, con el tiempo, puede aumentar la tasa de producción de alcohol, dando como resultado de este modo un aumento de la eficiencia de la producción de alcohol.

Si se usa maíz como fuente del grano molido, se puede separar aceite de maíz a partir de las corrientes de proceso en cualesquier puntos diversos. Por ejemplo, una centrífuga puede operar para producir una corriente de aceite de maíz tras la filtración del macerado sometido a cocción. El jarabe de concentración intermedio o el jarabe final se pueden centrifugar para producir una corriente de aceite de maíz.

- 5 En alguna realización de los métodos de la invención, el material descargado del fermentador se puede procesar en un sistema de separación que implica dispositivos tales como una centrífuga, decantador, hidrociclón, etc. y sus combinaciones para llevar a cabo la recuperación de levadura viva en forma concentrada que se puede reciclar para la reutilización en un lote de fermentación posterior, ya sea de forma directa o tras cierto re-acondicionamiento. Este sistema de separación también puede producir una corriente orgánica que comprende ésteres grasos (por ejemplo, ésteres grasos isobutílicos) y un alcohol (por ejemplo, butanol) producidos a partir de la fermentación y una corriente acuosa que contiene únicamente niveles de traza de orgánicos inmiscibles. Esta corriente acuosa se puede usar bien antes o bien después de que se separar el contenido de alcohol (por ejemplo, butanol) para volver a formar la pasta y bombear los sólidos de bajo contenido en almidón que se separaron y se lavaron a partir del macerado licuado. En algunas realizaciones, el material de multi-fase puede abandonar la parte inferior de la columna y se puede procesar en un sistema de separación como se ha descrito con anterioridad. Los sólidos concentrados se pueden re-dispersar en la corriente acuosa y esta corriente combinada se puede usar para volver a formar pasta y bombear los sólidos de bajo contenido de almidón que se separaron y lavaron a partir del macerado licuado.

Los alcoholes tales como butanol se pueden recuperar a partir del caldo de fermentación por medio de fermentación extractiva. En general, el caldo de fermentación se pone en contacto con un agente de extracción formando una mezcla bifásica o de dos fases que comprende una fase orgánica que contiene alcohol y una fase acuosa. El proceso de extracción se puede llevar a cabo con el recipiente de fermentación (es decir, retirada de producto in situ) o aguas abajo del recipiente de fermentación. La retirada de producto in situ (ISPR) se puede llevar a cabo en modo discontinuo, en modo de alimentación-discontinuo o en modo continuo. Los métodos de producción y recuperación de alcoholes a partir de un caldo de fermentación que usan fermentación se describen en la patente de Estados Unidos N.º de Solicitud 2009/0305370; patente de Estados Unidos N.º de Solicitud 2010/0221802; patente de Estados Unidos N.º de Solicitud 2011/0097773; patente de Estados Unidos N.º de Solicitud 2011/0312044; y la patente de Estados Unidos N.º Solicitud 2011/0312043.

Un ejemplo de fermentación extractiva se ilustra en la Figura 6. El caldo de fermentación 604 se puede recuperar a partir de la fermentación 600 en una base periódica o continua, y se añade el agente de extracción 602 al caldo de fermentación 604 para obtener una mezcla bifásica 605 obtenida por medio de contacto del caldo de fermentación con el agente de extracción 602. La mezcla bifásica se introduce en un recipiente 610, en el que se lleva a cabo la separación de las fases acuosa y orgánica para producir una fase 615 orgánica que contiene alcohol y una fase acuosa 612. El agente de extracción 602 puede ser un disolvente orgánico inmisible en agua o una mezcla de disolventes.

La extracción del producto de alcohol por parte del agente de extracción se puede realizar con o sin la retirada del microorganismo a partir del caldo de fermentación. El microorganismo se puede retirar del caldo de fermentación por medios conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a, filtración o centrifugación. En algunas realizaciones, el agente de extracción 602 se puede añadir al caldo de fermentación 604 en un recipiente por separado antes de la introducción en el recipiente 610. Alternativamente, el agente de extracción 602 se puede poner en contacto con el caldo de fermentación 604 tras la introducción en el recipiente 610 para obtener una mezcla bifásica 605 que se separa posteriormente en fases orgánica y acuosa. La fase 615 orgánica que contiene alcohol se puede separar de la fase acuosa 612 del caldo de fermentación bifásico usando métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a, sifonado, decantación, centrifugación, usando un decantador por gravedad, separación de fases con contribución de membranas y similares.

Como se ilustra en la Figura 6, el alcohol de producto se puede extraer del caldo de fermentación aguas abajo de la fermentación 600. Alternativamente, el método de fermentación extractiva de dos fases se puede llevar a cabo *in situ*, en un modo discontinuo o en un modo continuo en el fermentador. Para una fermentación extractiva *in situ*, el agente de extracción se puede poner en contacto con el caldo de fermentación al comienzo de la fermentación formando un caldo de fermentación bifásico. Alternativamente, el agente de extracción se puede poner en contacto con el caldo de fermentación una vez que el microorganismo ha logrado la cantidad deseada de proliferación, lo cual se puede determinar mediante medición de la densidad óptica del cultivo. Además, el agente de extracción puede entrar en contacto con el caldo de fermentación en un momento en el que al nivel de alcohol del caldo de fermentación alcanza un nivel preseleccionado, por ejemplo, antes de que la concentración de alcohol alcance un nivel tóxico. Tras el contacto del caldo de fermentación con el agente de extracción, el producto de alcohol se separa en el agente de extracción, disminuyendo la concentración en la fase acuosa que contiene el microorganismo, limitando de este modo la exposición del microorganismo de producción al alcohol de producto inhibitorio. El volumen de agente de extracción a usar depende de un número de factores, incluyendo el volumen del caldo de fermentación, el tamaño del fermentador, el coeficiente de partición del agente de extracción para el alcohol de producto, y el modo de fermentación escogido, como se describe a continuación.

En un modo continuo de la fermentación extractiva *in situ*, en una realización, el agente de extracción 602 se puede introducir en la fermentación 600 para obtener una mezcla bifásica 605 en el interior, abandonando directamente la

corriente 615 de fase orgánica que contiene alcohol y la corriente 612 de fase acuosa la fermentación 600. En otra realización, la mezcla del caldo de fermentación y el agente de extracción que contiene el alcohol se retiran de la fermentación 600, y después se separa la fase orgánica que contiene alcohol de la fase acuosa. El caldo de fermentación se puede reciclar hasta la fermentación 600 o se puede sustituir por caldo nuevo. A continuación, se trata el agente de extracción para recuperar el alcohol de producto, y se puede reciclar de nuevo el agente de extracción al interior de la fermentación 600 para la extracción posterior del alcohol de producto. Alternativamente, se puede añadir de forma continua el agente de extracción nuevo a la fermentación 600 para sustituir el agente de extracción retirado. En un modo discontinuo de la fermentación extractiva *in situ*, se añade un volumen de agente de extracción al fermentador para formar una mezcla de dos fases y no se retira el agente de extracción durante el proceso.

Tras la separación del caldo de fermentación del agente de extracción por medios descritos anteriormente, el caldo de fermentación se puede reciclar hasta la fermentación 600, se puede descartar, o se puede tratar para la retirada de cualquier alcohol de producto restante. Tras la separación del caldo de fermentación del agente de extracción, la fase acuosa 612 se separa en una corriente de alimentación 614 y una corriente de reciclaje 618. La corriente de reciclaje 618 devuelve una parte del caldo de fermentación a la fermentación 600. Similarmente, si se retira el microorganismo del caldo de fermentación antes del contacto con el agente de extracción, el microorganismo aislado también se puede recircular hasta la fermentación 600. La corriente de alimentación 614 se introduce en una columna de cerveza 620 para la recuperación del alcohol de producto.

Tras la extracción del alcohol de producto del caldo de fermentación, el alcohol de producto se recupera de la fase 615 orgánica que contiene el alcohol. La fase 615 orgánica que contiene el alcohol típicamente comprende el agente de extracción, agua, el alcohol de producto y opcionalmente un gas no condensable. La fase 615 orgánica que contiene alcohol puede opcionalmente comprender además sub-productos de fermentación que tienen solubilidad suficiente para separarse en la fase de extracción.

La recuperación del alcohol de producto a partir de la fase orgánica que contiene alcohol puede llevarse a cabo usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, destilación, adsorción por medio de resinas, separación por medio de tamices moleculares, preevaporación y similares. El sistema a modo de ejemplo de la Figura 6 incorpora una combinación de destilación y decantación para recuperar el alcohol de producto a partir de la fase 615 orgánica que contiene alcohol. La destilación para recuperar el alcohol de producto a partir de la fase 615 orgánica que contiene alcohol implica el uso de al menos dos columnas de destilación; una columna de disolvente 630 y una columna de alcohol 660 (por ejemplo, butanol). La columna de disolvente 630, en combinación con decantación, lleva a cabo la separación de cualquier gas no condensable, tal como dióxido de carbono, y un alcohol de producto a partir del agente de extracción y agua.

La fase 615 orgánica que contiene alcohol se destila en una columna de disolvente 630 para proporcionar una corriente 635 de cabecera vaporosa rica en alcohol de producto que comprende agua, alcohol de producto y un gas no condensable si está presente en la alimentación, y la corriente 632 de parte inferior líquida rica en disolvente que comprende el agente de extracción y agua y está sustancialmente libre del alcohol de producto. En algunas realizaciones, la corriente 632 de agente de extracción recuperado se puede reciclar al proceso de fermentación extractiva. Por ejemplo, la corriente 632 de agente de extracción recuperado se puede usar como agente de extracción 602 que se pone en contacto con el caldo de fermentación 604.

La corriente 635 de cabecera vaporosa puede incluir hasta aproximadamente 65% en peso de alcohol de producto y como mínimo aproximadamente 30% en peso de agua. En algunas realizaciones, la corriente de cabecera vaporosa incluye de aproximadamente 65% en peso de alcohol de producto y como mínimo aproximadamente 32% en peso de agua, de aproximadamente 60% en peso de alcohol de producto y como mínimo aproximadamente 35% en peso de agua en otra realización, de aproximadamente 55% en peso de alcohol de producto y como mínimo aproximadamente 40% en peso de agua en otra realización, y de aproximadamente 50% en peso a aproximadamente 55% en peso de alcohol de producto y de aproximadamente 45% en peso a aproximadamente 50% en peso de agua en otra realización. En algunas realizaciones, la cantidad de agente de extracción en la corriente 635 de cabecera vaporosa es menor de 2% en peso. En algunas realizaciones, la corriente 635 de cabecera vaporosa se puede enfriar y condensar en un condensador y se puede combinar en un mezclador 640 con las corrientes 625 y 662 de cabecera vaporosas condensadas procedentes de la columna de cerveza 620 y la columna 660, respectivamente. La corriente 645 se puede decantar en un decantador 650 en una fase líquida rica en alcohol y una fase acuosa líquida pobre en alcohol. Por ejemplo, la fase de alcohol líquida puede incluir menos de aproximadamente 30% en peso de agua, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30% en peso de agua, o de aproximadamente 16 a aproximadamente 30% en peso de agua, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20% en peso de agua, y puede además comprender menos de aproximadamente 0,001 por ciento en peso de agente de extracción residual que procede de la cabecera de la columna de disolvente 630. La fase acuosa líquida puede incluir menos de aproximadamente 10% en peso del alcohol de producto, o en algunas realizaciones, de aproximadamente 3 a aproximadamente 10% en peso del alcohol de producto. Todo o parte de la fase acuosa líquida procedente del decantador 650 se puede devolver a la columna de disolvente 630 en forma de corriente de reflujo 652. Una corriente 655 de fase líquida rica en alcohol procedente del decantador 650 se puede separar, con una parte que se devuelve a la columna de disolvente 630 como corriente de reflujo 654 y la parte restante 658 que se alimenta en la columna 660. La columna 660 lleva a cabo una separación del alcohol de producto y agua y

proporciona un corriente 665 de fracción inferior de alcohol de producto que es sustancialmente 100% en peso de alcohol de producto y está sustancialmente libre de agua. La corriente 662 de cabecera vaporosa comprende un alcohol de producto y agua, por ejemplo aproximadamente 67% en peso de alcohol de producto y aproximadamente 33% en peso de agua, por ejemplo 60% en peso de alcohol de producto y aproximadamente 40% en peso de agua, por ejemplo 55% en peso de alcohol producto y aproximadamente 45% en peso de agua. En algunas realizaciones, la corriente 662 de cabecera vaporosa puede condensarse en un condensador y devolverse a un decantador 650 por medio de mezclador 640.

Tras la separación del caldo de fermentación del agente de extracción, la corriente 614 de alimentación de la fase acuosa se introduce en la columna de cerveza 620 para proporcionar una corriente 625 de cabecera vaporosa rica en alcohol de producto que comprende agua, un alcohol de producto y un gas no condensable si está presente en la alimentación, y una corriente 622 líquida de fracción inferior de cerveza pobre en alcohol de producto. La corriente 622 de fracción inferior de cerveza comprende sub-productos tales como granos de destilador y residuos sólidos de destilación finos.

Dado que los sub-productos de fracción inferior de cerveza tienen valor como materia prima, resulta deseable procesar de forma adicional todo o parte de estos sub-productos para dar lugar a uno o más de DDG, WDG, Solubles Secos de Destilador (DDS), CDS, DDGS, aceite de maíz y/o COFA en lugar de descartar las fracciones inferiores de cerveza como residuo. En la realización de la Figura 6, la corriente 622 de fracciones inferiores de cerveza se procesa de forma adicional para producir DDGS 697. Para ello, la corriente 622 de fracción inferior de cerveza se introduce en un separador 670, que puede ser un separador mecánico tal como una centrífuga o una prensa filtrante, para separar los sólidos de granos 675 de las fracciones inferiores de cerveza de los residuos sólidos de destilación finos que principalmente incluyen agua. Una parte 672' de los residuos sólidos de destilación finos se puede reciclar a la alimentación introducida en la fermentación 600. El resto de los residuos 672 sólidos de destilación finos se puede concentrar para dar lugar a un jarabe 685 por medio de evaporación de una cantidad sustancial de agua a partir de los mismos en un sistema de evaporación 680. En algunas realizaciones, el sistema de evaporación 680 logra la evaporación del agua a partir del residuo 672 sólido de destilación fino, de manera que la concentración en peso de agua en el jarabe 685 sea de aproximadamente 40% a aproximadamente 65%. En algunas realizaciones, la concentración en peso de agua en el jarabe 685 es de aproximadamente 45% a aproximadamente 60%. En algunas realizaciones, la concentración en peso de agua en el residuo 672 sólido de destilación fino es de aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, y en algunas realizaciones, la concentración en peso de agua en el residuo 672 sólido de destilación fino es de aproximadamente 90%. El jarabe 685 se puede combinar después con sólidos de grano 675 en un mezclador 690, y la corriente combinada 692 de granos y jarabe se puede secar después en un secador 695 para producir DDGS 697.

La Figura 7 ilustra otra realización de los sistemas y procesos de la invención. La materia prima se puede licuar para generar un macerado licuado (o suspensión de materia prima) que comprende sólidos no disueltos y azúcares fermentables. El macerado licuado puede introducir los sólidos en la separación 710 para formar la torta filtrante 715 que comprende los sólidos no disueltos y una disolución 712 clarificada de azúcares fermentables disueltos (por ejemplo, macerado fino). Los sólidos no disueltos se pueden separar del macerado licuado (o suspensión de materia prima) gracias a un número de medios que incluyen, pero sin limitarse a, centrifugación en recipiente de decantador, centrifugación en tricantador, centrifugación por pila de discos, centrifugación por filtración, centrifugación por decantador, filtración, filtración a vacío, filtro de bandas, filtración a presión, filtración usando un tamiz, separación por tamices, rejilla, rejilla porosa, flotación, hidrociclón, prensa filtrante, prensa de tornillo, decantador por gravedad, separación vorticial o sus combinaciones. La torta filtrante 715 se puede llevar a cabo para el lavado de sólidos 730 con el fin de recuperar los azúcares fermentables a partir de la torta filtrante 715. Se forma la torta 735 húmeda lavada y se puede conducir a un secador 780 para producir DDGS.

El macerado fino 712, los microorganismos y el agente de extracción se pueden añadir a la fermentación 700 donde se fermenta el macerado por medio del microorganismo para producir una corriente bifásica 705. La corriente bifásica 705 se puede conducir a una columna 720 de agente de extracción para producir una corriente vaporosa 722 y una corriente 725 de fracción inferior. La corriente vaporosa 722 se puede enviar a una recuperación de alcohol 790 para recuperar el alcohol de producto. La corriente 725 de fracción inferior se puede conducir a una separación 760 de agente de extracción para separar la corriente en un residuo 765 sólido de destilación fino y un agente de extracción. En algunas realizaciones, el agente de extracción recuperado se puede re circular hasta la fermentación 700. El residuo 308 sólido de destilación fino, con la mayoría de los sólidos retirados antes de la fermentación, se puede concentrar por medio de un sistema de evaporación 770 para formar un jarabe 775. El jarabe 775 se puede combinar con una torta húmeda 735 en un secador 780 para producir DDGS.

La Figura 8 ilustra una modificación del proceso mostrado en la Figura 7 en el que el agente de extracción es un ácido graso procedente de un aceite (por ejemplo, aceite de maíz). Se puede proporcionar un catalizador de esterificación para favorecer la reacción química entre el ácido graso y un alcohol de producto (por ejemplo, butanol) para formar un éster de ácido graso. Se puede añadir una enzima (por ejemplo, lipasa) con el microorganismo, el macerado fino 812, y el agente de extracción en la fermentación 800, de forma que se pueda secuestrar químicamente una parte del alcohol de producto producido durante la fermentación en forma de éster de ácido graso (por ejemplo, éster butílico de ácido graso). La descarga de fermentación 805 puede contener cierto alcohol de producto que se puede recuperar en la columna de cerveza 820. La corriente 825 de fracción inferior bifásica puede

contener el producto de éster y éste se puede separar en la separación 840 del agente de extracción para formar una corriente 842 de éster de ácido graso y residuo 845 sólido de destilación fino. En algunas realizaciones, el residuo 845 sólido de destilación fino puede comprender el éster y cuando se evapora en el sistema de evaporación 850, el éster se puede recuperar como corriente 852. El éster de ácido graso combinado presente en las corrientes 842 y 852 puede tratarse químicamente en el hidrolizado 860 para convertir el éster graso en ácido graso y un alcohol de producto. La corriente bifásica 865 procedente del hidrolizado 860 se puede conducir a la columna 870 del agente de extracción para recuperar el alcohol de producto. La fracción inferior de la columna 870 de agente de extracción comprende ácido graso que puede reciclarse a la fermentación 800.

Los agentes de extracción que se pueden utilizar para los procesos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, disolventes orgánicos. En algunas realizaciones, los agentes de extracción pueden ser disolventes orgánicos miscibles en agua. Por ejemplo, se pueden usar los agentes de extracción tales como alcoholes grasos C_7 a C_{22} , ácidos grasos C_7 a C_{22} , ésteres de ácidos grasos C_7 a C_{22} , amidas grasas C_7 a C_{22} y sus mezclas en el proceso descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, los agentes de extracción pueden escogerse entre alcoholes grasos C_{12} a C_{22} , ácidos grasos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos grasos C_{12} a C_{22} , aldehídos grasos C_{12} a C_{22} , amidas grasas C_{12} a C_{22} y sus mezclas. En algunas realizaciones, los agentes de extracción pueden incluir un primer agente de extracción escogido entre alcoholes grasos C_{12} a C_{22} , ácidos grasos C_{12} a C_{22} , ésteres de ácidos grasos C_{12} a C_{22} , aldehídos grasos C_{12} a C_{22} , amidas grasas C_{12} a C_{22} , y sus mezclas; y un segundo agente de extracción escogido entre alcoholes grasos C_7 a C_{11} , ácidos grasos C_7 a C_{11} , ésteres de ácidos grasos C_7 a C_{11} , aldehídos grasos C_7 a C_{11} y sus mezclas. En algunas realizaciones, los agentes de extracción pueden ser ácidos carboxílicos. Los ejemplos adicionales de agentes de extracción incluyen alcohol oleílico, alcohol behenílico, alcohol cetílico, alcohol laurílico, alcohol miristílico, alcohol estearílico, ácido oleico, ácido laúrico, ácido mirístico, ácido esteárico, miristato de metilo, oleato de metilo, aldehído laurico, 1-nonanol, 1-decanol, 1-undecanol, 2-undecanol, 1-nonanal y sus mezclas.

Los métodos de producción y recuperación de alcohol de producto a partir de un caldo de fermentación que usan fermentación extractiva se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2009/0305370; la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2010/0221802; la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2011/0097773; la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2011/0312044; y la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2011/0312043; la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2010/0143992; la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2010/0143993; la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2010/0143994; la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2010/0143995; cuyos contenidos completos se incorporan por referencia en la presente memoria.

Usando fermentación extractiva como se describe en la presente memoria, el agente de extracción (por ejemplo, ácidos grasos, COFA, ésteres de ácido graso) o aceite pueden estar presentes en los co-productos de destilador. En algunas realizaciones, el agente de extracción y/aceite pueden retirarse de los co-productos de destilador. Por ejemplo, el agente de extracción y/o aceite se pueden retirar de los co-productos de destilador usando medios mecánicos tales como prensa de tornillo o centrífuga o medios químicos tales como extracción con hexano o un alcohol (por ejemplo, butanol), tratamiento con agua oxigenada, intercambio iónico o destilación. La retirada del agente de extracción y/aceite puede mejorar la calidad de los co-productos de destilador reduciendo el contenido de grasa y aumentando el contenido de proteínas de los co-productos de destilador.

Las diversas corrientes generadas durante los procesos y sistemas descritos en la presente memoria se pueden procesar de forma adicional para generar co-productos tales como DDGS o ésteres de ácido graso. Los co-productos se pueden formar por medio de recuperación de los sub-productos a partir de una corriente o mediante combinación y mezcla de diversas corrientes. Por ejemplo, los ésteres de ácido graso se pueden recuperar por medio del uso de un disolvente para extraer los ésteres de la corriente de residuo sólido de destilación fino o la torta húmeda. Un sistema de extracción basado en disolvente se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2010/0092603, cuyas consideraciones se incorporan por referencia en la presente memoria.

En algunas realizaciones de extracción con disolvente de ésteres de ácido graso, se pueden separar los sólidos del residuo sólido de destilación fino ("sólidos separados") ya que la corriente contendría la parte más grande, con mucho, de ésteres de ácido graso en las corrientes de sub-producto no combinadas. Estos sólidos separados se pueden alimentar en un extracción y se pueden lavar con un disolvente. En algunas realizaciones, los sólidos separados se devuelven al menos una vez, con el fin de garantizar que todos los lados de los sólidos separados se lavan con el disolvente. Tras el lavado, la mezcla resultante de lípido y disolvente, conocida como micela, se recoge para la separación del lípido extraído del disolvente. Por ejemplo, la mezcla resultante de lípido y disolvente se puede depositar en un separador para el procesado posterior. Durante el proceso de extracción, a medida que el disolvente se lava sobre los sólidos separados, el disolvente no solo introduce el lípido en la disolución, sino que recoge las partículas sólidas y finas. Estos "finos" generalmente son impurezas no deseables en la micela y en algunas realizaciones, la micela se puede descargar del extractor o separador a través de un dispositivo que separa las partículas o limpia los finos de la micela.

Con el fin de separar el lípido y el disolvente presente en la micela, la micela se puede someter a una etapa de destilación. En esta etapa, la micela puede, por ejemplo, procesarse a través de un evaporador que calienta la micela a una temperatura que es suficientemente elevada para provocar la vaporización del disolvente, pero no suficientemente elevada para afectar negativamente o vaporizar el líquido sometido a extracción. A medida que se

evapora el disolvente, se puede recoger, por ejemplo, en un condensador, y se puede reciclar para su uso futuro. La separación del disolvente de la micela tiene como resultado una reserva de lípido bruto que se puede procesar de forma adicional para separar agua, ésteres de ácido graso (por ejemplo, ésteres isobutílicos de ácido graso), ácidos grasos y triglicéridos.

5 Tras la extracción de los lípidos, los sólidos se pueden transportar fuera del extractor y se pueden someter a un proceso de separación que retira el disolvente residual. La recuperación del disolvente residual es importante para la rentabilidad del proceso. En algunas realizaciones, los sólidos húmedos se pueden transportar en un entorno hermético de vapor para conservar y recoger el disolvente que se evapora de forma transitoria desde los sólidos húmedos y que se transporta al interior del aparato de eliminación de disolvente. A medida que los sólidos penetran
10 en el aparato de eliminación de disolvente, se pueden calentar para distribuir los sólidos sobre una o más bandejas, y los sólidos se pueden calentar directamente, a través de contacto directo con el aire o la corriente caliente, o indirectamente, tal como por medio de calentamiento de la bandeja que transporta los sólidos. Con el fin de facilitar la transferencia de los sólidos de una bandeja a otra, las bandejas que transportan los sólidos pueden incluir aberturas que permiten que los sólidos pasen de una bandeja a otra. A partir del aparato de eliminación de
15 disolvente, los sólidos se pueden transportar, opcionalmente, hasta un mezclador en el que se mezclan con otros sub-productos antes del transporte al interior del secador. En este ejemplo, los sólidos se alimentan a un aparato de eliminación de disolvente en el que los sólidos se ponen en contacto por medio de una corriente. En algunas realizaciones, los flujos de vapor y sólidos en el aparato de eliminación de disolvente pueden estar en contracorriente. Los sólidos pueden abandonar posteriormente el aparato de eliminación de disolvente y se pueden
20 alimentar en un secador y opcionalmente un mezclador en el que se pueden mezclar los diversos sub-productos. El vapor que abandona el aparato de eliminación de disolvente se puede condensar y opcionalmente se puede mezclar con la micela y posteriormente se puede alimentar en un decantador. La fase rica en agua que abandona el decantador se puede alimentar en una columna de destilación en la cual se retira el hexano de la corriente rica en agua. En algunas realizaciones, el agua desprovista de hexano abandona la parte inferior de la columna de
25 destilación y se puede reciclar de nuevo en el proceso de fermentación, por ejemplo, se puede usar para suspender los sólidos de maíz molidos. En algunas realizaciones, los productos de cabecera y de fracción inferior se pueden reciclar hasta el proceso de fermentación. Por ejemplo, las fracciones inferiores ricas en líquidos se pueden añadir a la alimentación de un hidrolizador. Las fracciones de cabecera pueden, por ejemplo, condensarse y alimentarse en un decantador. La corriente rica en hexano que abandona este decantador se puede usar opcionalmente como parte
30 del disolvente alimentado al extractor. La fase rica en agua que abandona el presente decantador se puede alimentar en la columna que separa el hexano del agua. Como puede apreciar un experto en la técnica, los métodos de la presente invención se pueden modificar en una diversidad de formas para optimizar el proceso de fermentación para la producción de un alcohol tal como butanol.

En algunas realizaciones, los co-productos pueden proceder del macerado usado en el proceso de fermentación.
35 Por ejemplo, si se utiliza maíz como materia prima, se puede separar el aceite de maíz del macerado y este aceite de maíz contiene triglicéridos, ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos y antioxidantes tales como tocoferoles. En algunas realizaciones, el aceite de maíz se puede usar como componente de pienso destinado a animales ya que, debido a su elevado contenido de triglicéridos, es una fuente de energía metabolizable. Además, los antioxidantes naturales del aceite de maíz proporcionan una fuente de vitamina E así como reducen el desarrollo
40 del carácter rancio.

El aceite de maíz puede opcionalmente añadirse a otros co-productos en tasas diferentes y de este modo, por ejemplo, crear la capacidad de variar la cantidad de triglicérido en el co-producto resultante. De esta forma, el contenido de grasa del co-producto resultante se podría controlar, por ejemplo, para dar lugar a un pienso destinado
45 a animales de alto contenido en proteínas y bajo contenido en grasas que se adaptaría mejor a las necesidades del ganado producto de leche en comparación con un producto de alto contenido en grasas.

En algunas realizaciones, el aceite de maíz bruto separado del macerado se puede procesar para dar lugar a un aceite comestible para la industria alimentaria o para su uso directo por parte de los consumidores. Por ejemplo, el aceite de maíz bruto puede procesarse de forma adicional para producir aceite de maíz refinado por medio de
50 eliminación de goma para retirar fosfatidas, refinado de álcali para neutralizar los ácidos grasos libres, decoloración para la retirada de cuerpos de color y elementos de traza, frigelización para la retirada de ceras y decoloración (véase, por ejemplo, Corn Oil 5ª edición, Corn Refiners Association, Washington, D.C. 2006). El aceite de maíz refinado se puede usar, por ejemplo, por parte de los fabricantes de alimentos para la generación de productos alimentarios. Los ácidos grasos libres retirados por medio de refinado con álcali se pueden usar como materia prima de jabón y ceras recuperados a partir de la etapa de frigelización y se pueden utilizar en piensos destinados a
55 animales.

En algunas realizaciones, los aceites de plantas tales como aceite de maíz se pueden usar como materias primas para la generación del agente de extracción para la fermentación extractiva. Por ejemplo, el aceite procedente de biomasa se puede convertir en un agente de extracción disponible para la retirada de un alcohol de producto tal como butanol de un caldo de fermentación. Los glicéridos del aceite de pueden convertir químicamente o
60 enzimáticamente en un producto de reacción, tal como ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, ésteres alquílicos de ácido graso, ésteres de glicol de ácido graso y triglicéridos hidroxilados, o sus mezclas, que pueden usar un agente de extracción de producto de fermentación. Mediante la utilización de aceite de maíz como ejemplo,

se pueden hacer reaccionar los triglicéridos de aceite de maíz con una base tal como hidróxido de amoníaco o hidróxido de sodio para obtener amidas grasas, ácidos grasos y glicerol. Estas amidas grasas, ácidos grasos o sus mezclas se pueden usar como agente de extracción. En algunas realizaciones, el aceite de planta tal como aceite de maíz se puede hidrolizar por medio de una enzima tal como una lipasa para formar ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos de aceite de maíz). Los métodos de obtención de los agentes de extracción a partir de la biomasa se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2011/0312044 y la Solicitud de Patente Internacional PCT N.º WO 2011/159998, que se incorporan por referencia en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el aceite de maíz se puede utilizar también en las fabricación de resinas, plásticos, polímeros y lubricantes y también se puede usar en la industria farmacéutica como componente de formulaciones para fármacos. El aceite de maíz también se puede usar en la fabricación de productos tales como tintas para pinturas, pintura y barniz, jabón y materiales textiles.

En algunas realizaciones, el aceite de maíz también se puede usar como materia prima para biodiesel y diesel renovable. En algunas realizaciones, los aceites de plantas o una combinación de aceites de plantas también se puede usar como materia prima para biodiesel o diesel renovable. Los aceites de plantas incluyen, por ejemplo, aceite de colza, ricino, maíz, yoyoba, karanja, mahua, linaza, soja, palma, cacahuete, colza, arroz, cártamo y girasol. El biodiesel puede proceder de cualquier transesterificación o esterificación de aceites de plantas con alcoholes tales como metanol, etanol y butanol. Por ejemplo, el biodiesel puede producirse por medio de esterificación o transesterificación catalizada por ácido, catalizada por álcali o catalizada por una enzima (por ejemplo, transesterificación de triglicéridos procedentes de aceite de plantas o esterificación de ácidos grasos libres procedentes de aceites de plantas). Se pueden usar ácidos inorgánicos tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido fosfórico, ácidos orgánicos tales como ácido toluensulfónico y ácido naftalensulfónico, o ácidos sólidos tales como resinas de poliestireno sulfonadas Amberlyst®, o zeolitas, como catalizador para la transesterificación catalizada por ácido o la esterificación. Se pueden usar bases tales como hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, metóxido de sodio o hidróxido de calcio, como catalizador para la esterificación o transesterificación catalizada por álcali. En algunas realizaciones, el biodiesel se puede producir por medio de un proceso integrado, por ejemplo, una esterificación catalizada por ácido de ácidos grasos libres seguido de transesterificación catalizada por base de triglicéridos.

Las enzimas tales como lipasas o estererasas se pueden usar para catalizar las reacciones de transesterificación o esterificación. Las lipasas pueden proceder de bacterias u hongos, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Thermomyces*, *Burkholderia*, *Candida* y *Rhizomucor*. En algunas realizaciones, las lipasas pueden proceder de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miehei*, *Burkholderia cepacia*, *Thermomyces lanuginosa* o *Candida antarctica*. En algunas realizaciones, la enzima se puede inmovilizar sobre un soporte soluble o insoluble. La inmovilización de las enzimas se puede llevar a cabo usando una diversidad de técnicas que incluyen 1) unión de la enzima a un soporte portador poroso o no poroso, por medio de soporte covalente, adsorción física, unión electrostática o unión por afinidad; 2) reticulación con reactivos bifuncionales o multifuncionales; 3) atrapamiento en matrices de gel, polímeros, emulsiones, o cierta forma de membrana; y 4) una combinación de cualquiera de estos métodos. En algunas realizaciones, la lipasa se puede inmovilizar, por ejemplo, sobre resina acrílica, sílice o perlas (por ejemplo, perlas de polimetacrilato). En algunas realizaciones, las lipasas pueden ser solubles.

Las configuraciones de reactor para la producción de biodiesel incluyen, por ejemplo, reactores de tanque agitados discontinuos, reactores de tanque agitados continuos, reactores de lecho empacado, reactores de lecho fluido, reactores de lecho expandido y reactores de membrana de recirculación.

En algunas realizaciones, el biodiesel producido en la presente memoria puede comprender uno o más de los siguientes ésteres alquílicos de ácido graso (FAAE): ésteres metílicos de ácido graso (FAME), ésteres metílicos de ácido graso (FAEE) y ésteres butílicos de ácido graso (FABE). En algunas realizaciones, el biodiesel descrito en la presente memoria puede comprender uno o más de los siguientes: miristato, palmitato, estearato, oleato, linoleato, linolenato, araquidato y behenato.

En algunas realizaciones, el sub-producto de agente de extracción se puede usar, todo o en parte, como componente de un sub-producto de pienso para animales o se puede usar como materia prima para biodiesel o diesel renovable. En algunas realizaciones, el aceite procedente del proceso de fermentación se puede recuperar por medio de evaporación. Esta composición no acuosa puede comprender ésteres de ácido graso (por ejemplo, ésteres isobutílicos de ácido graso) y ácidos graso y esta composición (o corriente) se puede alimentar a un hidrolizador para recuperar isobutanol y ácidos grasos. En una realización adicional, esta corriente se puede usar como materia prima para la producción de biodiesel.

En algunas realizaciones, el biodiesel descrito en la presente memoria cumple las especificaciones de la American Society for Testing and Materials (ASTM) D6751. En algunas realizaciones, el biodiesel descrito en la presente memoria cumple las especificaciones de la Norma Europea EN 14214.

En algunas realizaciones, una composición puede comprender al menos 2% de biodiesel, al menos 5% de biodiesel, al menos 10% de biodiesel, al menos 20% de biodiesel, al menos 30% de biodiesel, al menos 40% de biodiesel, al menos 50% de biodiesel, al menos 60% de biodiesel, al menos 70% de biodiesel, al menos 80% de biodiesel, al

menos 90% de biodiesel o 100% de biodiesel.

En algunas realizaciones, el biodiesel descrito en la presente memoria se puede mezclar con un combustible diesel basado en petróleo para formar una mezcla de biodiesel. En algunas realizaciones, la mezcla de biodiesel puede comprender al menos 2% en volumen de biodiesel, al menos 3% en volumen de biodiesel, al menos 4% en volumen de biodiesel, al menos 5% en volumen de biodiesel, al menos 6% en volumen de biodiesel, al menos 7% en volumen de biodiesel, al menos 8% en volumen de biodiesel, al menos 9% en volumen de biodiesel, al menos 10% en volumen de biodiesel, al menos 11% en volumen de biodiesel, al menos 12% en volumen de biodiesel, al menos 13% en volumen de biodiesel, al menos 14% en volumen de biodiesel, al menos 15% en volumen de biodiesel, al menos 16% en volumen de biodiesel, al menos 17% en volumen de biodiesel, al menos 18% en volumen de biodiesel, al menos 19% en volumen de biodiesel o al menos 20% en volumen de biodiesel. En algunas realizaciones, la mezcla de biodiesel puede comprender hasta aproximadamente un 20% en volumen de biodiesel.

Un sub-producto de la producción de biodiesel es glicerol. Además, glicerol también es un sub-producto de la generación de un agente de extracción procedente de aceites de plantas y el proceso de fermentación. Se puede producir una materia prima para biodiesel haciendo reaccionar una corriente que contiene COFA con glicerol. La reacción puede catalizarse por medio de ácidos inorgánicos fuertes tales como ácido sulfúrico o por medio de catalizadores de ácido sólidos tales como catalizadores poliméricos Amberlyst® y resinas de intercambio iónico. Se pueden obtener conversiones elevadas por medio de extracción de agua a partir de la masa de reacción. El producto de reacción contiene mono-, di- y triglicéridos en una proporción determinada por la relación de los reactantes y el alcance de la reacción. La mezcla de glicéridos se puede usar en lugar de la alimentación de triglicéridos normalmente usada para preparar el biodiesel. En algunas realizaciones, los triglicéridos se pueden usar como tensoactivo o como materia prima para el biodiesel.

En algunas realizaciones, los sólidos se pueden separar del macerado y pueden comprender triglicéridos y ácidos grasos libres. Estos sólidos (o corriente) se pueden usar como pienso para animales, ya sea recuperados de la descarga de la centrifugación o tras el secado. Los sólidos (o torta húmeda) se adaptan particularmente como pienso para rumiantes (por ejemplo, ganado productor de leche) debido a su elevado contenido en lisina disponible y proteína auxiliar no degradable de rumen. Por ejemplo, estos sólidos pueden ser de particular valor en un pienso para animales de bajo contenido en grasas y elevado contenido en proteínas. En algunas realizaciones, estos sólidos se pueden usar como base, es decir, se pueden añadir otros sub-productos tales como jarabe a los sólidos para formar un producto que se pueda usar como pienso para animales. En algunas realizaciones, se pueden añadir cantidades diferentes de otros sub-productos a los sólidos para ajustar las propiedades del producto resultante con el fin de satisfacer las necesidades de una determina especies de animal.

La composición de sólidos separada del residuo sólido de destilación completo puede incluir, por ejemplo, proteína bruta, ácido graso y ésteres de ácido graso. En algunas realizaciones, esta composición (o sub-producto) se puede usar, húmeda o seca, como pienso para animales en el que, por ejemplo, se desea un elevado contenido de proteínas (por ejemplo, elevado contenido de lisina), bajo contenido en grasa y elevado contenido en fibra. En algunas realizaciones, se pueden añadir grasas a esta composición, por ejemplo, a partir de otra corriente de sub-producto si se desea un pienso para animales de bajo contenido en fibra y elevado contenido en grasa. En algunas realizaciones, este pienso para animales de bajo contenido en fibra y elevado contenido en grasa se puede usar para porcino o aves de corral. En una realización adicional, la composición no acuosa de CDS puede incluir, por ejemplo, proteína, ácidos grasos y ésteres de ácido graso (por ejemplo, ésteres isobutílicos de ácido graso) así como también otros sólidos suspendidos y disueltos tales como sales e hidratos de carbono. Esta composición de CDS se puede usar, por ejemplo, como pienso para animales, ya sea húmeda o seca, en la que se desea un componente de pienso proteico, de bajo contenido en grasa y elevado contenido en sales minerales. En algunas realizaciones, la composición se puede usar como componente de un pienso para animales productores de leche. En algunas realizaciones, WDG puede comprender proteína, fibra, grasa y hasta aproximadamente 70% de humedad. En algunas realizaciones, DDGS puede comprender aproximadamente 10-12% de humedad.

Las diversas corrientes generadas por medio de la producción de un alcohol (por ejemplo, butanol) por medio de un proceso de fermentación pueden combinarse de muchas formas para generar un número de co-productos. Por ejemplo, si se usa maíz bruto procedente de maceración para generar ácidos grasos para su uso como agente de extracción y se extrae el lípido por medio de evaporadores para otros fines, entonces las corrientes restantes se pueden combinar y procesar para crear un co-producto que comprende proteína bruta, grasas brutas, triglicéridos, ácidos grasos y ésteres de ácido graso tales como ésteres isobutílicos de ácido graso (co-productos de destilador).

En algunas realizaciones de la invención, el contenido de proteína bruta de los co-productos de destilador (por ejemplo, co-productos de destilador para pienso destinado a animales) puede ser al menos 20% (porcentaje en peso de los co-productos de destilador), al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95%. En algunas realizaciones, el contenido de proteína bruta es cualquier intervalo de valores divulgado en la presente memoria, por ejemplo de aproximadamente 20% a aproximadamente 95%, de

aproximadamente 25% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, de de aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 45%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 45%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 45%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 40%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 35%, de aproximadamente 25% a aproximadamente 35% o de aproximadamente 30% a aproximadamente 35%.

En algunas realizaciones de la invención, el contenido de grasas brutas de los co-productos de destilador (por ejemplo, co-productos de destilador para pienso destinado a animales) puede ser menor de aproximadamente 10% (porcentaje en peso de co-productos de destilador), menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1%. En algunas realizaciones, el contenido de grasa bruta es cualquier intervalo de valores divulgados en la presente memoria, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%.

En algunas realizaciones de la invención, el contenido de ácido graso de los co-productos de destilador puede ser menor de aproximadamente 10% (el porcentaje en peso de los co-productos de destilador), menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1%. En algunas realizaciones, el contenido de ácido graso es cualquier intervalo de valores divulgados en la presente memoria, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%.

En algunas realizaciones de la invención, el contenido de triglicéridos de los co-productos de destilador puede ser menor de aproximadamente 10%, menor de aproximadamente 9%, menor de aproximadamente 8%, menor de aproximadamente 7%, menor de aproximadamente 6%, menor de aproximadamente 5%, menor de aproximadamente 4%, menor de aproximadamente 3%, menor de aproximadamente 2%, o menor de aproximadamente 1%. En algunas realizaciones, el contenido de triglicérido es cualquier intervalo divulgado en la presente memoria, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% o de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%.

En algunas realizaciones de la invención, el contenido de lisina de los co-productos de destilador puede ser menor de aproximadamente 10% (porcentaje en peso de los co-productos de destilador), menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1%. En algunas realizaciones, el contenido de lisina es cualquier intervalo de valores divulgados en la presente memoria, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% o de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%.

En algunas realizaciones de la invención, el contenido de éster de ácido graso de los co-productos de destilador puede ser menor de aproximadamente 10% (porcentaje en peso de los co-productos de destilador), menor de aproximadamente 9%, menor de aproximadamente 8%, menor de aproximadamente 7%, menor de aproximadamente 6%, menor de aproximadamente 5%, menor de aproximadamente 4%, menor de aproximadamente 3%, menor de aproximadamente 2% o menor de aproximadamente 1%. En algunas realizaciones,

el contenido de éster de ácido graso (por ejemplo, éster isobutílico de ácido graso) es cualquier intervalo de valores divulgados en la presente memoria, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%, de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% o de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%.

En algunas realizaciones, los co-productos de destilador (por ejemplo, los co-productos de destilador para piensos destinados a animales) comprende al menos de aproximadamente 20% a aproximadamente 35% de proteína bruta (porcentaje en peso de los co-productos de destilador), de al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 20% de grasas brutas, al menos de aproximadamente 0% a aproximadamente 5% de triglicéridos, de al menos aproximadamente 4% a aproximadamente 10% de ácido graso, y de al menos aproximadamente 2% a aproximadamente 6% de éster de ácido graso (por ejemplo, éster isobutílico de ácido graso). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador comprenden de aproximadamente 25% de proteína bruta, aproximadamente 10% de grasas brutas, aproximadamente 0,5% de triglicéridos, aproximadamente 6% de ácido graso, y aproximadamente 4% de éster isobutílico de ácido graso.

En algunas realizaciones, los co-productos de destilador (por ejemplo, co-productos de destilador para pienso destinado a animales) pueden comprender uno o más de los siguientes: proteína, grasa, fibra, vitaminas y minerales. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador puede complementarse con amino ácidos, vitaminas y minerales. Por ejemplo, los co-productos de destilador pueden complementarse con amino ácidos tales como histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina, así como también otros amino ácidos tales como alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, hidroxilisina, hidroxiprolina, lantionina, ornitina, prolina, serina y tirosina. Los co-productos de destilador pueden complementarse con minerales tales como calcio, cloruro, cobalto, cobre, fluoruro, yodo, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, selenio, sodio, azufre y cinc. Los co-productos de destilador pueden complementarse con vitaminas tales como vitaminas A, C, D, E, K y B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, biotina, vitamina B6, vitamina B12 y folato). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador pueden comprender triglicéridos, ácidos grasos, ésteres de ácido graso y glicerol

En algunas realizaciones, se puede medir la humedad, el contenido de proteína, grasa, fibra y ceniza de los co-productos de destilador (véase, por ejemplo, www.aoac.org, www.foragetesting.org, www.aocs.org). En algunas realizaciones, el contenido de humedad de los co-productos de destilador se puede medir usando métodos analíticos tales como Association of Analytical Communities (AOAC) 934.01, AOAC 935.29, AOAC 930.15, AOAC 2001.12 y National Forgaing Testing Association (NFTA) 2.2.2.5. En algunas realizaciones, el contenido de proteínas de los co-productos de destilador se puede medir usando métodos analíticos tales como AOAC 990.03 y AOAC 2001.11. En algunas realizaciones, el contenido de grasa de los co-productos de destilador se puede medir usando métodos analíticos tales como AOAC 2003.5, AOAC 2003.06, AOAC 920.39, AOAC 954.02 y AOAC 945.16. En algunas realizaciones, el contenido de fibra de los co-productos de destilador se puede medir usando métodos analíticos tales como AOAC 978.10, AOAC 962.09 y American Oil Chemists' Society (AOCS) Ba 6a-05. En algunas realizaciones, el contenido de ceniza de los co-productos de destilador se puede medir usando métodos analíticos tales como AOAC 942.05.

Algunas realizaciones de la presente invención van destinadas a métodos de producción de un componente de pienso destinado a animales de elevado valor a partir de un proceso de producción de etanol o butanol, que comprende proporcionar a un proceso de producción de etanol o butanol al menos una corriente de alimentación del proceso para optimizar el contenido de grasas brutas y proteínas brutas para el mercado de piensos destinados a animales. En algunas realizaciones, se combinan al menos dos corrientes de alimentación de proceso para optimizar el contenido de proteína bruta y el contenido de grasas brutas para un pienso destinado a animales o un mercado de piensos destinados a animales. En algunas realizaciones, se combinan al menos tres corrientes de alimentación de proceso para optimizar el contenido de proteína bruta y grasas brutas para un pienso destinado a animales o el mercado de piensos destinados a animales.

En algunas realizaciones, se han optimizado los co-productos de destilador para una composición de pienso destinado a animales o método de producción de co-productos de destilador para un pienso destinado a animales hasta el tipo de corriente de alimentación disponible. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para un pienso destinado a animales para el mercado de pienso destinado a vacuno comprende corrientes de alimentación de proceso en húmedo, por ejemplo, WDGS o WDG.

En algunas realizaciones, un mercado de pienso destinado a animales relativo a métodos y composiciones de la presente invención es un mercado de piensos destinado a ganado, mercado de piensos destinado a rumiantes, mercado de piensos destinado a vacuno, mercado de piensos destinado a animales productores de leche, mercado de piensos destinado a porcino, mercado de piensos destinado a caprino, mercado de piensos destinado a ovino, mercado de piensos destinado a aves de corral, mercado de piensos destinado a equino, mercado de piensos destinado a acuicultura, mercado de piensos destinado a mascotas domésticas o cualquier de sus combinaciones. En algunas realizaciones, un pienso destinado a animales referido a métodos y composiciones de la presente

invención es un pienso destinado a ganado, pienso destinado a rumiantes, pienso destinado a vacuno, pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso destinado a vacas lecheras), pienso destinado a porcino, pienso destinado a caprino, pienso destinado a ovino, pienso destinado a aves de corral, pienso destinado a equino, pienso destinado a acuicultura, pienso destinado a mascotas domésticas o cualquier de sus combinaciones.

5 En algunas realizaciones, los co-productos de destilador comprenden el contenido de proteína y grasa descrito en la Tabla 6 (por ejemplo, DCP1, DCP2 o DCP3) o un contenido de proteína y grasa sustancialmente similar descrito en la Tabla 6. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador comprenden un contenido de lípidos, proteínas y
 10 grasa descrito en la Tabla 6 (por ejemplo, DCP1, DCP2 o DCP3) o un contenido de proteína y grasa sustancialmente similar descrito en la Tabla 6. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador comprenden un contenido de lisina, lípidos, proteínas y grasas descrito en la Tabla 6 (por ejemplo, DCP1, DCP2 o DCP3) o un
 contenido de grasa y proteína sustancialmente similar descrito en la Tabla 6.

En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden el contenido de proteínas y grasas de DCP1 de la Tabla 6, o un contenido de proteínas y grasas sustancialmente similar de DCP1 de la Tabla 6, tienen un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno, pienso destinado a animales de producción de leche (por
 15 ejemplo, pienso para vacas lecheras), o pienso para porcino, o un mercado de pienso destinado a vacuno, mercado para pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, mercado de pienso destinado a animales productores de leche) o mercado de pienso destinado a porcino. En algunas realizaciones, los co-productos de
 destilador que comprenden un contenido de lípidos, proteínas y grasas de DCP1 de la Tabla 6, o un contenido de lípidos, proteínas y grasas sustancialmente similar de DCP1 de la Tabla 6, tienen un perfil de nutrientes para pienso
 20 destinado a vacuno, pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso destinado a vacas lecheras) o pienso destinado a porcino, o un mercado de pienso destinado a vacuno, mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, mercado de pienso destinado a animales productores de leche) o un
 mercado de pienso destinado a porcino. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden el contenido de lisina, lípidos, proteínas y grasas de DCP1 de la Tabla 6, o un contenido similar de lisina, lípidos,
 25 proteínas y grasas de DCP1 de la Tabla 6, tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno, pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso destinado a vacas lecheras) o pienso destinado a porcino, o un mercado de pienso destinado a vacuno, mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, mercado de pienso destinado a animales productores de leche) o un mercado de pienso destinado a porcino.

En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden un contenido de grasas y proteínas de DCP2 de la Tabla 6, o un contenido sustancialmente similar de proteínas y grasas de DCP2 de la Tabla 6, tienen un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno o pienso destinado a animales productores de leche (por
 30 ejemplo, pienso para vacas lecheras) o un mercado de pienso destinado a vacuno o mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, mercado de pienso para animales productores de leche). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden el contenido de lípidos, proteínas y grasas de DCP2 de la Tabla 6, o un contenido sustancialmente similar de lípidos, proteínas y grasas de DCP2 de la Tabla 6, tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno o pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso para vacas lecheras) o un mercado de pienso destinado a vacuno o mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, un mercado de pienso destinado a animales productores de leche). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden el contenido de lisina, lípidos, proteínas y grasas de DCP2 de la Tabla 6, o un contenido sustancialmente similar de lisina, lípidos, proteínas y grasas de DCP2 de la Tabla 6, tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno o pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso destinado a vacas lecheras) o un mercado de pienso destinado a vacuno o un mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, mercado de pienso destinado a animales productores de leche).

En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden un contenido de grasas y proteínas de DCP3 de la Tabla 6, o un contenido sustancialmente similar de proteínas y grasas de DCP3 de la Tabla 6, tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno, pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso para vacas lecheras), pienso destinado a porcino o pienso destinado a aves de corral (por ejemplo, pienso destinado a pollos) o un mercado de pienso destinado a vacuno, mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, mercado de pienso para animales productores de leche), mercado de pienso destinado a porcino o mercado de pienso destinado a aves de corral (por ejemplo, mercado de pienso destinado a pollos). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden el contenido de lípidos, proteínas y grasas de DCP3 de la Tabla 6, o un contenido sustancialmente similar de lípidos, proteínas y grasas de DCP3 de la Tabla 6, tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno, pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso para vacas lecheras), pienso destinado a porcino o pienso destinado a aves de corral (por ejemplo, pienso destinado a pollos) o un mercado de pienso destinado a vacuno, mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, un mercado de pienso destinado a animales productores de leche), mercado de pienso destinado a porcino o mercado de pienso destinado a aves de corral (por ejemplo, mercado de pienso destinado a pollos). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador que comprenden el contenido de lisina, lípidos, proteínas y grasas de DCP3 de la Tabla 6 o un contenido sustancialmente similar de lisina, lípidos, proteínas y grasas de DCP3 de la Tabla 6, tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a vacuno, pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, pienso para vacas lecheras), pienso destinado a porcino o

pienso destinado a aves de corral (por ejemplo, pienso destinado a pollos) o un mercado de pienso destinado a vacuno, mercado de pienso destinado a animales productores de leche (por ejemplo, un mercado de pienso destinado a animales productores de leche), mercado de pienso destinado a porcino o mercado de pienso destinado a aves de corral (por ejemplo, mercado de pienso destinado a pollos)

5 En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención además comprenden complementar una composición de co-productos de destilador (por ejemplo, co-productos de destilador para piensos destinados a animales) con uno o más componentes adicionales. En algunas realizaciones, el componente adicional es un nutriente, un mejorador de sabor, un estimulador de digestión o un mejorador de color. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención además comprenden el reciclaje de al menos una corriente de alimentación en un
10 proceso de producción de etanol o butanol.

En algunas realizaciones, el contenido de proteína de los co-productos de destilador para pienso destinado a animales se complementa con una masa celular de levadura, en la que la masa celular de levadura aumenta el contenido de proteínas de los co-productos de destilador para pienso destinado a animales. En algunas realizaciones, el contenido de ácido graso proporciona energía adicional y nutrientes para la composición de pienso
15 destinada a animales que comprende los co-productos de destilador para pienso destinado a animales. En algunas realizaciones, el butanol producido en el proceso de producción de butanol se usa como lavado de disolvente para al menos una corriente de alimentación del proceso de producción de butanol. En algunas realizaciones, el alcohol producido en el proceso de producción de alcohol se usa como lavado de disolvente para al menos una corriente de alimentación del proceso de producción de etanol. En algunas realizaciones, se combina una primera corriente de
20 alimentación con una segunda corriente de alimentación para producir co-productos de destilador para piensos destinados a animales con mayor estabilidad frente al almacenamiento. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador (por ejemplo, los co-productos de destilador para piensos destinados a animales) tienen un perfil de color mejorado.

Algunas realizaciones de la presente invención se refieren a co-productos de destilador para una composición de pienso destinado a animales que comprende al menos aproximadamente 25% de proteínas brutas (porcentaje en peso de la composición). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales comprenden menos de aproximadamente 10% de grasas brutas. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinada a animales comprenden aproximadamente 7% de grasas brutas y al menos 13% de proteínas brutas. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales además comprenden menos de aproximadamente 10% de éster de ácido graso (por ejemplo, éster isobutílico de ácido graso). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales además comprenden menos de aproximadamente 5% de lisina. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen un perfil de nutrientes para un pienso destinado a animales o mercado de pienso destinado a animales.

35 En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales tiene niveles elevados de ácidos grasos y tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a porcino o aves de corral o mercado de pienso destinado a porcino o aves de corral. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales tiene niveles elevados de ácidos grasos y fibra y tiene el perfil de nutrientes.

40 En algunas realizaciones, una corriente de alimentación de proceso de sólidos retirados de un macerado antes de la fermentación (por ejemplo, torta húmeda) tiene un elevado contenido de proteínas y un bajo contenido de grasas. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador para la composición de pienso destinado a animales que comprende dicha corriente de alimentación tiene un perfil de nutrientes para pienso destinado a animales productores de leche o para el mercado de pienso destinado a animales productores de leche.

45 En algunas realizaciones, el lípido se genera por medio de evaporadores y los ácidos grasos se usan para otros fines y aproximadamente 50% (porcentaje en peso) del maíz bruto procedente del macerado y las corrientes restantes se combinan y procesan, los co-productos de destiladores resultantes pueden comprender proteína bruta, grasa bruta, triglicéridos, ácido graso y éster de ácido graso. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador comprenden al menos de aproximadamente 25% a aproximadamente 31% de proteína bruta, de al menos aproximadamente 6% a aproximadamente 10% de grasa bruta, de al menos aproximadamente 4% a aproximadamente 8% de triglicéridos, de al menos aproximadamente 0% a aproximadamente 2% de ácido graso y de al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 3% de éster de ácido graso (por ejemplo, éster isobutílico de ácido graso). En algunas realizaciones, los co-productos de destilador comprenden aproximadamente 28% de proteína bruta, aproximadamente 8% de gras bruta, aproximadamente 6% de triglicéridos, aproximadamente 0,7% de ácido graso y aproximadamente 1% de éster de ácido graso (por ejemplo).

55 En algunas realizaciones, los sólidos separados del residuo sólido de destilación completo y aproximadamente 50% del aceite de maíz extraído del macerado se combinan y la composición de co-productos de destilador resultante puede comprender proteína bruta, grasa bruta, triglicéridos, ácido graso, éster isobutílico de ácido graso, lisina, NDF y ADF. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador comprenden al menos de aproximadamente 26% a aproximadamente 34% de proteína bruta, de al menos aproximadamente 15% a aproximadamente 25% de grasa
60

bruta, de al menos aproximadamente 12% a aproximadamente 20% de triglicéridos, de al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 2% de ácido graso, de al menos aproximadamente 2% a aproximadamente 4% de éster de ácido graso (por ejemplo, éster isobutílico de ácido graso), de al menos aproximadamente 1% a aproximadamente 2% de lisina, de al menos aproximadamente 11% a aproximadamente 23% de NDF, y de al menos aproximadamente 5% a aproximadamente 11%. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador pueden comprender aproximadamente 29% de proteína bruta, aproximadamente 21% de grasa bruta, aproximadamente 16% de triglicéridos, aproximadamente 1% de ácido graso, aproximadamente 3% de éster de ácido graso (por ejemplo, éster isobutílico de ácido graso), aproximadamente 1% de lisina, aproximadamente 17% de NDF y aproximadamente 8% de ADF. El elevado contenido de grasa, triglicéridos y lisina y el bajo contenido en fibra de los co-productos de destilador puede resultar deseable como pienso destinado a porcino y aves de corral.

En algunas realizaciones, los co-productos de destilador tales como DDGS pueden comprender uno o más de los siguientes: aproximadamente 20-35% de proteína bruta, aproximadamente 5-15% de grasa bruta, aproximadamente 5-10% de fibra bruta, aproximadamente 0-10% de ceniza, aproximadamente 0-2% de lisina, aproximadamente 0-2% de arginina, aproximadamente 0-0,5% de triptófano, aproximadamente 0-1% de metionina y aproximadamente 0-1% de fósforo.

En algunas realizaciones, los co-productos de destilador se pueden procesar por medio de densificación o formación de pellas. Por ejemplo, la formación de pellas de DDGS para piensos destinados a animales puede estimular la ingesta de pienso (por ejemplo, mayor sabrosidad); nutrientes y densidad aparente mejorados; y mayor durabilidad, manipulación y fluidez en los recipientes de alimentación. Los co-productos de destilador sometidos a formación de pellas pueden también reducir los costes de transporte. Diversos factores tales como las características físicas (por ejemplo, tamaño de partícula, densidad y nutrientes (por ejemplo, proteína, grasa, fibra, humedad y contenido de aceite) del DDGS y de las operaciones de molienda de las pellas (por ejemplo, especificaciones de troquel, velocidad de troquel, geometría de troquel, tiempo de acondicionamiento y temperatura) pueden tener un impacto sobre la calidad de la pella. En algunas realizaciones, un método de formación de pellas de los co-productos de destilador puede incluir ajustar las especificaciones del troquel, la velocidad de troquel, la geometría de troquel, el tiempo de acondicionamiento y la temperatura de acondicionamiento para mejorar la calidad de las pellas de los co-productos de destilador. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador sometidos a formación de pellas pueden ser esféricos, cilíndricos o con forma cúbica.

En algunas realizaciones, DDGS se puede procesar de forma adicional para separar DDGS productor de fibras con menor contenido de fibras y mayor contenido de grasas y proteínas. En algunas realizaciones, la fibra se puede retirar de DDGS por medio de elutriación y/o tamizado (véase, por ejemplo, Srinivasin, et al., Cereal Chem. 83:324-330, 2006). La fibra retirada de DDGS se puede usar en piensos destinados a animales rumiantes o para producir un aceite de fibras, goma de fibras o xilitol. La fibra también se puede usar como fuente de energía.

En algunas realizaciones, los co-productos de la presente invención tales como DDGS se pueden usar para consumo humano. Por ejemplo, DDGS se puede usar como complemento de harinas alimentarias, por ejemplo, productos cocidos. DDGS también se puede usar en la industria agrícola como complemento para suelos, por ejemplo, como fertilizante. En algunas realizaciones, se pueden usar los granos de destilador para producir biogas (por ejemplo, metano, CO₂) por medio de un digestor anaeróbico, y se puede usar el biogas como fuente de energía, por ejemplo, para la producción de calor y electricidad. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador sometidos a formación de pellas se pueden usar como combustible. Por ejemplo, DDGS sometido a formación de pellas se pueden mezclar con carbón formando una mezcla de combustible que se puede usar como fuente de energía.

En algunas realizaciones, se puede convertir de forma adicional un macerado que comprende azúcares fermentables hasta obtener productos finales tales como azúcares de alto contenido en fructosa. En otras realizaciones, los azúcares fermentables se someten a fermentación con microorganismos que producen fermentación. La etapa de contacto y la etapa de fermentación se pueden llevar a cabo de forma simultánea en el mismo recipiente de reacción o de forma secuencial. En general, los procesos de fermentación se describen en The Alcohol Textbook 3ª edición, A Reference for the Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Industries, Eds Jacques et al. (1999) Nottingham University Press, Reino Unido.

En algunas realizaciones, el rendimiento de butanol en el proceso de producción de butanol al que se refiere la presente invención es de al menos aproximadamente 1 g/l, al menos aproximadamente 2 g/l, al menos aproximadamente 3 g/l, al menos aproximadamente 4 g/l, o al menos aproximadamente 5 g/l. En algunas realizaciones, el rendimiento de butanol puede ser cualquier intervalo de valores divulgados en la presente memoria, por ejemplo, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 4 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l, de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 4 g/l, de aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 4 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 3 g/l, de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 3 g/l, o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 2 g/l.

En algunas realizaciones, el rendimiento de etanol del proceso de producción de etanol al que se refiere la presente invención es de al menos aproximadamente 1 g/l, al menos aproximadamente 2 g/l, al menos aproximadamente

3 g/l, al menos aproximadamente 4 g/l, o al menos aproximadamente 5 g/l. En algunas realizaciones, el rendimiento de butanol puede ser cualquier intervalo de valores divulgados en la presente memoria, por ejemplo, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 4 g/l a aproximadamente 5 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l, de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 4 g/l, de aproximadamente 3 g/l a aproximadamente 4 g/l, de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 3 g/l, de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 3 g/l, o de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 2 g/l.

Otras realizaciones de la presente invención van destinadas a métodos para mitigar el impacto de los contaminantes de fermentación sobre la producción de los co-productos para piensos destinados a animales, que comprende separar al menos una corriente de alimentación de un proceso de producción de etanol o butanol antes de la fermentación. En algunas realizaciones, la presente invención va destinada a métodos para reducir la variabilidad del contenido de lípidos de los co-productos de destilador para piensos destinados a animales, que comprende separar las corrientes de alimentación de un proceso de producción de etanol o butanol contribuyendo a los co-productos de destilador para la producción de piensos destinados a animales, y combinar las corrientes de alimentación para lograr un contenido de lípidos controlado. En algunas realizaciones, la presente invención va destinada a métodos para aumentar el contenido de triglicéridos de los co-productos de destilador para pienso destinado a animales, que comprenden combinar corrientes de alimentación que contiene alto contenido de triglicéridos de un proceso de producción de etanol o butanol en una proporción creciente con respecto a las corrientes que contienen bajo contenido de triglicéridos para los co-productos de destilador particulares para la composición de pienso destinado a animales.

En algunas realizaciones, la presente invención va destinada a métodos para reducir la contaminación por micotoxinas en co-productos de destilador para un pienso destinado a animales. Las micotoxinas tales como aflatoxina, tricotecenos tales como desoxinivalenol (vomitoxina) y toxina T-2, fumonisina, zearalenona pueden estar presentes en los co-productos de destilador. Los co-productos de destilador se pueden analizar para la presencia de micotoxinas usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina, cromatografía en fase gas (GLC) o ensayo inmunoabsorbente ligados a enzimas (ELISA) (véase, por ejemplo, Neogen Corporation, Lansing, MI). En algunas realizaciones, la presente invención va destinada a métodos para reducir la contaminación por micotoxinas en co-productos de destilador para pienso destinado a animales que comprenden separar las corrientes de alimentación de un proceso de producción de alcohol contribuyendo a los co-productos de destilador para la producción de pienso destinado a animales, sometiendo a ensayo las corrientes de alimentación en cuanto a micotoxinas, y eliminando y purificando las corrientes de alimentación con contaminación potencial por micotoxinas. En algunas realizaciones, la corriente de alimentación contaminada se puede tratar para eliminar la contaminación. Por ejemplo, los granos contaminados por micotoxinas se pueden tratar por medio de amoníaco. En algunas realizaciones, se pueden añadir inhibidores de mohos a los co-productos de destilador. Por ejemplo, los inhibidores de mohos tales como amoníaco; ácidos orgánicos tales como ácido propiónico, ácido sórbico, ácido benzoico y ácido acético, y sales de ácidos orgánicos tales como propionato de calcio y sorbato de potasio se pueden añadir a los co-productos de destilador. Los materiales absorbentes tales como arcillas y carbón vegetal activado se pueden añadir a los co-productos de destilador para minimizar la contaminación por micotoxinas. La contaminación por micotoxinas también se puede minimizar por medio de la presencia de ésteres generados por medio de conversión de un alcohol en un éster. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria generan ésteres de alcohol (por ejemplo, ésteres butílicos) por medio de esterificación de un ácido graso con un alcohol. En algunas realizaciones, los co-productos de destilador pueden comprender ésteres tales como ésteres butílicos como medio para minimizar la contaminación por micotoxinas.

Las células de levaduras generalmente se suministran en cantidades de 10^4 a 10^{12} cuentas de levaduras viables por ml de caldo de fermentación. En algunas realizaciones, las células de levaduras se suministran de 10^7 a 10^{10} cuentas de levadura viables por ml de caldo de fermentación. La fermentación puede incluir además de microorganismos de fermentación (por ejemplo, levaduras), nutrientes, opcionalmente ácido y enzimas adicionales. En algunas realizaciones, además de las materias primas descritas anteriormente, el medio de fermentación contiene complementos que incluyen, pero sin limitarse a, vitaminas (por ejemplo, biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, riboflavina), cofactores y macro- y micro-nutrientes y sales (por ejemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; K_2HPO_4 ; NaCl ; MgSO_4 ; H_3BO_3 ; ZnCl_2 y CaCl_2).

Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se piensa que los procesos descritos en la presente memoria son útiles junto con cualquier microorganismo productor de alcohol. Los microorganismos productores de alcohol se conocen en la técnica. Por ejemplo, la oxidación fermentativa de metano por medio de bacterias metanotróficas (por ejemplo, *Methylosinus trichosporium*) produce metanol, y la puesta en contacto de metanol (un alcohol alquílico C_1) con un ácido carboxílico y un catalizador capaz de esterificar el ácido carboxílico con metanol forma un éster de metanol del ácido carboxílico. La cepa de levadura CEN.PK113-7D (CBS 8340, the Central Bureau voor Schimmelcultuur; van Dijken, et al., Enzyme Microb. Technol. 26:706-714, 2000) puede producir etanol, y la puesta en contacto de etanol con un ácido carboxílico y un catalizador capaz de esterificar el ácido carboxílico con etanol forma éster etílico.

Los microorganismos recombinantes que producen alcohol también se conocen en la técnica (por ejemplo, Ohta, et al., Appl. Environ. Microbiol. 57:893-900, 1991; Underwood, et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1071-1081, 2002; Shen and Liao, Metab. Eng. 10:312-320, 2008; Hahnai, et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:7814-7818, 2007; patente

de EE.UU. N.º 5.514.583; patente de EE.UU. N.º 5.712.133; patente internacional PCT N.º publicación WO 1995/028476; Feldmann, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:354-361, 1992; Zhang, et al., Science 267:240-243, 1995; solicitud de patente de EE.UU. N.º publicación 2007/0031918; patente de EE.UU. N.º 7.223.575; patente de EE.UU. N.º 7.741.119; solicitud de patente de EE.UU. N.º publicación 2009/0203099; solicitud de patente de EE.UU. N.º publicación 2009/0246846; y patente internacional PCT N.º publicación WO 2010/075241.

Como se ha mencionado anteriormente, los mecanismos metabólicos de los microorganismos se pueden modificar genéticamente para producir un alcohol (por ejemplo, butanol). Por ejemplo, el microorganismo se puede someter a estudio técnico para que contenga un mecanismo biosintético de butanol o un mecanismo biosintético para un isómero de butanol tal como 1-butanol, 2-butanol o isobutanol.

En algunas realizaciones, el mecanismo biosintético comprende al menos un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que cataliza un sustrato para producir la conversión del mecanismo biosintético. En algunas realizaciones, cada sustrato producir la conversión del mecanismo biosintético está catalizado por un polipéptido codificado por un polinucleótido heterólogo. Estos mecanismos biosintéticos también se pueden modificar para reducir o eliminar los metabolitos no deseados, y mejorar de este modo el rendimiento del alcohol.

La producción de butanol por un microorganismo se divulga, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos de publicación 2007/0092957; 2007/0259410; 2007/0292927; 2008/0182308; 2008/0274525; 2009/0305363 y 2009/0305370.

Los microorganismo recombinantes apropiados capaces de producir butanol se conoce en la técnica, y determinados microorganismos apropiados capaces de producir butanol se describen en la presente memoria. Los microorganismos recombinantes para producir butanol por medio de una mecanismo biosintético pueden incluir un miembro de los géneros *Clostridium*, *Zymomonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Pachyosolen*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Trichosporon*, *Yamadazyma* o *Saccharomyces*. En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden escogerse entre el grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus macerans*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Candida sonorensis*, *Candida methanosorbosa*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Issatchenkia orientalis*, *Debaryomyces hanseni* y *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante es una levadura. En algunas realizaciones, el microorganismo recombinante es una levadura Crabtree-positivo escogida entre *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Dekkera*, *Torulopsis*, *Brettanomyces* y algunas especies de *Candida*. Las especies de levadura Crabtree-positivo incluyen, pero sin limitarse a, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mikitaie*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces castellii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailli* y *Candida glabrata*. Las cepas apropiadas incluyen las descritas en determinadas aplicaciones citadas e incorporadas por referencia en la presente memoria así como también en la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 61/380.563, presentada el 7 de septiembre de 2010 y la publicación internacional PCT N.º WO 2012/033832. Las cepas apropiadas y los métodos también incluyen los descritos en la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/246.709, presentada el 29 de septiembre de 2010.

Los ejemplos de otros organismos de fermentación tales como los que producen etanol, por ejemplo, bacterias etanológicas que expresan alcohol deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa y que se pueden obtener a partir de *Zymomonas mobilis* (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.000.000; la patente de EE.UU. N.º 5.028.539; la patente de EE.UU. N.º 5.424.202; la patente de EE.UU. N.º 5.514.583 y la patente de EE.UU. N.º 5.554.520) se pueden modificar para la producción de etanol. En realizaciones adicionales, los isobutanológenos expresan xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, enzimas que convierten xilosa y xilulosa. En algunas realizaciones, se usa xilosa isomerasa para convertir xilosa en xilulosa. En algunas realizaciones, se usa un microorganismo capaz de fermentar tanto pentosas como hexosas en butanol.

En algunas realizaciones, los microorganismos comprenden un mecanismo biosintético de butanol. En algunas realizaciones, al menos uno, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro polipéptidos que catalizan sustrato para producir conversiones de un mecanismo están codificados por polinucleótidos heterólogos en los microorganismos. En algunas realizaciones, todos los polipéptidos que catalizan sustrato para producir conversiones de un mecanismo están codificados por polinucleótidos heterólogos en el microorganismo. En algunas realizaciones, el microorganismo comprende una reducción o eliminación de la actividad de piruvato descarboxilasa. Los microorganismos sustancialmente libres de actividad de piruvato descarboxilasa se describen en la Solicitud de EE.UU. N.º de publicación 2009/0305363. Los microorganismos sustancialmente libres de una enzima que tiene actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD tal como GPD2 también se describen en la presente memoria.

Los mecanismos biosintéticos apropiados para la producción de butanol se conoce en la técnica, y determinados mecanismos apropiados se describen en la presente memoria. En algunas realizaciones, el mecanismo biosintético

de butanol comprende al menos un gen que es heterólogo con respecto a la célula de hospedador. En algunas realizaciones, el mecanismo biosintético de butanol comprende más de un gen que es heterólogo con respecto a la célula de hospedador. En algunas realizaciones, el mecanismo biosintético de butanol comprende genes heterólogos que codifican polipéptidos que corresponden a cada etapa de un mecanismo biosintético.

5 Los mecanismos biosintéticos para la producción de isobutanol que se pueden usar incluyen los descritos en la patente de EE.UU. N.º 7.851.188. En una realización, el mecanismo biosintético de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

a) piruvato en acetolactato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;

10 b) acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato, que puede estar catalizada, por ejemplo, acetohidroxi ácido reductoisomerasa;

c) 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetohidroxi ácido deshidratasa;

d) α -cetoisovalerato en isobutiraldehído, que puede estar catalizada, por ejemplo, por α -ceto ácido descarboxilasa de cadena ramificada; y,

15 e) isobutiraldehído en isobutanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

En otra realización, el mecanismo biosintético de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

a) piruvato en acetolactato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;

20 b) acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por cetol-acido reductoisomerasa;

c) 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por dihidroxi ácido deshidratasa;

d) α -cetoisovalerato en valina, que puede estar catalizada, por ejemplo, por transaminasa o valina deshidrogenasa;

e) valina en isobutilamina, que puede estar catalizada, por ejemplo, por valina descarboxilasa;

25 f) isobutilamina en isobutiraldehído, que puede estar catalizada, por ejemplo, por omega transaminasa; y

g) isobutiraldehído en isobutanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

En otra realización, el mecanismo biosintético de isobutanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

30 a) piruvato en acetolactato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;

b) acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetohidroxi ácido reductoisomerasa;

c) 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetohidroxi ácido deshidratasa;

35 d) α -cetoisovalerato en isobutiril-CoA, que puede estar catalizada, por ejemplo, por ceto ácido deshidrogenasa con cadena ramificada;

e) isobutiril-CoA en isobutiraldehído, que puede estar catalizada, por ejemplo, por aldehído deshidrogenasa acetilante; y

40 f) isobutiraldehído en isobutanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

Los mecanismos biosintéticos para la producción de 1-butanol que se pueden usar incluyen los descritos en la patente de EE.UU. N.º de publicación 2008/0182308. En una realización, el mecanismo biosintético de 1-butanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

a) acetil-CoA en acetoacetil-CoA, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetil-CoA acetiltransferasa;

45 b) acetoacetil-CoA en 3-hidroxiacetil-CoA, que puede estar catalizada, por ejemplo, por 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa;

- c) 3-hidroxi-butiril-CoA en crotonil-CoA, que puede estar catalizada, por ejemplo, por crotonasa;
- d) crotonil-CoA en butiril-CoA, que puede estar catalizada, por ejemplo, por butiril-CoA deshidrogenasa;
- e) butiril-CoA en butiraldehído, que puede estar catalizada, por ejemplo, en butiraldehído deshidrogenasa; y
- f) butiraldehído en 1-butanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por butanol deshidrogenasa.

5 Los mecanismos biosintéticos para la producción de 2-butanol que pueden usarse incluyen los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2007/0259410 y la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2009/0155870. En una realización, el mecanismo biosintético de 2-butanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

- a) piruvato en alfa-acetolactato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;
- 10 b) alfa-acetolactato en acetoína, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;
- c) acetoína en 3-amino-2-butanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetoína aminasa;
- d) 3-amino-2-butanol en 3-amino-2-butanol fosfato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por aminobutanol quinasa;
- e) 3-amino-2-butanol fosfato en 2-butanona, que puede estar catalizada, por ejemplo, por aminobutanol fosfato fosforilasa; y
- 15 f) 2-butanona en 2-butanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por butanol deshidrogenasa.

En otra realización, el mecanismo biosintético de 2-butanol comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

- a) piruvato en alfa-acetolactato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;
- 20 b) alfa-acetolactato en acetoína, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;
- c) acetoína en 2,3-butanodiol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por butanodiol deshidrogenasa;
- d) 2,3-butanodiol en 2-butanona, que puede estar catalizada, por ejemplo, por diol deshidratasa; y
- e) 2-butanona en 2-butanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por butanol deshidrogenasa.

25 Los mecanismos biosintéticos para la producción de 2-butanona que se pueden usar incluyen los descritos en la patente de EE.UU. N.º de solicitud 2007/0259410 y la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2009/0155870. En una realización, el mecanismo biosintético de 2-butanona comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

- a) piruvato en alfa-acetolactato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;
- b) alfa-acetolactato en acetoína, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;
- 30 c) acetoína en 3-amino-2-butanol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetoina aminasa;
- d) 3-amino-2-butanol en 3-amino-2-butanol fosfato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por aminobutanol quinasa; y
- e) 3-amino-2-butanol fosfato en 2-butanona, que puede estar catalizada, por ejemplo, por aminobutanol fosfato fosforilasa.

35 En otra realización, el mecanismo biosintético de 2-butanona comprende las siguientes conversiones de sustrato en producto:

- a) piruvato en alfa-acetolactato, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa;
- b) alfa-acetolactato en acetoína, que puede estar catalizada, por ejemplo, por acetolactato descarboxilasa;
- c) acetoína en 2,3-butanodiol, que puede estar catalizada, por ejemplo, por butanodiol deshidrogenasa;
- 40 d) 2,3-butanodiol en 2-butanona, que puede estar catalizada, por ejemplo, por diol deshidratasa.

En una realización, la invención produce butanol a partir de fuentes de carbono procedentes de plantas, evitando el impacto ambiental negativo asociado a los procesos petroquímicos convencionales para la producción de butanol. En una realización, la invención proporciona un método para la producción de butanol usando células de

hospedador industriales y recombinantes que comprenden un mecanismo de butanol.

En algunas realizaciones, el mecanismo biosintético de isobutanol comprende al menos un polinucleótido, al menos dos polinucleótidos, al menos tres polinucleótidos, o al menos cuatro polinucleótidos, que es/son heterólogo(s) con respecto a la célula de hospedador. En realizaciones, cada conversión de sustrato en producto de un mecanismo biosintético de isobutanol en una célula de hospedador recombinante está catalizada por un polipéptido de heterólogo. En realizaciones, el polipéptido que cataliza la conversión de sustrato en producto de acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato y/o el polipéptido que cataliza la conversión de sustrato en producto de isobutiraldehído en isobutanol son capaces de utilizar NADH como cofactor.

Las expresiones "acetohidroxiácido sintasa", "acetolactato sintasa" y "acetolactato sintetasa" (abreviada como "ALS") se usan de forma intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a una enzima que cataliza la conversión de piruvato en acetolactato y CO₂. Las acetolactato sintasas a modo de ejemplo se conocen por el número EC 2.2.1.6 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego). Estas enzimas no modificadas están disponibles a partir de un número de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, *Bacillus subtilis* (GenBank Nos: CAB15618, Z99122), secuencia de amino ácidos NCBI (National Center for Biotechnology Information), secuencia de nucleótidos NCBI, respectivamente), *Klebsiella pneumoniae* (GenBank nos: AAA25079), M73842) y *Lactococcus lactis* (GenBank nos: AAA25161, L16975).

La expresión "cetol-ácido reductoisomerasa" ("KARI"), "acetohidroxi ácido isomeroeductasa" y "acetohidroxi ácido reductoisomerasa" se usan de manera intercambiable y se refieren a enzimas capaces de catalizar la reacción de (S)-acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato. Enzimas de KARI a modo de ejemplo se pueden clasificar como número EC 1.1.1.86 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego), y se encuentran disponibles a partir de una amplia serie de microorganismos, incluyendo, pero sin limitarse a, *Escherichia coli* (GenBank nos: NP_418222, NC_000913), *Sacharomyces cerevisiae* (GenBank nos: NP_013459, NC_001144), *Methanococcus maripaludis* (GenBank Nos: CAF30210, BX957220) y *Bacillus subtilis* (Genbank nos: CAB14789, Z99118). KARIs incluyen las variantes de KARI *Anaerostipes caccae* "K9G9" y "K9D3". Las enzimas cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) se describen en la solicitud de patente de EE.UU. Nos de publicación 2008/0261230, 2009/0163376 y 2010/0197519 y la solicitud PCT N.º de publicación WO 2011/041415. Los ejemplos de KARIs divulgados en la presente memoria son los mutantes de *Lactococcus lactis*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, y *Pseudomonas fluorescens* PF5. En algunas realizaciones, KARI utiliza NADH. En algunas realizaciones, KARI utiliza NADPH.

La expresión "acetohidroxi ácido deshidratasa" y "dihidroxiácido deshidratasa" ("DHAD") se refiere a una enzima que cataliza la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato en α -cetoisovalerato. Las acetohidroxi ácido deshidratasa a modo de ejemplo se conocen por el número EC 4.2.1.9. Dichas enzimas están disponibles a partir de una amplia serie de microorganismos, incluyendo, pero sin limitarse a, *E. coli* (Genbank nos: YP_026248, NC000913), *Sacharomyces cerevisiae* (Genbank nos: NP_012550, NC 001142), *M. maripaludis* (Genbank nos: CAF29874, BX957219), *B. subtilis* (Genbank nos: CAB14105, Z99115), *L. lactis* y *N. crassa*. La solicitud de patente de EE.UU. N.º. de publicación 2010/0081154 y la patente de EE.UU. N.º. 7.851.188, describen dihidroxiácido deshidratasa (DHADs) que incluyen DHAD a partir de *Streptococcus mutans*.

La expresión " α -cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada", " α -cetoácido descarboxilasa", " α -cetoisovalerato descarboxilasa" o "2-cetoisovalerato descarboxilasa" ("KIVD") se refiere a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato en isobutiraldehído y CO₂. Las α -ceto ácido descarboxilasas de cadena ramificada a modo de ejemplo se conocen por medio del número EC 4.1.1.72 y se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, *Lactococcus lactis* (GenBank nos: AAS49166, AY548760; CAG34226, AJ746364), *Salmonella typhimurium* (Genbank nos: NP_461346, NC_003197), *Clostridium acetobutylicum* (GenBank nos: NP_149189, NC_001988), *M. caseolyticus* y *L. grayi*.

La expresión "alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada" ("ADH") se refiere a una enzima que cataliza la conversión de isobutiraldehído en isobutanol. Las alcohol deshidrogenasas de cadena ramificada a modo de ejemplo se conocen por medio del número EC 1.1.1.265, pero también se pueden clasificar bajo otras alcohol deshidrogenasas (específicamente, EC 1.1.1.1 o 1.1.1.2). Las alcohol deshidrogenasas pueden ser dependientes de NADPH o dependientes de NADH. Dichas enzimas se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, *S. cerevisiae* (GenBan nos: NP_010656, NC_001136, NP_014051, NC_001145), *E. coli* (GenBank nos: NP_417484, NC_000913), *C. acetobutylicum* (GenBank nos: NP_349892, NC_003030, NP_349891, NC_003030), la patente de EE.UU. N.º. publicación 2009/0269823 describe SadB, una alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Achromobacter xylosoxidans*. Las alcohol deshidrogenasas también incluyen ADH de hígado de caballo y *Beijerinckia indica* ADH (como se describe por parte de la patente de EE.UU. N.º. de publicación 2011/0269199).

La expresión "butanol deshidrogenasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de isobutiraldehído en isobutanol o la conversión de 2-butanona en 2-butanol. Las butanol deshidrogenasas son un subgrupo de una amplia familia de alcoholes deshidrogenasas. La butanol deshidrogenasa pueden ser dependiente de NAD- o dependiente de NADP. Las enzimas dependientes de NAD se conocen como EC 1.1.1.1 y se encuentran disponibles, por ejemplo, a partir de *Rhodococcus ruber* (GenBank nos: CAD36475, AJ491307). Las enzimas dependientes de NADP se conocen como EC 1.1.1.2 y se encuentran

disponibles, por ejemplo, a partir de *Pyrococcus furiosus* (GenBank nos: AAC25556, AF013169). Adicionalmente, una butanol deshidrogenasa se encuentra disponibles a partir de *Escherichia coli* (GenBank nos: NP_417484, NC_000913) y una ciclohexanol deshidrogenasa se encuentra disponible en *Acinetobacter sp* (GenBank nos: AAG10026, AF282240). La expresión "butanol deshidrogenasa" también se refiere a una enzima que cataliza la conversión de butiraldehído en 1-butanol, usando bien NADH o NADPH como cofactor. Las butanol deshidrogenasas se encuentran disponibles a partir de, por ejemplo, *C. acetobutylicum* (GenBank nos: NP_149325, NC_001988; nótese, estos procesos enzimáticos poseen actividad tanto de aldehído como de alcohol deshidrogenasa); NP_349891, NC_003030; y NP_349892, NC_003030) y *E. coli* (GenBank nos: NP_417-484, NC_000913).

La expresión "ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato en isobutiril-CoA (isobutiril-coenzima A), normalmente usando NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótico) como aceptor de electrones. Las ceto ácido deshidrogenasas ramificadas a modo de ejemplo se conocen por medio del número EC 1.2.4.4. Dichas ceto ácido deshidrogenasas de cadena ramificada están comprendidas por cuatro subunidades y las secuencias procedentes de todas las subunidades se encuentran disponibles a partir de una amplia serie de microorganismos, incluyendo, pero sin limitarse a, *B. subtilis* (GenBank nos: CAB14336, Z99116, CAB14335, Z99116, CAB14334, Z99116, CAB14337, Z99116) y *Pseudomonas putida* (GenBank nos: AAA65614, M57613, AAA65615, M57613, AAA65617, M57613, AAA65618, M57613).

La expresión "aldehído deshidrogenasa acilante" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de isobutirilCoA en isobutiraldehído, normalmente usando bien NADH o NADPH como donante de electrones. Las aldehído deshidrogenasas acilantes a modo de ejemplo se conocen por medio de los números EC 1.2.1.10 y 1.2.1.57. Dichas enzimas se encuentran disponibles a partir de múltiples fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, *Clostridium beijerinckii* (GenBank nos: AAD31841, AF157306), *C. acetobutylicum* (Genbank nos: NP_149325, NC_001988, NP_149199, NC_001988), *P. putida* (GenBank nos: AAA89106, U13232) y *Thermus thermophilus* (GenBank nos: YP_145486, NC_006461).

El término "transaminasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato en L-valina, usando bien alanina o bien glutamato como donantes de amina. Las transaminasas a modo de ejemplo se conocen por medio del número EC 2.6.1.42 y 2.6.1.66. Dichas enzimas se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes. Los ejemplos de fuentes para enzimas dependientes de alanina incluyen, pero sin limitarse a, *E. coli* (GenBank nos: YP_026231, NC_000913) y *Bacillus licheniformis* (GenBank nos: YP_093743, NC_006322). Los ejemplos de fuentes de enzimas dependientes de glutamato incluyen, pero sin limitarse a, *E. coli* (GenBank nos: YP_026247, NC_000913), *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank nos: NP_012682, N_001142) y *Methanobacterium thermoautotrophicum* (GenBank nos: NP_276546, NC_000916).

La expresión "valina deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de α -cetoisovalerato en L-valina, normalmente usando NAD(P)H como donante de electrones y amoníaco como donante de amina. Las valina deshidrogenasas a modo de ejemplo se conocen por medio de los números EC 1.4.1.8 y 1.4.1.9 y dichas enzimas se encuentran disponibles a partir de un número de factores, incluyendo, pero sin limitarse a, *Streptomyces coelicolor* (GenBank nos: NP_628270, NC_003888) y *B. subtilis* (GenBank nos: CAB14339, Z99116).

La expresión "valina descarboxilasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de L-valina en isobutilamina y CO₂. Las valina descarboxilasas a modo de ejemplo se conocen por medio del número EC 4.1.1.14. Dichas enzimas se encuentran en *Streptomyces*, tales como por ejemplo, *Streptomyces viridifaciens* (GenBank nos: AAN10242, AY116644).

La expresión "omega transaminasa" se refiere a un enzima que cataliza la conversión de isobutilamina en isobutiraldehído usando un amino ácido apropiado como donante de amina. Las omega transaminasas a modo de ejemplo se conocen por medio del número EC 2.6.1.18 y se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a, *Alcaligenes denitrificans* (AAP92672, AY330220), *Ralstonia eutropha* (GenBank nos: YP_294474, NC_007347), *Shewanella oneidensis* (GenBank nos: NP_719046, NC_004347) y *P. putida* (GenBank nos: AAN66223, AE016776).

La expresión "acetil-CoA acetiltransferasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de dos moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA y coenzima A (CoA). Las acetil-CoA acetiltransferasas a modo de ejemplo son acetil-CoA-acetiltransferasas con preferencias de sustrato (reacción en la dirección de avance) para una acil-CoA de cadena corta y acetil-CoA y se clasifican como E.C. 2.3.1.9 [Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego]; aunque, las enzimas con una amplia gama de sustrato (E.C. 2.3.1.16) también son funcionales. Acetil-CoA acetiltransferasas se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes, por ejemplo, *Escherichia coli* (GenBank nos: NP_416728, NC_000913; secuencia de amino ácidos NCBI (National Center for Biotechnology Information), secuencia de nucleótidos NCBI), *Clostridium acetobutylicum* (GenBank nos: NP_349476.1, NC_003030; NP_149242, NC_001988, *Bacillus subtilis* (GenBank nos: NP_390297, NC_000964) y *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank nos: NP_015297, N_001148).

La expresión "3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de acetoacetil-CoA en 3-hidroxi-butiril-CoA. Las 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasas a modo de ejemplo pueden ser dependientes

de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) reducida, con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxi-butiril-CoA o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA. Los ejemplos se pueden clasificar como E.C. 1.1.1.35 y E.C. 1.1.1.30, respectivamente. Adicionalmente, las 3-hidroxi-butirilCoA deshidrogenasas pueden ser dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), con una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxi-butiril-CoA o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA y se clasifican como E.C. 1.1.1.157 y E.C. 1.1.1.36, respectivamente. Las 3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasas se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes, por ejemplo, *C. acetobutylicum* (GenBank nos: NP_349314, NC_003030), *B. subtilis* (GenBank nos: AAB09614, U29084), *Ralstonia eutropha* (GenBank nos: YP_294481, NC_007347) y *Alcaligenes eutrophus* (GenBank nos: AAA21973, J04987).

El término "crotonasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de 3-hidroxi-butiril-CoA en crotonil-CoA y H₂O. Las crotonasas a modo de ejemplo pueden tener una preferencia de sustrato por (S)-3-hidroxi-butiril-CoA o (R)-3-hidroxi-butiril-CoA y se pueden clasificar como E.C. 4.2.1.17 y E.C. 4.2.1.55, respectivamente. Las crotonasas se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes, por ejemplo, *E. coli* (GenBank nos: NP_415911, NC_000913), *C. acetobutylicum* (GenBank nos: NP_349318, NC_003030), *B. subtilis* (GenBank nos: CAB13705, Z99113) y *Aeromonas caviae* (GenBank nos: BAA21816, D88825).

La expresión "butiril-CoA deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de crotonil-CoA en butiril-CoA. Las butiril-CoA deshidrogenasas a modo de ejemplo pueden ser dependientes de NADH, dependientes de NADPH o dependientes de flavina y se pueden clasificar como E.C. 1.3.1.44, E.C. 1.3.1.38 y E.C. 1.3.99.2, respectivamente. Las butiril-CoA deshidrogenasas se encuentran disponibles a partir de un número de fuentes, por ejemplo, *C. acetobutylicum* (GenBank nos: NP_347102, NC_003030), *Euglena gracilis* (GenBank nos: Q5EU90), AY741582), *Streptomyces collinus* (GenBank nos: AAA92890, U37135), y *Streptomyces coelicolor* (GenBank nos: CAA22721, AL939127).

La expresión "butiraldehído deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de butiril-CoA en butiraldehído, usando NADH o NADPH como cofactor. Las butiraldehído deshidrogenasas con preferencia por NADH se conocen como E.C. 1.2.1.57 y se encuentran disponibles, por ejemplo, a partir de *Clostridium beijerinckii* (GenBank nos: AAD31841, AF157306) y *C. acetobutylicum* (GenBank nos: NP.sub--149325, NC.sub.--001988).

La expresión "isobutil-CoA mutasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de butiril-CoA en isobutil-CoA. Esta enzima usa coenzima B₁₂ como cofactor. Las isobutil-CoA mutasas a modo de ejemplo se conocen por medio del número EC 5.4.99.13. Estas enzimas se encuentran en un número de *Streptomyces* incluyendo, sin limitarse a, *Streptomyces cinnamonensis* (GenBank nos: AAC08713, U67612, CAB59633, AJ246005), *S. coelicolor* (GenBank nos: CAB70645, AL939123, CAB92663, AL939121) y *Streptomyces avermitilis* (GenBank nos: NP_824008, NC_003155, NP_824637, NC_003155).

La expresión "acetolactato deshidrogenasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de alfa-acetolactato en acetoina. La acetolactato descarboxilasas a modo de ejemplo se conocen como EC 4.1.1.5 y se encuentran disponibles, por ejemplo, a partir de *Bacillus subtilis* (GenBank nos: AAA22223, L04470), *Klebsiella terrigena* (GenBank nos: AAA25054, L04507) y *Klebsiella pneumoniae* (GenBank nos: AAU43774, AY722056).

La expresión "acetoina aminasa" o "acetoina transaminasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de acetoina en 3-amino-2-butanol. La acetoina aminasa puede utilizar el cofactor piridoxal-5'-fosfato o NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido) o NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido). El producto resultante puede tener estereoquímica (R) o (S) en la posición-3. La enzima dependiente de piridoxal fosfato puede usar un amino ácido tal como alanina o glutamato como donante de amina. Las enzimas dependientes de NADH o NADPH pueden usar amoníaco como segundo sustrato. Un ejemplo apropiado de acetoina aminasa dependiente de NADH, también conocida como alcohol deshidrogenasa, se describe por parte de Ito, et al. (patente de EE.UU. N° 6.432.688). Un ejemplo de acetoina aminasa dependiente de piridoxal es la amina:piruvato aminotransferasa (también denominada amino:piruvato transaminasa) descrita por Shin y Kim (J. Org. Chem. 67:2848-2853, 2002).

La expresión "acetoina quinasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de acetoina en fosfoacetoina. La acetoina quinasa puede utilizar ATP (adenosin trifosfato) o fosfoenolpiruvato como donante de fosfato en la reacción. Las enzimas que catalizan la reacción análoga sobre el sustrato similar dihidroxiacetona, por ejemplo, incluyen enzimas conocidas como EC 2.7.1.29 (Garcia-Alles, et al., Biochemistry 43:13037-13046, 2004).

La expresión "acetoina fosfato aminasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de fosfoacetoina en 3-amino-2-butanol O-fosfato. La acetoina fosfato aminasa puede usar el cofactor piridoxal-5'-fosfato, NADH o NADPH. El producto resultante puede tener estereoquímica (R) o (S) en la posición 3. La enzima dependiente de piridoxal-fosfato puede usar un amino ácido tal como alanina o glutamato. Las enzimas dependientes de NADH o NADPH pueden ser amoníaco como segundo sustrato. Aunque no existan informes de las enzimas que catalizan esta reacción sobre fosfoacetoina, existe una enzima dependiente de piridoxal-fosfato que se propone para llevar a cabo la reacción análoga sobre el sustrato similar serinol fosfato (Yasuta, et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:4999-5009, 2001).

La expresión "aminobutanol fosfato deshidrogenasa" también denominada "amino alcohol O-fosfato liasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de 3-amino-2-butanol O-fosfato en 2-butanona. La amino butanol fosfato fosfo-liasa puede utilizar el cofactor piridoxal 5'-fosfato. Existen informes de enzimas que catalizan la reacción análoga sobre el sustrato similar 1-amino-2-propanol fosfato (Jones, et al., Biochem. J. 134:167-182, 1973). La solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2007/0259410 describe una aminobutanol fosfato fosfo-liasa procedente del organismo *Erwinia carotovora*.

La expresión "aminobutanol quinasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de 3-amino-2-butanol o 3-amino-2-butanol O-fosfato. La amino butanol quinasa puede utilizar ATP como donante de fosfato. Aunque no existen informes de enzimas que catalicen esta reacción sobre 3-amino-2-butanol, existen informes de enzimas que catalizan la reacción análoga sobre sustratos similares de etanolamina y 1-amino-2-propanol (Jones, et. al., supra). La solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2009/0155870 describe, en el Ejemplo 14, un amino alcohol quinasa de *Erwinia carotovora subsp. Atroseptica*.

La expresión "butanodiol deshidrogenasa" también conocida como "acetoina reductasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de acetoina en 2,3-butanodiol. Butanodiol deshidrogenasa son un sub-grupo de una amplia familia de alcohol deshidrogenasas. Las enzimas de butanodiol deshidrogenasa pueden tener especificada para la producción de una estereoquímica (R) o (S) en el producto de alcohol. Las butanodiol deshidrogenasas específicas-(S) se conocen como EC 1.1.1.76 y se encuentran disponibles, por ejemplo, a partir de *Klebsiella pneumoniae* (GenBank nos: BBA13085, D86412). Las butanodiol deshidrogenasas específicas-(R) se conocen como EC 1.1.1.4 y se encuentran disponibles, por ejemplo, a partir de *Bacillus cereus* (GenBank nos: NP 830481, NC_004722; AAP07682, AE017000) y *Lactococcus lactis* (GenBank nos: AAK04995, AE006323).

La expresión "butanodiol deshidratasa" también conocida como "dial deshidratasa" o "propanodiol deshidratasa" se refiere a un polipéptido (o polipéptidos) que tienen una actividad enzimática que cataliza la conversión de 2,3-butanodiol en 2-butanona. La butanodiol deshidratasa puede utilizar el cofactor adenosil cobalamina (también conocido como enzima Bw o vitamina B12; aunque la vitamina B12 puede también hacer referencia a otras formas de cobalamina que no son coenzima B12). Las enzimas de adenosil cobalamina se conocen como EC 4.2.1.28 y se encuentran disponibles, por ejemplo, a partir de *Klebsiella oxytoca* (GenBank nos: AA08099 (subunidad alfa), D45071; BAA08100 (subunidad beta), D45071; y BBA08101 (subunidad gamma), D45071 (Nótese que se requieren tres subunidades para actividad), y *Klebsiella pneumoniae* (GenBank nos: AAC98384 (subunidad alfa), AF102064; GenBank nos: AAC98385 (subunidad beta), AF102064, GenBank nos: AAC98386 (subunidad gamma), AF102064). Otras dial deshidratasas apropiadas incluyen, pero sin limitarse a, dial deshidratasas dependientes de B12 disponibles en *Salmonella typhimurium* (GenBank nos: AAB84102 (subunidad grande), AF026270; GenBank nos: AAB84103 (subunidad media), AF026270, GenBank nos: AAB84104 (subunidad pequeña), AF026270); y *Lactobacillus collinoides* (GenBank nos: CAC82541 (subunidad grande), AJ297723; GenBank nos: CAC82542 (subunidad media); AJ297723; GenBank nos: CAD01091 (subunidad pequeña), AJ297723); y enzimas procedentes de *Lactobacillus brevis* (en particular las cepas CNRZ 734 y CNRZ 735; Speranza, et al., J. Agric. Food Chem. 45:3476-3480, 1997) y secuencias de nucleótido que codifican las correspondientes enzimas. Los métodos de aislamiento génico de dial deshidratasa se conocen bien en la técnica (por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.686.276).

La expresión "piruvato descarboxilasa" se refiere a una enzima que cataliza la descarboxilación de ácido pirúvico hasta acetaldehído y dióxido de carbono. Las piruvato deshidrogenasas se conocen por medio del número EC 4.1.1.1. Estas enzimas se encuentran en un número de levaduras, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank nos: CAA97575, CAA97705, CAA97091).

Se apreciará que las células de hospedador que comprenden un mecanismo biosintético de isobutanol tal y como se proporciona en la presente memoria pueden además comprender una o más modificaciones adicionales. La solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2009/0305363 divulga una mayor conversión de piruvato en acetolactato por medio de estudio técnico de levaduras para la expresión de una acetolactato sintasa de citosol localizado y la eliminación sustancial de la actividad de piruvato descarboxilasa. En algunas realizaciones, las células de hospedador comprenden modificaciones para reducir la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y/o la interrupción en al menos un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad piruvato descarboxilasa o una interrupción en al menos un gen que codifica un elemento regulador que controla la expresión génica de piruvato descarboxilasa como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2009/0305363 (incorporada en la presente memoria por referencia), modificaciones para una células de hospedador que proporciona un mayor flujo de carbono a través del mecanismo de Entner-Doudoroff o reducir el equilibrio de equivalentes como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2010/0120105. Otras modificaciones incluyen la integración de al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido que cataliza una etapa en el mecanismo biosintético de que utiliza piruvato. Otras modificaciones incluyen al menos una eliminación, mutación y/o sustitución en un polinucleótido endógeno que codifica un polipéptido que tiene actividad acetolactato reductasa. Las modificaciones adicionales incluyen la eliminación, mutación y/o sustitución en un polinucleótido endógeno que codifica un polipéptido que tiene actividad deshidrogenasa y/o aldehído oxidasa. En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad aldehído deshidrogenasa en *ALD6* de *Saccharomyces cerevisiae* o uno de sus homólogos. Una modificación genética tiene el efecto de reducir la represión de glucosa en la que la

célula de hospedador de producción de levadura *pdC* se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2011/0124060, incorporada por referencia en la presente memoria. En algunas realizaciones, la piruvato descarboxilasa, que se elimina o se infra-regula, se escoge entre el grupo que consiste en: *PDC1*, *PDC5*, *PDC6* y sus combinaciones. En algunas realizaciones, las células de hospedador contienen una eliminación o infra-regulación de un polinucleótido que codifica un polipéptido que cataliza la conversión de gliceraldehído-3-fosfato en glicerato 1,3-bifosfato. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza esta reacción es gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Determinadas proteínas apropiadas que tienen capacidad para catalizar el sustrato indicado para producir conversiones se describen en la presente memoria y otras proteínas apropiadas se proporcionan en la técnica. Por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. Nos. de publicación 2008/0261230, 2009/0163376 y 2010/0197519 describen acetohidroxi ácido isomeroeductasas; la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2010/0081154 describe dihidroxiácido deshidratasa; una alcohol deshidrogenasa se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de publicación 2009/0269823.

Se comprenderá por parte del experto en la técnica que muchos niveles de identidad de secuencia son útiles a la hora de identificar polipéptidos de otras especies, en los que dichos polipéptidos tienen una función igual o similar o una actividad y son apropiados para su uso en los microorganismos recombinantes descritos en la presente memoria. Los ejemplos útiles de identidades en porcentaje incluyen, pero sin limitarse a, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o cualquier porcentaje entero de 75% a 100% puede ser útil en la descripción de la presente invención tal como 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

Las técnicas de clonación molecular y de AND recombinante convencionales usadas en la presente memoria se conocen en la técnica y se describen por parte de Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) (en lo sucesivo "Maniatis"); y por parte de Silhavy, T.J., Bannan, M.L., y Enquist, L.W., *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984); y por parte de Ausubel, F.M., et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987). Los métodos adicionales usados en la presente memoria están en *Methods in Enzymology*, Volumen 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology* (Parte A, 2004, Christine Guthrie y Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, CA).

Los métodos para aumentar o reducir la expresión génica de los genes diana anteriores se conocen bien por parte del experto en la técnica. Los métodos de expresión génica en levaduras se conocen bien en la técnica como se describe, por ejemplo, en *Methods in Enzymology*, Volumen 194, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology* (Parte A, 2004, Christine Guthrie y Gerald R. Fink (Eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, Calif.). Por ejemplo, los métodos para aumentar la expresión génica incluyen aumentar el número de genes que se integran en el genoma o en los plásmidos que expresan la proteína diana, y usar un promotor que se exprese de manera más elevada que el promotor natural. Los promotores que pueden ligarse de forma operativa en la estructura del gen quimérico para la expresión incluyen, por ejemplo, promotores constitutivos *FBA1*, *TDH3*, *ADH1* y *GPM1*, y los promotores inducibles *GAL1*, *GAL10* y *CUP1*. Los terminadores transcripcionales apropiados que se pueden usar en una estructura de gen quimérico para expresión incluyen, pero sin limitarse a, *FBA1t*, *TDH3t*, *GPM1t*, *ERG10t*, *GAL1t*, *CYC1t* y *ADH1t*.

Los promotores apropiados, terminadores transcripcionales y regiones de codificación pueden clonarse en vectores de lanzadera de levadura-*E. coli* y se pueden transformar en células de levadura. Estos vectores permiten la propagación en cepas tanto de *E. coli* como de levadura. Normalmente, el vector contiene un marcador que se puede escoger y secuencias que permiten la integración cromosómica o la replicación autónoma en el hospedador desedo. Los plásmidos usados en las levaduras son, por ejemplo, vectores lanzadera *pRS423*, *pRS424*, *pRS425* y *pRS426* (American Type Culture Collection, Rockville, Md.), que contienen un origen de replicación de *E. coli* (por ejemplo, *pMB1*), un origen de levadura 2μ de replicación y un marcador para la selección nutricional. La selección de marcadores para estos cuatro vectores son *HIS3* (vector *pRS423*), *TRP1* (vector *pRS424*), *LEU2* (vector *pRS425*) y *URA3* (vector *pRS426*). La construcción de vectores de expresión se puede llevar a cabo bien por medio de técnicas de clonación molecular convencionales en *E. coli* o por medio de un método de recombinación con reparación de huecos en levaduras.

Aunque se han descrito diversas realizaciones de la presente invención anteriormente, debería comprenderse que se han presentado únicamente a modo de ejemplo, y no de limitación. Resulta evidente para la persona experta en la técnica relevante que se pueden llevar a cabo diversos cambios en la forma y detalle. De este modo, la amplitud y alcance de la presente invención no deberían limitarse únicamente a las realizaciones a modo de ejemplo descritas anteriormente, pero deberían únicamente estar de acuerdo con las reivindicaciones.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva son indicativos del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la invención de forma adicional. Debería entenderse que, aunque los siguientes ejemplos impliquen maíz como materia prima, se pueden usar otras fuentes de biomasa como materias primas.

5 Tal y como se usa en la presente memoria, el significado de las abreviaturas usadas es el siguiente: "g" significa gramo(s), "kg" significa kilogramo(s), "l" significa litro(s), "ml" significa mililitro(s), "ml/l" significa mililitro(s) por litro, "ml/min" significa mililitro(s) por minuto, "DI" significa desionizado, "uM" significa microméetro(s), "nm" significa nanometro(s), "w/v" significa peso/volumen, "rpm" significa revoluciones por minuto, "°C" significa grado(s) Celsius, y "slpm" significa litro(s) normal por minuto. La siguiente descripción de las realizaciones específicas también revela
10 completamente la naturaleza general de la invención que otros pueden, mediante la aplicación del conocimiento dentro de la experiencia en la técnica, modificar fácilmente y/o adaptar para diversas aplicaciones tales como realizaciones específicas, sin experimentación excesiva, sin apartarse del concepto general de la presente divulgación.

Ejemplo 1

Preparación del Macerado de Maíz

15 Se prepararon aproximadamente 100 kg de macerado de maíz licuado en tres lotes individuales usando una caldera de resina de vidrio con camisa de 30 l. Se ajustó la caldera con agitación mecánica, control de temperatura y control de pH. El protocolo usado para los tres lotes fue el siguiente: (a) mezcla de maíz molido con agua corriente (30% n peso de maíz en base seca), (b) calentamiento de la suspensión hasta 55°C al tiempo que se agita, (c) ajuste de pH de la suspensión en 5,8 bien con NaOH o bien con H₂SO₄, (d) ajuste de alfa-amilasa (0,02% en peso sobre una base de maíz seco), (e) calentamiento de la suspensión hasta 85°C, (f) ajuste del pH en 5,8, (g) mantenimiento de la suspensión en 85°C durante 2 horas al tiempo que mantenía el pH en 5,8, y (h) enfriamiento de la suspensión hasta 25°C.
20

El maíz usado fue maíz de grano completo amarillo de Pioneer (3335). Se molió en un molino de martillos usando un tamiz de 1 mm. Se midió el contenido de humedad del maíz molido para que fuera de 12% en peso y se midió el contenido de almidón del maíz molido que fue de 71,4% en base de maíz seco. La enzima alfa-amilasa fue Liquozyme® SC DS disponible en Novozymes (Franklinton, NC). Las cantidades totales de ingredientes usados para los tres lotes combinados fueron: 33,9 kg de maíz molido (12% de humedad), 65,4 kg de agua corriente y 0,006 kg de Liquozyme® SC DS. Se añadieron un total de 0,297 kg de NaOH (17% en peso) para controlar el pH. No se precisó H₂SO₄. La cantidad total de macerado de maíz licuado recuperado a partir de los tres lotes de 30 l fue de 99,4 kg.
25
30

Ejemplo 2

Retirada de Sólidos

Se retiraron los sólidos del macerado producido en el Ejemplo 1 por medio de centrifugación en una centrífuga de piso grande que contenía seis botellas de 1 l. Se centrifugaron 73,4 kg de macerado a 8000 rpm durante 20 minutos a 25°C, dando como resultado 44,4 kg de fracción centrifugada y 26,9 de torta húmeda. Se determinó que la fracción centrifugada contenía < 1% en peso de sólidos suspendidos, y la torta húmeda contenía aproximadamente 18% en peso de sólidos suspendidos. Esto implica que el macerado licuado original contenía aproximadamente 7% en peso de sólidos suspendidos. Esto es coherente con la carga de maíz y el contenido de almidón del maíz usado asumiendo que la mayoría del almidón se licuó. Si todo el almidón se licuó, los 44,4 kg de fracción centrifugada recuperados directamente de la centrífuga tendrían aproximadamente 23% en peso de oligosacáridos disueltos (almidón licuado). Se añadieron aproximadamente 0,6 kg de isobutanol a 35,4 kg de fracción centrifugada para la conservación. Los 36,0 kg resultantes de fracción centrifugada, que contenían 1,6% en peso de isobutanol, se usaron como disolución de reserva.
35
40

Ejemplo 3

45 Retirada de Aceite de Maíz mediante Retirada de los Sólidos No Disueltos

Este ejemplo demuestra el potencial para retirar y recuperar aceite de maíz a partir de macerado de maíz por medio de la retirada de los sólidos no disueltos antes de la fermentación. La eficacia del disolvente de extracción se puede ver comprometida si se diluye con aceite de maíz. La reducción del coeficiente de partición del disolvente se debe minimizar en un proceso de fermentación extractivo con el fin de que la extracción líquido-líquido sea un método de separación viable para llevar a la práctica en situ la retirada de producto (ISPR).
50

Se prepararon aproximadamente 1000 g de macerado de maíz licuado en una caldera de resina con camisa de vidrio de 1 l. La caldera se ajustó con agitación mecánica, control de temperatura y control de pH. Se usó el siguiente protocolo: se mezcló maíz molido con agua corriente (26% en peso de maíz en base seca), se calentó la suspensión a 55°C al tiempo que se agitaba, se ajustó el pH a 5,8 bien con NaOH o bien con H₂SO₄, se añadió alfa-amilasa (0,02% en peso en base de maíz seco), se continuó el calentamiento a 85°C, de ajustó el pH a 5,8, se mantuvo a 85°C durante 2 horas al tiempo que se mantenía el pH en 5,8, se enfrió hasta 25°C. El maíz usado fue
55

maíz de grano completo amarillo procedente de Pioneer (3335). Se molió en un molino de martillos usando un tamiz de 1 mm. Se midió el contenido de humedad del maíz molido para que fuera de 11,7% en peso y se midió el contenido de almidón del maíz molido que fue de 71,4% en base de maíz seco. La enzima alfa-amilasa fue Liquozyme® SC DS disponible en Novozymes (Franklinton, NC). Las cantidades totales de ingredientes usados fueron: 294,5 g de maíz molido (11,7% de humedad), 705,5 g de agua corriente y 0,059 g de Liquozyme® SC DS. Se añadió N₂O (4,3 g) para diluir la enzima, y se añadieron un total de 2,3 g de disolución NaOH de 20% para controlar el pH. Se recuperaron aproximadamente 952 g de macerado. Nótese que existen pérdidas debidas a la adherencia del macerado a las paredes de la caldera y las botellas de CF.

Se centrifugó el macerado de maíz licuado a 5000 rpm (7260 gs) durante 30 minutos a 40°C para retirar los sólidos no disueltos de la disolución acuosa de oligosacáridos. La retirada de los sólidos por medio de centrifugación también dio como resultado la retirada del aceite de maíz libre en forma de fase líquida orgánica separada sobre la parte superior de la fase acuosa, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 12. Se recuperaron aproximadamente 1,5 g de aceite de maíz a partir de la fase orgánica que flotaba sobre la parte superior de la fase acuosa mostrada en la Figura 9. Se determinó por medio de extracción con hexano que el maíz molido usado para producir el macerado licuado contenía aproximadamente 3,5% de aceite de maíz en base de maíz seco. Esto corresponde a aproximadamente 9 g de aceite de maíz alimentado al proceso de licuefacción con el maíz molido.

Se recuperó aproximadamente 1 g de aceite de maíz de la fase orgánica que flotaba sobre la parte superior de la fase acuosa. Se recuperaron aproximadamente 617 g de disolución de almidón licuado dejando aproximadamente 334 g de torta húmeda. La torta húmeda contenía la mayoría de los sólidos no disueltos que estuvieron en el macerado licuado. La disolución de almidón licuada contenía aproximadamente 0,2% en peso de sólidos no disueltos. La torta húmeda contenía aproximadamente 21% en peso de sólidos no disueltos. La torta húmeda se lavó con 1000 g de agua corriente para retirar los oligosacáridos que todavía estaban en la torta. Esto se hizo por medio de mezcla de la torta con agua para formar una suspensión. La suspensión se centrifugó después en las mismas condiciones usadas para centrifugar el macerado original con el fin de recuperar los sólidos lavados. La retirada de los sólidos lavados por medio de centrifugación también dio como resultado la retirada de cierto aceite de maíz adicional en forma de fase líquida orgánica separada sobre la parte superior de la fase acuosa. El aceite de maíz se recuperó a partir de la fase orgánica que flotaba sobre la parte superior de la fase acuosa.

Los sólidos húmedos se lavaron dos veces más usando 1000 g de agua corriente cada una de las veces para retirar esencialmente toda el almidón licuado. Los sólidos lavados finales se lavaron en un horno a vacío durante la noche a 80°C y aproximadamente 508 mm (20 pulgadas) de vacío de Hg. La cantidad de aceite de maíz resultante en los sólidos secos, presumiblemente todavía en el germen, se determinó por medio de extracción con hexano. Se midió que una muestra de 3,60 g de sólidos relativamente secos (aproximadamente 2% en peso de humedad) contenían 0,22 g de aceite de maíz. Este resultado corresponde a 0,0624 g de aceite de maíz/g de sólidos secos. Esto fue para los sólidos lavados, lo que significa que no hubo oligosacáridos residuales en los sólidos húmedos. Tras centrifugar el maíz licuado para separar la fase de aceite de maíz libre y la disolución acuosa de los oligosacáridos a partir de la torta húmeda, se determinó que aproximadamente 334 g de torta húmeda contenían aproximadamente 21% en peso de sólidos no disueltos restantes. Esto corresponde a la torta húmeda que comprende aproximadamente 70,1 g de sólidos no disueltos. En 0,0624 g de maíz sólido/g de sólidos secos, los sólidos de la torta húmeda deberían contener aproximadamente 4,4 g de aceite de maíz.

Ejemplo 4

Métodos Generales para la Fermentación

Crecimiento en Matraz Seminal

Se sometió a estudio técnico una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para producir isobutanol a partir de una fuente de hidratos de carbono, eliminación pdc1, pdc5 y pdc6, y se sometió a cultivo hasta 0,55-1,1 g/l de dwc (OD600 1,3-2,6 - Thermo Helios α Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts) en matraces seminales a partir de un cultivo congelado. Se sometió el cultivo a crecimiento a 26°C en un incubador que rotaba a 300 rpm. Se almacenó previamente el cultivo congelado a -80°C. La composición del primer medio de matraz seminal fue:

3,0 g/l de dextrosa,

3,0 g/l de etanol, anhidro

3,7 g/l de ForMedium™ Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: sin HIS, sin URA (N.º Secuencia DSCK162CK)

6,7 g/l de Base Nitrogenada de Levadura Difco sin amino ácidos (N.º. 291920).

Se transfirieron doce mililitros del primer cultivo de matraz seminal a un matraz de 2 l y se cultivaron a 30°C en un incubador rotatorio a 300 rpm. El segundo matraz seminal tuvo 220 ml del siguiente medio:

30,0 g/l de dextrosa,

5,0 g/l de etanol, anhidro

3,7 g/l de ForMedium™ Synthetic Complete Amino Acid (Kaiser) Drop-Out: sin HIS, sin URA (N.º Secuencia DSCK162CK)

6,7 g/l de Base Nitrogenada de Levadura Difco sin amino ácidos (N.º. 291920)

5 Tampón MES 0,2 M valorado hasta pH 5,5-6,0.

Se sometió el cultivo a desarrollo hasta 0,55-1,1 g/l dcw (OD600 1,3-2,6). Se añadió una adición de 30 ml de una disolución que contenía 200 g/l de peptona y 100 g/l de extracto de levadura a esta concentración de células. Posteriormente, se añadió una adición de 300 ml de Cognis esterilizado en filtro 0,2 µM, alcohol oleílico de 90-95% al matraz. El cultivo continua desarrollándose hasta > 4 g/l dcw (OD600 > 10) antes de la recolección y adición a la fermentación.

10

Preparación de la Fermentación

Preparación del Fermentador Inicial

Se introdujo macerado licuado con o sin sólidos (fracción centrifugada) en un fermentador de 2 l con camisa de vidrio (Sartorius AG, Goettingen, Alemania). Se calibró una sonda de pH (Hamilton Easyferm Plus K8, número de parte: 238627, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suiza) a través del menú de Calibración de la Torre de Control DCU-3 Sartorius. Se calibró el cero a pH = 7. Se calibró el intervalo a pH =4. Después se colocó la sonda en el fermentador, a través de una placa caliente de acero inoxidable. También se colocó una sonda de oxígeno disuelto (sonda de pO₂) en el fermentador a través de la placa caliente. Se unieron los tubos usados para el suministro de nutrientes, cultivo seminal, extracción de disolvente y base a la placa de cabecera y se plegaron los extremos. Se colocó el fermentador completo en un autoclave Steris (Steris Corporation, Mentor, Ohio) y se esterilizó en un ciclo líquido durante 30 minutos.

15

20

Se retiró el fermentador del autoclave y se colocó en una célula de carga. Se conectaron suministro de agua con camisa y la línea de retorno al alojamiento de agua y drenaje limpio, respectivamente. Se conectaron el agua de refrigeración del condensador y las líneas de salida de agua a un baño de temperatura de recirculación de 6 l que operaba a 7°C. La línea de purga que transfiere el gas desde el fermentador se conectó a una línea de transferencia que se conectó a un espectrómetro de masas Thermo (Prima dB, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts). Se conectó la línea del rociador a la línea de suministro de gas. El tubo para la adición de nutrientes, disolvente de extracto, cultivo seminal y base se ensambló a través de las bombas o se fijó cerrado. El material se sometió a autoclave, NaCl 0,9% peso/volumen y se drenó antes de la adición de macerado licuado.

25

30

Pos-Licuefacción de Tratamiento de Lipasa

La temperatura del fermentador se ajustó en 55°C en lugar de 30°C una vez completado el ciclo de licuefacción (Licuefacción). Se controló manualmente el pH a pH = 5,8 haciendo adiciones de bolo de ácido o base cuando resultó necesario. Se añadió una disolución de reserva de enzima de lipasa al fermentador hasta concentración final de lipasa de 10 ppm. El fermentador se mantuvo a 55°C, 300 rpm, y 0,3 slpm de atmósfera de N₂ durante > 6 horas. Una vez completado el tratamiento de lipasa se ajustó la temperatura del fermentador a 30°C.

35

Adición de Nutrientes antes de la Inoculación

Se añadieron 7,0 ml/l (volumen pos-inoculación) de etanol (graduación de 200%, anhidro) justo antes de la inoculación. Se añade triamina a 20 mg/l de concentración final justo antes de la inoculación. Se añade 100 mg/l de ácido nicotínico justo antes de la inoculación.

40

Inoculación del Fermentador

Se calibraron los fermentadores pO₂ hasta cero al tiempo que se añadió N₂ al fermentador. La sonda de pO₂ de los fermentadores se calibró hasta su intervalo con rociador de aire estéril a 300 rpm. Se inoculó el fermentador una vez que el segundo matraz seminal fue > 4 g/l dcw. Se retiró el matraz agitado del incubador/agitador durante 5 minutos permitiendo una separación de fases de fase de alcohol oleílico y la fase acuosa. Se transfirieron 55 ml de fase acuosa a una botella de inoculación estéril. Se bombeó el inoculó al interior del fermentador a través de una bomba peristáltica.

45

Adición de Alcohol Oleílico o Ácidos Grasos de Aceite de Maíz tras la Inoculación

Se añadieron 1 l/l (volumen pos-inoculación) de alcohol oleílico o ácidos grasos de aceite de maíz inmediatamente después de la inoculación.

50

Condiciones de Operación del Fermentador

El fermentador se operó a 30°C durante todas las etapas de desarrollo y producción. Se permitió que el pH

disminuyera desde un pH entre 5,7-5,9 para control el punto de referencia de 5,2 sin adición de ningún ácido. Se controló el pH para el resto de las etapas de desarrollo y producción a un pH = 5,2 sin hidróxido de amonio. Se añadió aire estéril al fermentador, a través del rociador, a 0,3 slpm para el resto de las etapas de desarrollo y producción. Se ajustó pO₂ para controlarlo a 3,0% por medio del bucle de control Sartorius DCU-3 Control Box PID, usando únicamente agitación, ajustándose el mínimo del agitador en 300 rpm y ajustándose el máximo en 2000 rpm. Se suministró glucosa a través de sacarificación simultánea y fermentación del macerado de maíz licuado por medio de adición de α-amilasa (glucoamilasa). Se mantuvo el exceso de glucosa (1-50 g/l) con tal de que el almidón estuviese disponible para la sacarificación.

Ejemplo 5

10 Torta Húmeda Generada a partir de la Retirada de Sólidos del Macerado de Maíz Licuado

Este ejemplo demostró la recuperación de una torta húmeda y la recuperación de almidones a partir de una torta húmeda por medio de lavado de la torta dos veces con agua, de manera que se generó la torta por medio de centrifugación del macerado licuado. El macerado de maíz licuado se alimentó a una centrifuga con decantador continua para producir una corriente de fracción centrifugada (C-1) y una torta húmeda (WC-1). La fracción centrifugada fue una disolución acuosa diluida de almidón soluble relativamente libre de sólidos y la torta húmeda se concentró en sólidos en comparación con el macerado de alimentación. Se mezcló una parte de la torta húmeda con agua caliente para formar una suspensión (S-1). Se bombeó de nuevo la suspensión a través de la centrifuga de decantador para producir una fracción centrifugada con agua de lavado (C-2) y una torta húmeda lavada (WC-2). C-2 fue una disolución acuosa diluida de almidón soluble relativamente libre de sólidos. La concentración de almidón soluble en C-2 fue menor que la concentración de almidón soluble en la fracción centrifugada producida a partir de la separación del macerado. La fase líquida que se mantuvo en WC-2 fue más diluida en almidón que el líquido de la torta húmeda producida a partir de la separación del macerado. Se mezcló la torta húmeda lavada (WC-2) con agua caliente para formar una suspensión (S-2). La relación de agua introducida con respecto a la cantidad de almidón soluble en la torta húmeda introducida fue la misma en ambas etapas de lavado. La segunda suspensión de lavado se bombeó de nuevo a través de un centrifuga de decantador para producir una segunda fracción centrifugada de lavado (C-3) y una torta húmeda (WC-3) que se había lavado dos veces. C-3 fue una disolución acuosa diluida de almidón soluble relativamente libre de sólidos. La concentración de almidón soluble en C-3 fue menor que la concentración de almidón soluble en la fracción centrifugada producida en la primera etapa de lavado (C-2), y de este modo la fase líquida mantenida en WC-3 (segunda torta húmeda lavada) fue más diluida en almidón que WC-2 (primer torta húmeda lavada). El almidón soluble total de las dos fracciones centrifugadas lavadas (C-2 y C-3) es el almidón que se recuperó y pudo reciclarse de nuevo hasta la licuefacción. El almidón soluble del líquido mantenido en la torta húmeda lavada final es mucho menor que en la torta húmeda producida en la separación original del macerado.

Producción de Macerado de Maíz Licuado

35 Se produjeron aproximadamente 3,79 m³ (1000 galones) de macerado de maíz licuado en un sistema de licuefacción de molienda en seco y continuo que consistió en molino de martillos, mezclador de suspensión, tanque de suspensión y tanque de licuefacción. Se equiparon los reactores con agitación mecánica, control de temperatura y control de pH usando bien amoníaco o bien ácido sulfúrico. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Tamaño del tamiz de molino de martillos: 0,28 cm (7/64")

Tasas de Alimentación al Mezclador de Suspensión

- Maíz Molido: 254,5 kg/h (560 lbm/h) (14,1% en peso de humedad)
- Agua de Proceso: 7,54 kg/min (16,6 lbm/min) (200 F)
- Alfa-amilasa: 61 g/h (Genecor: Spezyme® ALPHA).

40 Condiciones del Tanque de Agitación:

- Temperatura: 85°C (185 °F)
- pH: 5,8
- Tiempo de Residencia: 0,5 horas
- Carga de Maíz Seco: 31% en peso
- Carga de Enzima: 0,028% en peso (base de maíz seco)

Condiciones del Tanque de Licuefacción:

ES 2 617 970 T3

- Temperatura: 85°C (185 °F)
- pH: 5,8
- Tiempo de Residencia: aproximadamente 3 horas
- Sin enzima adicional añadida.

5 La tasa de producción de macerado de maíz licuado fue de aproximadamente 3 gpm. El contenido de almidón del maíz molido se midió y fue de aproximadamente 70% en peso en base de maíz seco. Los sólidos totales (TS) del macerado licuado fueron de aproximadamente 31% en peso, y los sólidos suspendidos totales (TSS) fueron de aproximadamente 7% en peso. La fase líquida contenía aproximadamente 23-24% en peso de almidón licuado tal y como se mide por medio de HPLC (oligosacáridos solubles).

Se centrifugó el macerado licuado en una centrífuga con decantador continuo (modelo make) con las siguientes condiciones:

- Velocidad del recipiente: 5000 rpm (aproximadamente 3600 g's)
- Velocidad diferencial: 15 rpm
- Diámetro de Weir: 185 mm (placa de weir retirada)
- Tasa de Alimentación: varió de 5-20 gpm.

10 Se produjeron aproximadamente 3,22 m³ (850 galones) de fracción centrifugada y aproximadamente 1400 lbm (636,4 kg) de torta húmeda por medio de centrifugación del macerado. Se midieron los sólidos totales en la torta húmeda y fueron aproximadamente 46,3% (suspendidos + disueltos) por medio de equilibrio de humedad. Sabiendo que la fase líquida contenía aproximadamente 23% en peso de almidón soluble, se estimó que los sólidos totales suspendidos en la torta húmeda fueron de aproximadamente 28% en peso. Se estimó que la torta húmeda contenía aproximadamente 12% de almidón soluble que estuvo presente en el macerado licuado antes de la operación de centrífuga.

15 Ejemplo 6

Análisis de lípidos

20 Se llevó a cabo el análisis de lípidos por medio de conversión de diversas clases de compuestos que contienen ácidos grasos en éster metílicos de ácido graso ("FAMES") por medio de transesterificación. Se sometieron los glicéridos y fosfolípidos a transesterificación usando metóxido de sodio en metanol. Se sometieron los glicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres a transesterificación usando cloruro de acetilo en metanol. Los FAMES resultantes se analizaron por medio de cromatografía de gases usando un Agilent 7890 GC equipado con una columna de 30 m x 0,25 mm (d.i.) OMEGAWAX™ (Supelco, SigmaAldrich, S. Louis, MO) tras dilución en tolueno/hexano (2:3). Se aumentó la temperatura del horno de 160°C a 200°C a 5°C/minuto, después de 200°C a 250°C (se mantuvo durante 10 minutos) a 10°C/min. Se identificaron los picos FAME registrados por medio de análisis GC por sus tiempos de retención, cuando se compararon con los de ésteres metílicos conocidos (MEs), y se cuantificaron por medio de comparación de las áreas de pico FAME con las del patrón interno (C15:0 triglicérido, tomadas a través del procedimiento de transesterificación con la muestra) de cantidad conocida. De este modo, la cantidad aproximada (mg) de cualquier FAME de ácido graso ("mg de FAME") se calcula de acuerdo con la fórmula: (área del pico FAME para el ácido graso especificado/área del pico FAME 15:0) * (mg del patrón interno FAME C15:0). El resultado de FAME se puede corregir después hasta mg del correspondiente ácido graso dividiendo entre el factor de conversión de peso molecular apropiado de 1,052. Todos los patrones internos y de referencia se obtuvieron a partir de Nu-Check Prep, Inc.

35 Los resultados de ácido graso obtenidos para las muestras transesterificadas usando metóxido de sodio en metanol se convierten en los correspondientes niveles de triglicérido multiplicando por el factor de conversión de peso molecular de 1,045. Generalmente, los triglicéridos representan aproximadamente de 80% a 90% de los glicéridos de los estudios de las muestras para este ejemplo, siendo el resto diglicéridos. Generalmente, el contenido de monoglicéridos y fosfolípidos es despreciable. Los resultados de ácidos grasos obtenidos para una muestra sometida a transesterificación usando cloruro de acetilo en metanol se corrigen para el contenido de glicérido restando los ácidos grasos determinados para la misma muestra usando el procedimiento de metóxido de sodio. El resultado es el contenido de ácido graso de la muestra.

45 La distribución del contenido de glicéridos (monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos) se determina usando cromatografía en capa fina. Se aplica puntualmente una disolución del aceite disuelto en cloroformo/metanol 6:1 cerca de la parte inferior de la placa de vidrio pre-revestida con gel de sílice. Posteriormente, se somete la mancha a cromatografía usando un sistema de disolvente de hexano/éter dietílico/ácido acético 70:30:1. Los puntos separados corresponden a monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos y después se detectan por medio de tinción de la placa con vapor de yodo. Los puntos posteriormente se raspan, se someten a transesterificación

usando el cloruro de acetilo en el procedimiento de metanol, y se analizan por medio de cromatografía de gases. Las relaciones de áreas totales de pico para cada punto con respecto a las áreas totales de pico para todos los puntos son la distribución de diversos glicéridos.

Ejemplo 7

5 Sólidos Procedentes de Residuos Sólidos de Destilación y Extracción con Dispositivo de Eliminación de Disolvente para Recuperar Ácidos Grasos, Ésteres y Triglicéridos

Este ejemplo ilustra la retirada de sólidos a partir de residuo sólido de destilación y extracción con dispositivo de eliminación de disolvente para recuperar los ácidos grasos, ésteres y triglicéridos a partir de los sólidos. Durante la fermentación, los sólidos se separan a partir del residuo sólido de destilación completo y se alimentan en un dispositivo de eliminación de disolvente en el que se ponen en contacto con 1,1 toneladas/h de vapor. Los caudales para la torta húmeda de residuo sólido de destilación completo (alimentación de extractor), disolvente, micela del extractor y sólidos de descarga del extractor se muestran en la Tabla 1. Los valores de la Tabla son toneladas cortas/h (907,2 kg/h).

Tabla 1

	Sólidos procedentes de residuo sólido de destilación completo t corta/h (kg/h)	Disolvente t corta/h (kg/h)	Micela t corta/h (kg/h)	Sólidos de descarga del extractor t corta/h (kg/h)
Ácidos grasos	0,099 (89,81)	0 (0)	0,0982 (89,1)	0,001 (0,91)
Sólidos no disueltos	17,857 (16199,8)	0 (0)	0,0009 (0,8)	17,856 (16198,9)
Ésteres butílicos de ácido graso	2,866 (2600)	0 (0)	2,837 (2573,7)	0,0287 (26)
Hexano	0 (0)	11,02 (9997,3)	10,467 (9495,7)	0,555 (503,5)
Triglicérido	0,992 (900)	0 (0)	0,982 (890,8)	0,0099 (8,98)
Agua	29,762 (27000)	0 (0)	29,464 (26729,7)	0,297 (269,4)

15 Se alimentan los sólidos existentes en el dispositivo de secado. El vapor que abandona el dispositivo de eliminación de disolvente contiene 0,55 t/h de hexano y 1,102 t/h de agua. Esta corriente se condensa y se alimenta en un decantador. La fase rica en agua que abandona el decantador contiene aproximadamente 360 ppm de hexano. Esta corriente se alimenta en una columna de destilación en la que se retira el hexano de la corriente rica en agua. La corriente rica en hexano que abandona la parte superior de la columna de destilación se condensa y se alimenta en el decantador. La corriente rica en orgánicos que abandona el decantador se alimenta en una columna de destilación. El vapor (11,02 t/h) se alimenta en la parte inferior de la columna de destilación. La composición de los productos de cabecera y parte inferior para esta columna se muestran en la Tabla 2. Los valores de la tabla están en t/h.

Tabla 2

	Parte Inferior	Cabecera
Ácidos grasos	0,0981	0
Ésteres butílicos de ácido graso	2,8232	0
Hexano	0,0011	11,12
Triglicérido	0,9812	0
Agua	0	11,02

25 Ejemplo 8

Recuperación de Sub-productos del Macerado

Este ejemplo ilustra la recuperación de sub-productos del macerado. Se separó el aceite de maíz a partir del macerado en las condiciones descritas en el Ejemplo 3 con la excepción de que se usó una centrífuga de tricantador (Flottweg Z23-4 diámetro de recipiente, 230 mm, relación de longitud con respecto a diámetro 4:1) con las siguientes condiciones:

30

ES 2 617 970 T3

- Velocidad del Recipiente:	5000 rpm
- Velocidad Diferencial:	10 rpm
- Tas de Alimentación:	3 gpm
- Disco de Separador de Fases:	138 mm
- Ajuste del Impulsor:	144 mm

El aceite de maíz separado tuvo 81% de triglicéridos, 6% de ácidos grasos, 4% de diglicéridos y 5% de total de fosfolípidos y monoglicéridos determinado por medio de los métodos descritos en el Ejemplo 6 y cromatografía en capa fina.

5 Los sólidos separados del macerado en las condiciones descritas anteriormente tuvieron un contenido de humedad de 58%, tal y como se determinó por medio de pérdida de peso tras secado y tuvieron 1,2% de triglicéridos y 0,27% de ácidos grasos libres, tal y como se determinó por medio del método descrito en el Ejemplo 6.

10 La composición de sólidos separados del residuo sólido de destilación completo, el aceite extraído entre las etapas del evaporador, el agente de extracción de sub-productos y los Solubles de Destilador Condensados (CDS) de la Tabla 5 se calcularon asumiendo la composición del residuo sólido de destilación completo que se muestra en la Tabla 3 y las consideraciones de la Tabla 3 (separación en la centrifuga de tricantador). Los valores de la Tabla 2 se obtuvieron a partir de un modelo Aspen Plus® (Aspen Technology, Inc. Burlington, MA). Este modelo asume que el aceite de maíz no se somete a extracción a partir del macerado. Se estima que el contenido de proteínas en base seca de las células, sólidos disueltos y sólidos en suspensión es aproximadamente 50%, 22% y 35,5%, respectivamente. Se estima que la composición del agente de extracción de sub-productos contiene 70,7% de ácidos grasos y 29,3% de éster isobutílico de ácido graso en base seca.

15

Tabla 3

Componente	% en masa
Agua	57,386%
Células	0,502%
Ácidos grasos	6,737%
Ésteres isobutílicos de ácidos grasos	30,817%
Triglicérido	0,035%
Sólidos suspendidos	0,416%
Sólidos no disueltos	4,107%

Tabla 4

	Alimentación del hidrolizador	Residuo sólido de destilación fino	Sólidos
Orgánicos	99,175%	0,75%	0,08%
Agua y sólidos disueltos	1%	96%	3%
Sólidos suspendidos y células	1%	2%	97%

Tabla 5

Corriente	C. proteína	Triglicérido	FFA	FABE
Torta húmeda de residuo sólido de destilación completo	40%	traza	0,5%	2,2%
Aceite en el evaporador	0%	0,08%	16,1%	73,8%
CDS	22%	traza %	0,37%	1,71%

Ejemplo 9

20 El Ejemplo 9 proporciona un método a modo de ejemplo y un sistema que muestran combinaciones de corrientes de alimentación de proceso que siguen un proceso mostrado y como se describe en la presente memoria.

Se preparó un macerado de maíz licuado como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1, y se retiraron el aceite de maíz y los sólidos como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 2, 3 y/o 5, formando aceite de maíz y una torta húmeda. Tras la fermentación como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 4, se retiraron los sólidos, formando una torta filtrante como se describe, por ejemplo en el Ejemplo 5. Se produjeron jarabe y corrientes de alimentación de proceso de lípidos como se describe en la presente memoria. Se produjo una corriente de alimentación de proceso de ácidos grasos procedente de la hidrólisis de aceite de maíz (COFA, corriente de alimentación de proceso de ácidos grasos procedentes de hidrólisis de aceite de maíz) como se describe en la presente memoria. El porcentaje en peso seco de triglicéridos (TG), ácidos grasos (FA) y ésteres isobutílicos de COFA (FABE) se determinó para las corrientes de alimentación de proceso como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 6 y 7. También se determinaron los porcentajes de grasa bruta, la proteína bruta, lisina, fibra de detergente neutra (NDF) y fibra de detergente ácida (ADF) en peso seco y la tasa de material seco (DM) con respecto a la torta húmeda, para las corrientes de alimentación del proceso usando métodos convencionales. Además, estos valores de muestra se determinaron para tres combinaciones de corrientes de alimentación de proceso: (1) torta húmeda, torta húmeda WS, jarabe y COFA (DCP1); (2) torta húmeda, torta húmeda WS y jarabe (DCP2); y (3) aceite de maíz (65%), torta húmeda, torta húmeda WS y jarabe. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Contenidos de corriente de alimentación de proceso y combinaciones (porcentaje en base seca)

Corriente	Lípidos			Lípidos Totales					
	TG	FA	FABE	Grasa Bruta	Proteína Bruta	Lisina	NDF	ADF	Tasa de DM con respecto a torta húmeda
Aceite de maíz	89	6	0	95	0	0	--	--	
Torta húmeda	1,3	0,1	0	1,4	33,7	1,2	46	13	100
Torta húmeda WS	0	0,47	2,16	2,6	38,7	1,8	19	5	29
Lípido	0	16	74	90	0	0	--	--	5
Jarabe	0	0,4	1,7	2	21,6	0,8	4	3	108
COFA	0	71	29	100	0	0	--	--	24
DCP1	0,5	6,7	3,6	10,8	26,2	1,0	21	7	
DCP2	0,5	0,3	1,0	1,9	28,8	1,1	23	7	
DCP3	6,2	0,9	1,0	8,1	27,0	1,0	22	7	

Estos resultados muestran que las corrientes de alimentación del proceso se pueden usar para generar componentes para un pienso particular destinado a animales o mercado de pienso destinado a animales (por ejemplo, ganado, rumiantes, vacuno, animales productores de leche, porcino, caprino, ovino, aves de corral, equino, acuicultura, mercado de mascotas domésticas). Además, las combinaciones de las corrientes de proceso se pueden usar para optimizar el contenido de lípidos, grasas, proteínas o lisina para un pienso particular destinado a animales o un mercado de pienso destinado a animales.

Ejemplo 10

Conversión de COFA en FAEE y Monoacil Glicerol

Los siguientes ejemplos muestran que COFA se puede esterificar con etanol (EtOH) o con glicerol a rendimiento elevado en condiciones suaves usando una enzima inmovilizada.

Se adquirió Novozyme 435 (lipasa B de *Candida antarctica*, inmovilizada sobre resina acrílica) en Sigma Aldrich (S. Louis, Mo). Se adquirieron acetona, t-BuOH, etanol, metanol y glicerol en Sigma Aldrich (S. Louis, Mo). Para el análisis GC, el cromatógrafo de gases usado fue Hewlett Packard Serie 5890 II GC chromatogram y se usó pentaneodecanoato de metilo como patrón interno.

Conversión de COFA en FAEE

Se disolvió ácido graso de aceite de maíz (COFA, 0,25 g) en 2,0 ml de EtOH formando una fase individual. Se añadieron veinte mg de lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada sobre resina acrílica (Novozyme 435) (contiene 1,7 mg de enzima) y se incubó la suspensión durante 24 h en un agitador rotatorio (300 rpm) a 40°C en un vial de vidrio de 6 ml sellado con un tapón. La reacción se llevó prácticamente hasta terminación con 98% de COFA convertido en FAEE (éster etílico de ácido graso). El análisis GC tras 24 horas mostró una conversión de 98% de

COFA en éster etílico de ácido graso.

Conversión de COFA en monoacilglicéridos

5 Se disolvió ácido graso de aceite de maíz (COFA, 0,25 g) más 0,325 g de glicerol en 2,0 ml de acetona. Hubo una gran fase superior en la que la mayoría de los componentes se disolvieron y una pequeña fase que contenía glicerol residual. Se añadieron veinte mg de lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) inmovilizada sobre resina acrílica (Novozyme 435) (contiene 1,7 mg de enzima) y se incubó la suspensión durante 24 h en un agitador rotatorio (300 rpm) a 40°C en un vial de vidrio de 6 ml sellado con un tapón. El análisis GC de la fase superior indicó que 87% de COFA se había convertido en acil glicérido (cabía esperar que la mayoría fuese mono-acilglicérido).

Ejemplo 11

10 Conversión de COFA en FAME

Los siguientes ejemplos muestran que COFA se puede esterificar con metanol (MeOH), con EtOH y con glicerol a rendimiento elevado en condiciones suaves usando una lipasa inmovilizada.

Conversión de COFA en FAME sin Disolvente

15 A un vial de 6 ml se añadieron 500 mg de COFA (1,48 mmol), 132 µl de MeOH (3,26 mmol) y 10 mg de Novozyme 435. Se colocó la mezcla resultante en un incubador/agitador, y se dejó a 40°C durante la noche. El análisis GC de la mezcla de reacción reveló una conversión de 95%.

Adición de MeOH a la reacción de COFA→FAME

20 A un vial de 6 ml se añadieron 500 mg de COFA (1,48 mmol), 180, 240, 300 o 1320 µl de MeOH (4,44, 5,92, 7,41 y 14,82 mmol) y 10 mg de Novozyme 435. La mezcla resultante se colocó en un incubador/agitador y se dejó a 40°C durante la noche. El análisis GC de la mezcla de reacción reveló una conversión de 96-97%.

25 Aunque se han descrito anteriormente diversas realizaciones de la presente invención, debería comprenderse que se han presenta únicamente a modo de ejemplo, y no de limitación. Resulta evidente para las personas expertas en la técnica relevante que se pueden realizar diversos cambios en cuanto a forma y detalle en la presente memoria. De este modo, la amplitud y alcance de la presente invención no deberían estar limitados por ninguna de las realizaciones ejemplares descritas anteriormente, sino que debería estar definido solo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para generar co-productos de destilador para pienso destinado a animales que comprende proporcionar un proceso de producción de butanol, en el que al menos tres corrientes de alimentación de proceso se combinan para generar co-productos de destilador para pienso destinado a animales que tiene un contenido de proteínas brutas de al menos aproximadamente 20% en peso de los co-productos de destilador y en el que al menos tres corrientes de alimentación de proceso incluyen jarabe; sólidos procedentes de un macerado antes de la fermentación; y sólidos procedentes de un residuo sólido de destilación completo tras la fermentación.
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que el butanol es 1-butanol, 2-butanol, butanol terciario y/o isobutanol ya sea individualmente o en forma de sus mezclas.
- 10 3.- El método de la reivindicación 1, en el que el microorganismo es un microorganismo recombinante que está genéticamente modificado para producir butanol.
- 4.- El método de la reivindicación 1, en el que el contenido de grasa bruta de los co-productos de destilador es menor de aproximadamente 10%, basado en el peso de los co-productos de destilador.
- 15 5.- El método de la reivindicación 1, en el que el rendimiento de butanol es mayor de aproximadamente 8% en volumen.

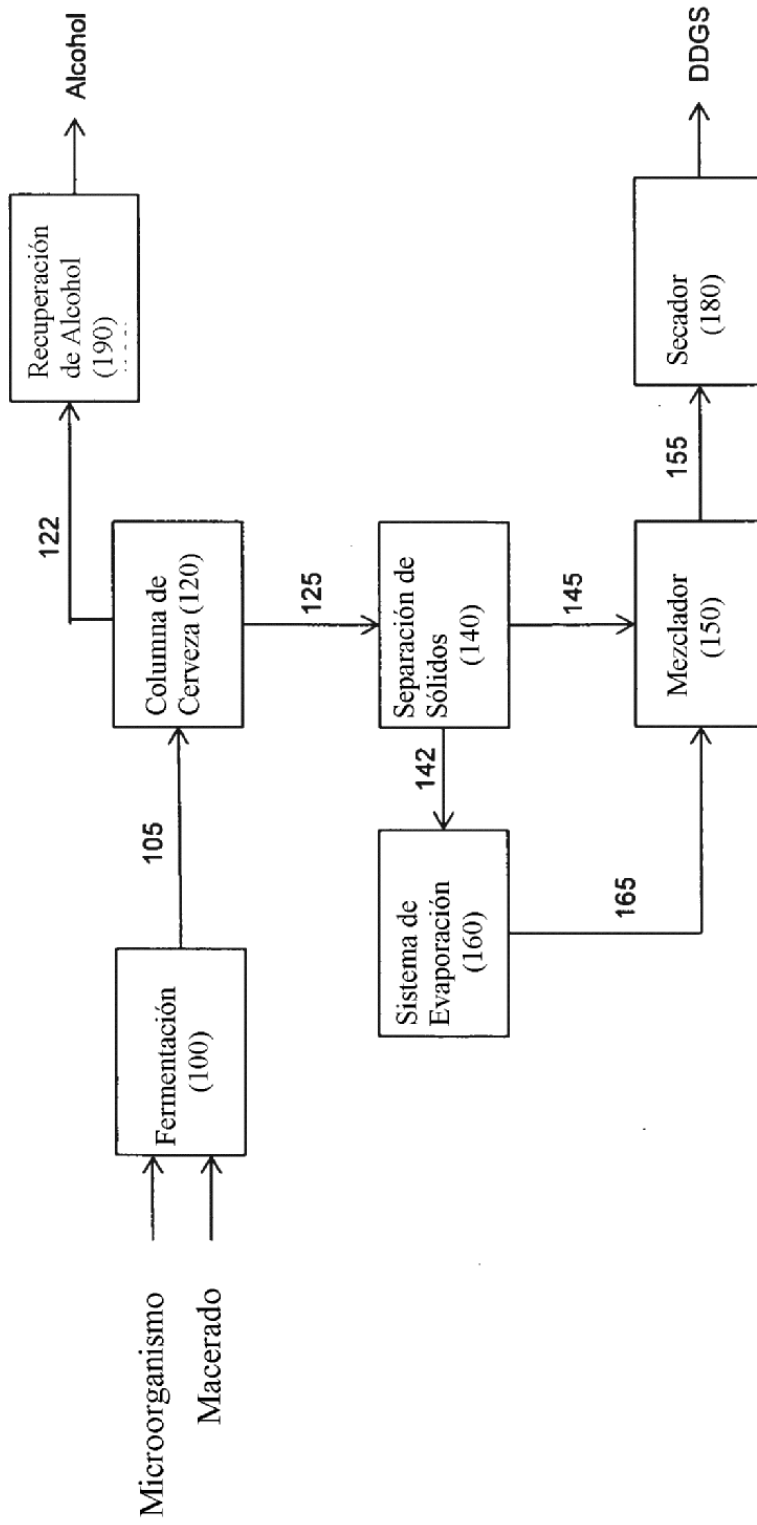


FIG. 1a

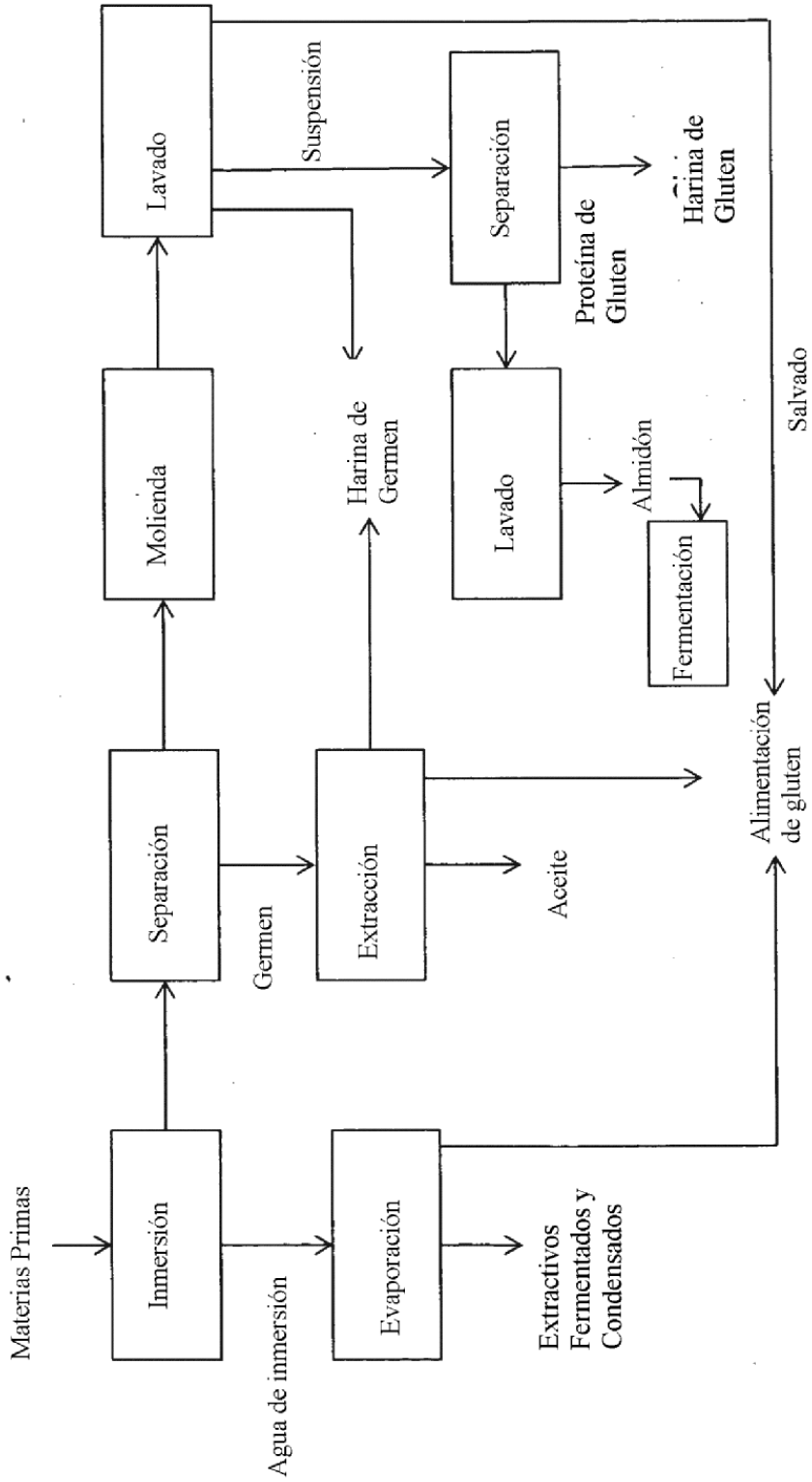


FIG. 1b

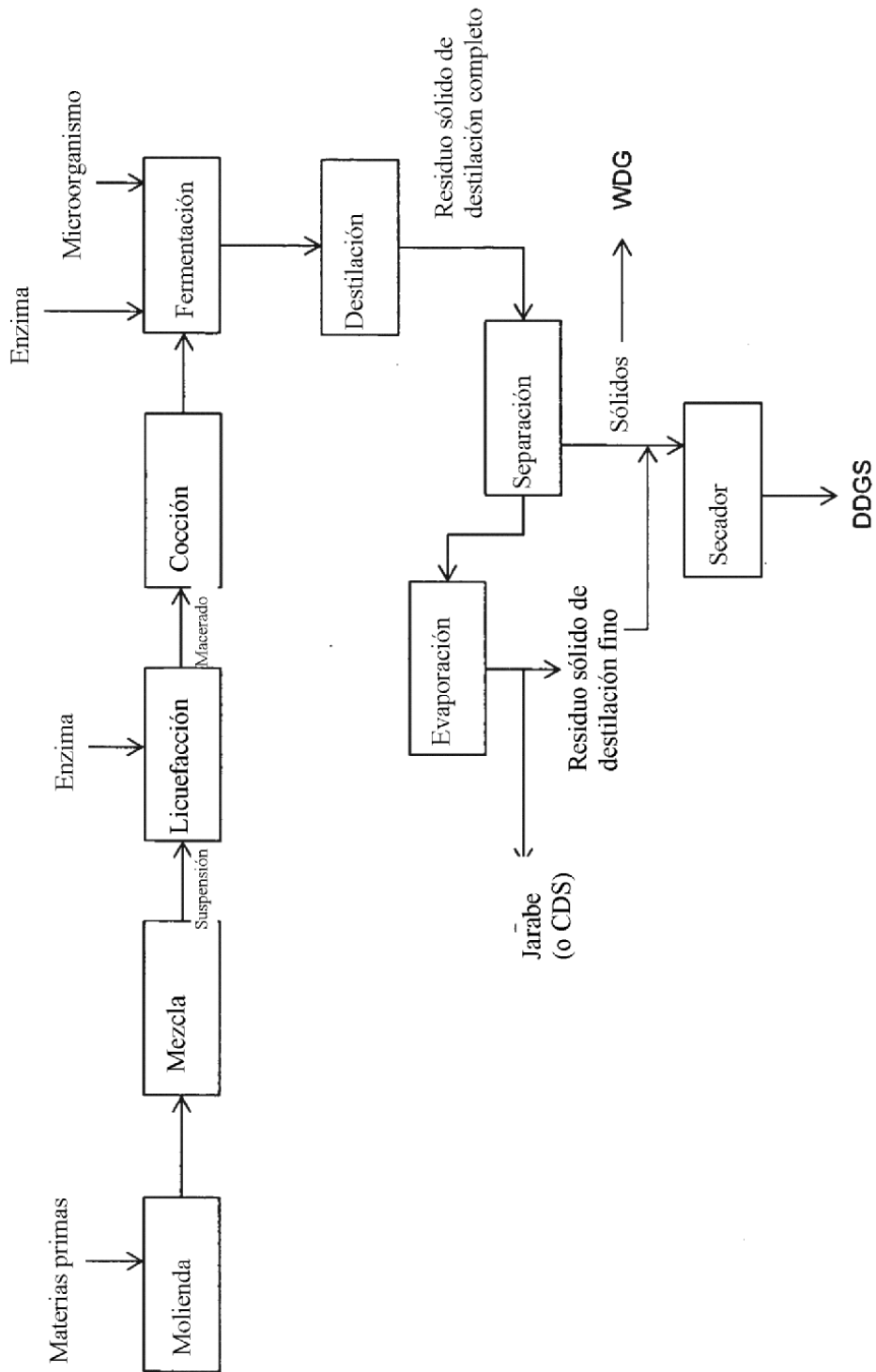


FIG. 1c

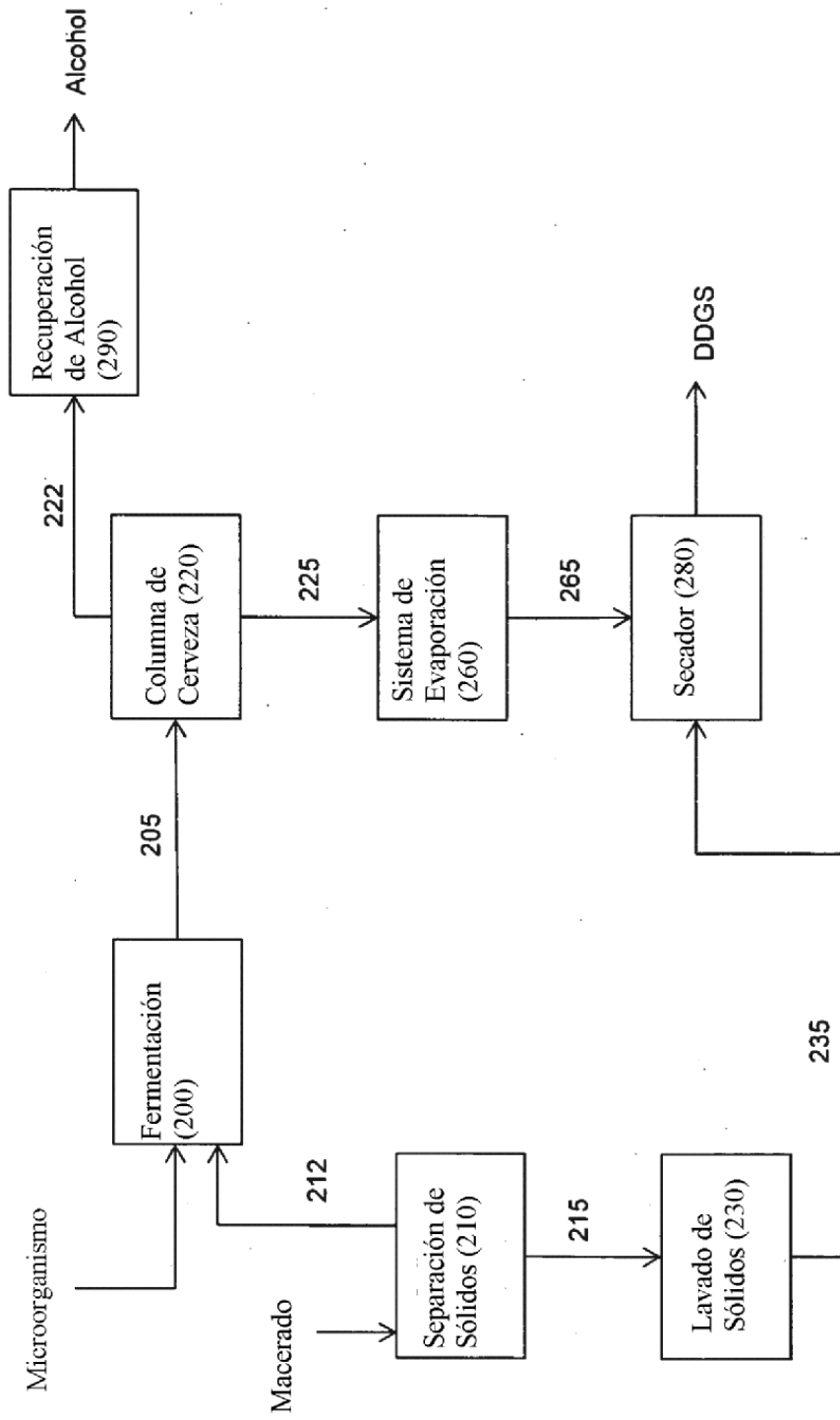


FIG. 2

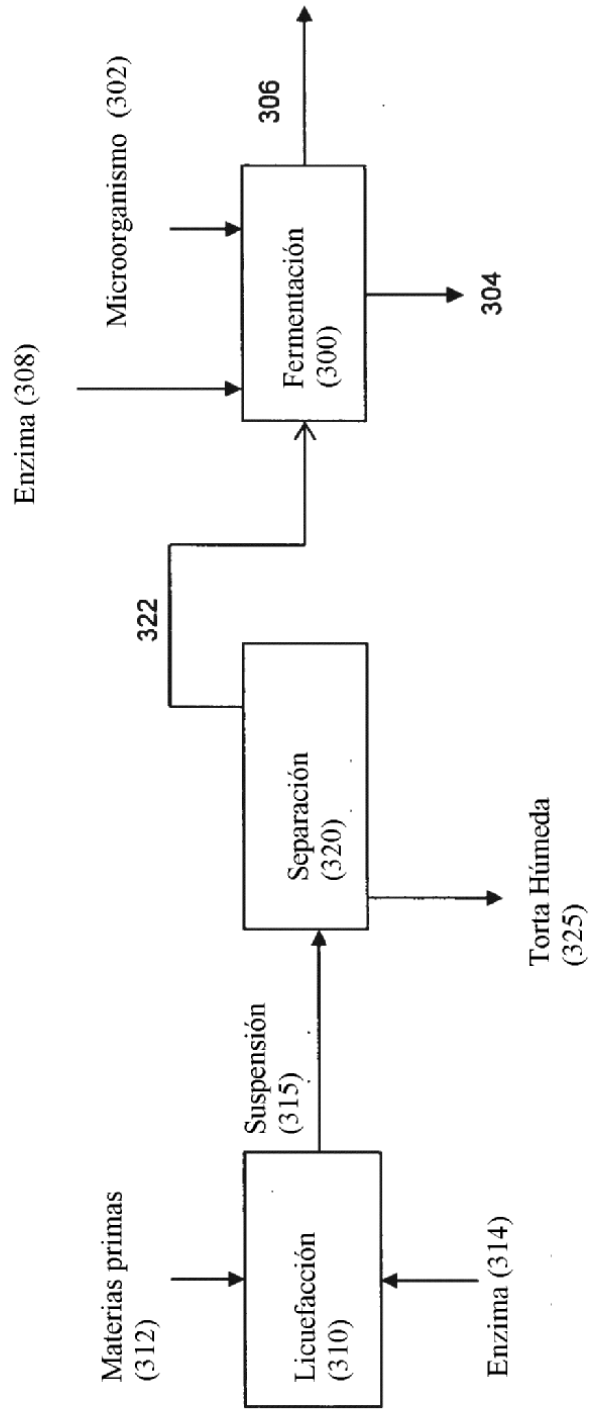


FIG. 3

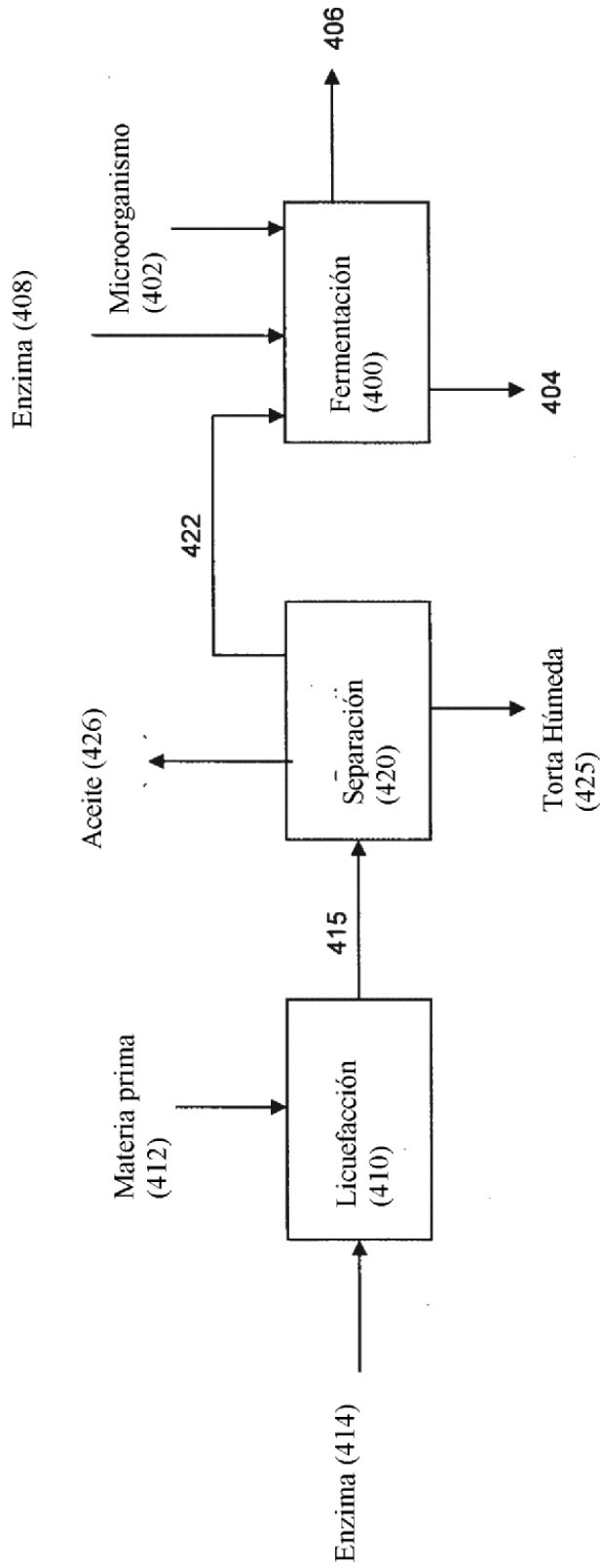


FIG. 4

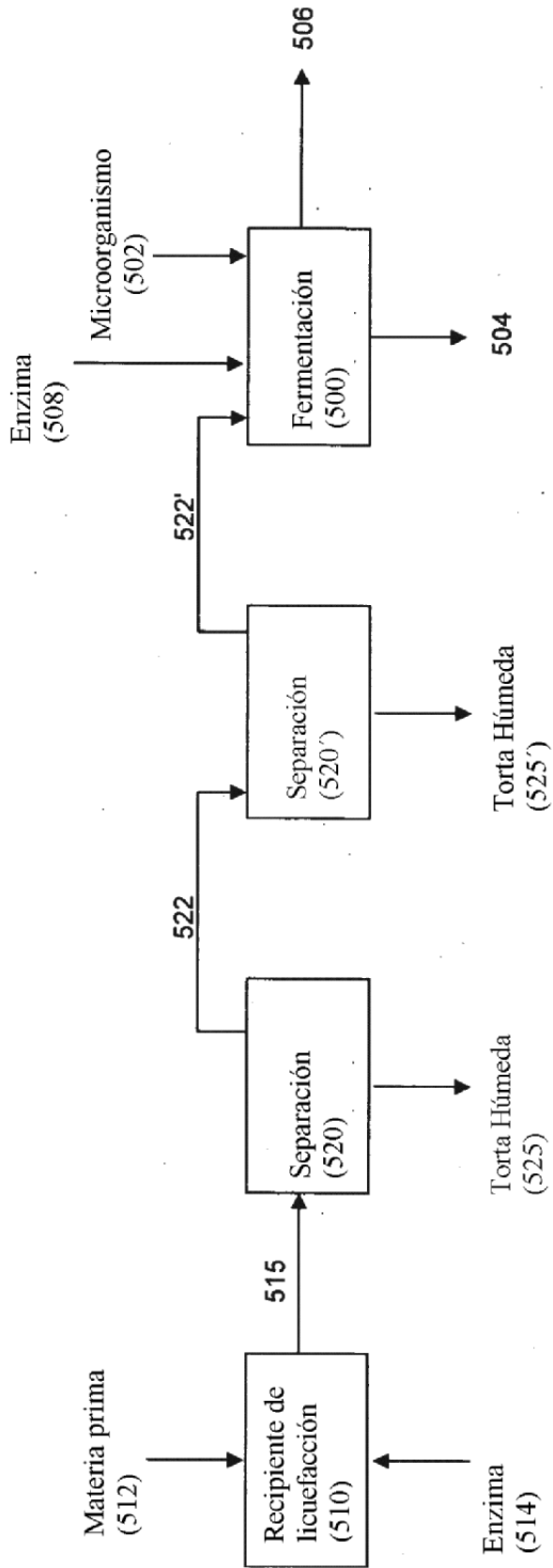


FIG. 5

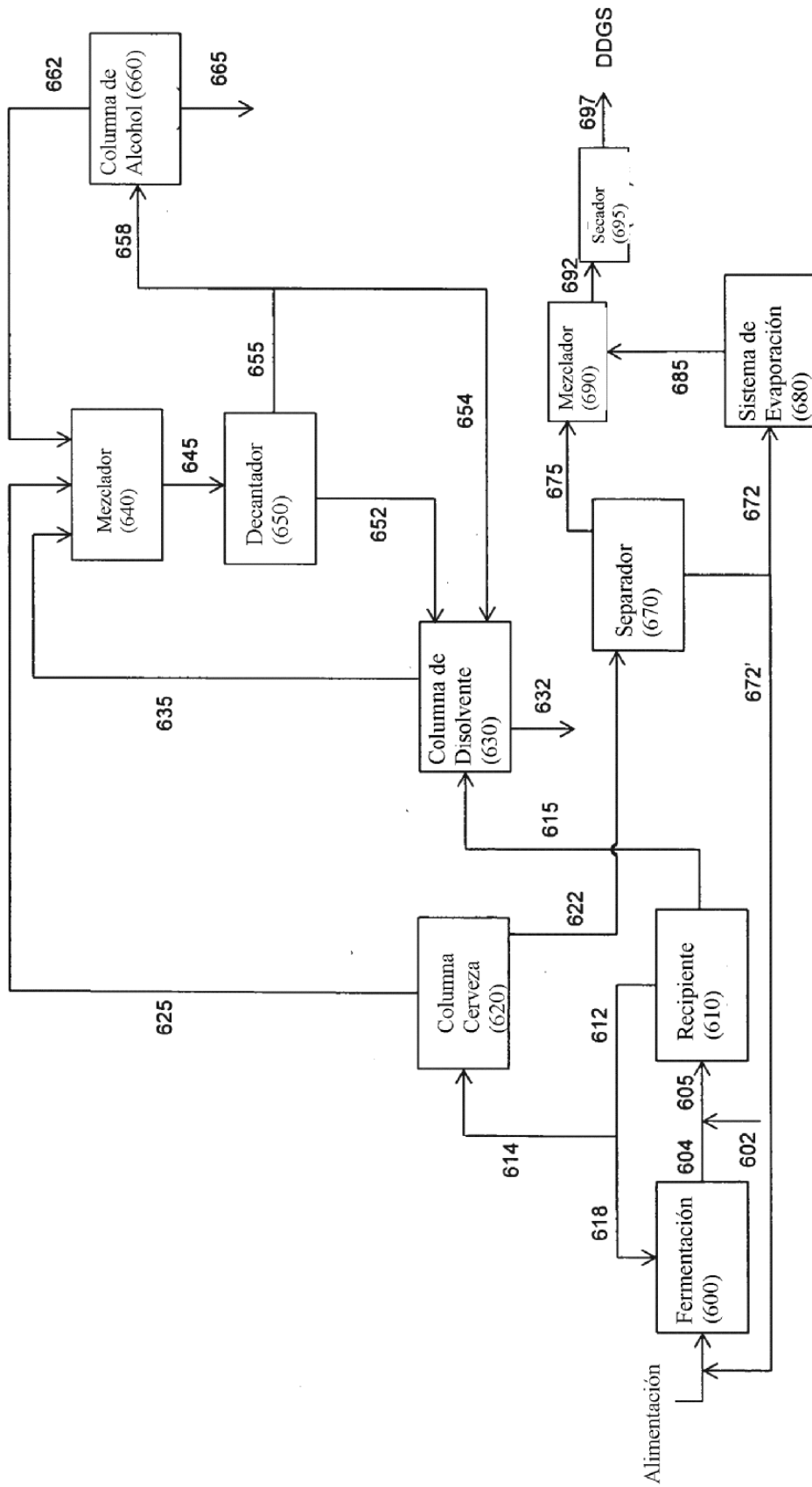


FIG. 6

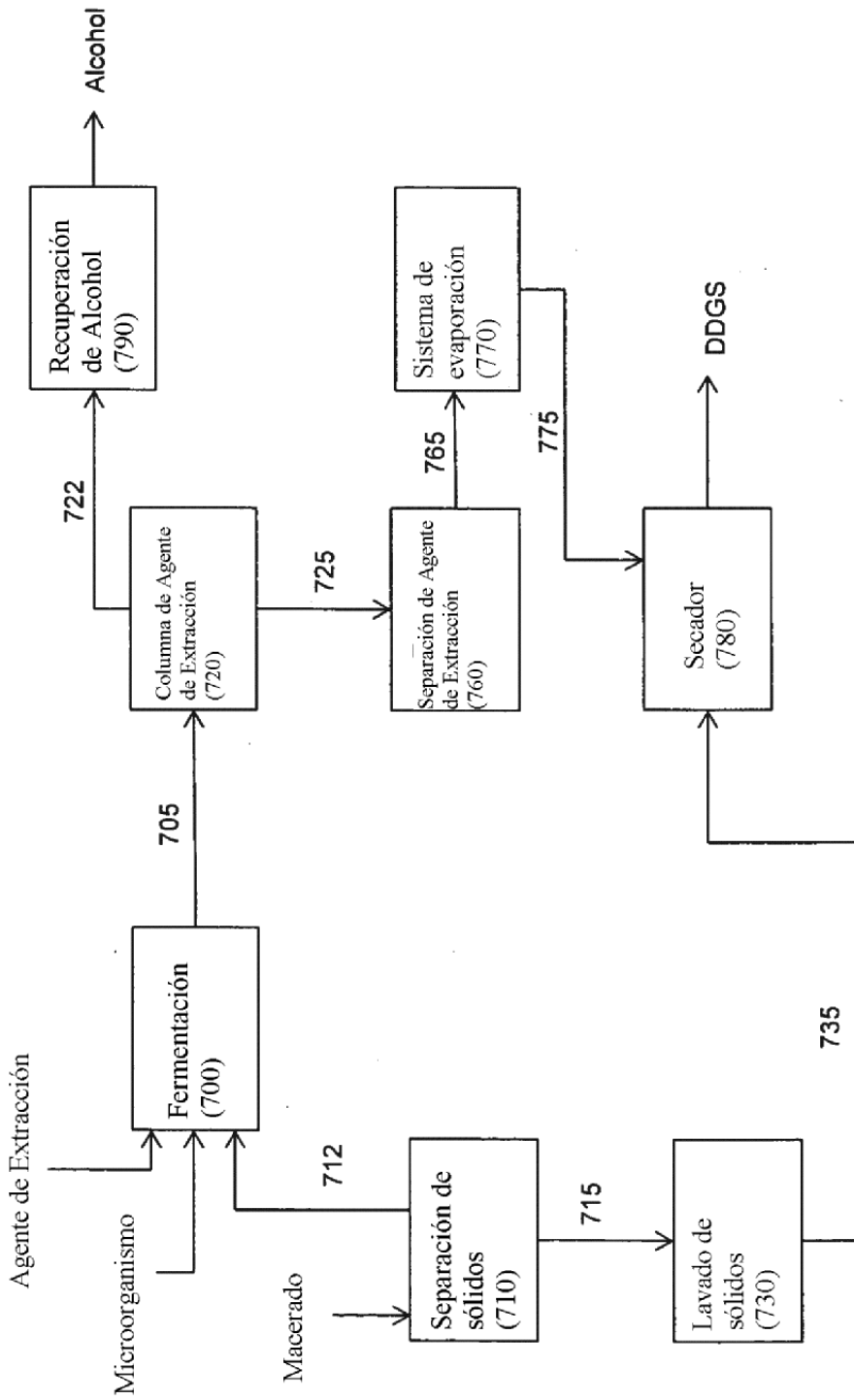


FIG. 7

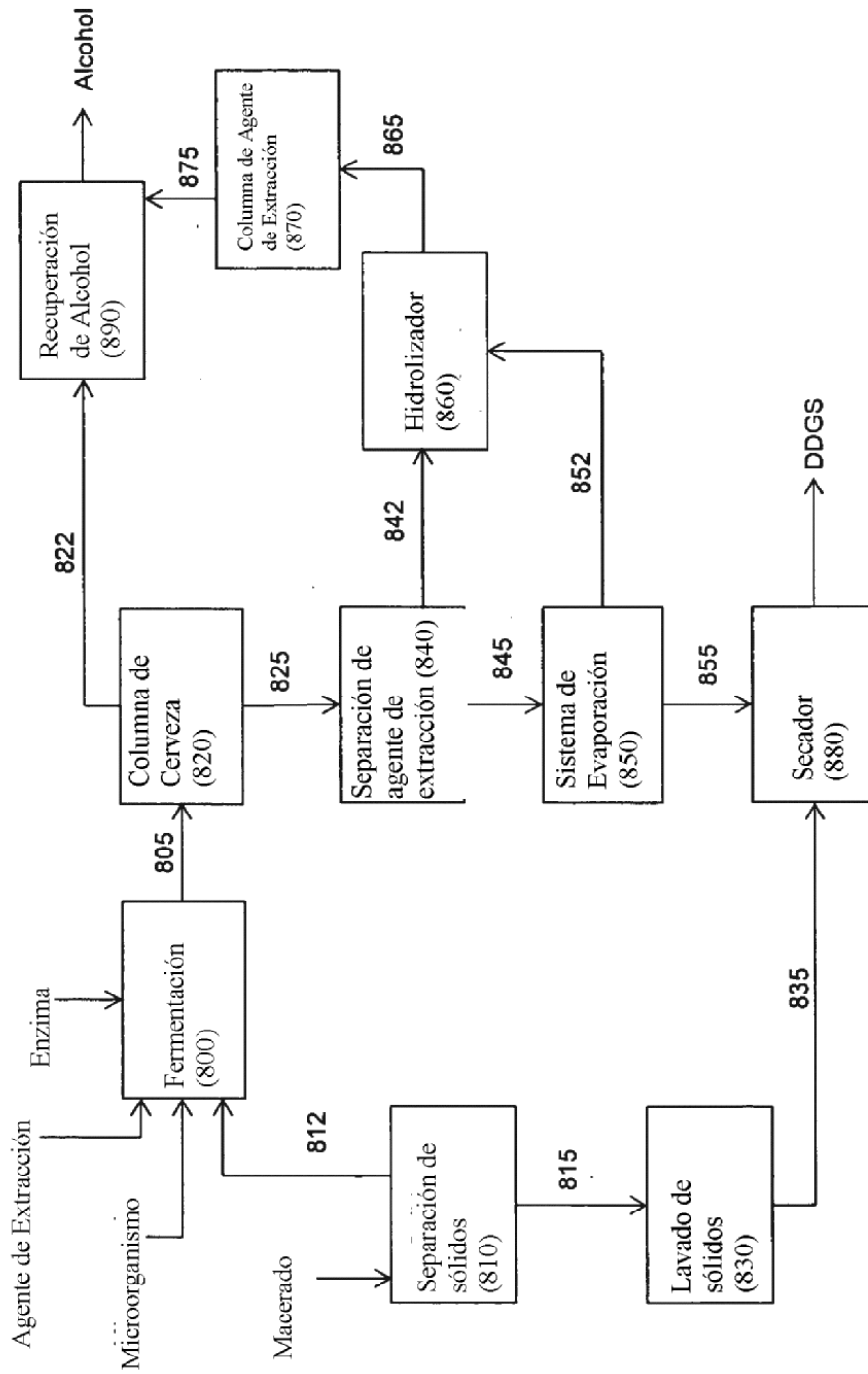


FIG. 8

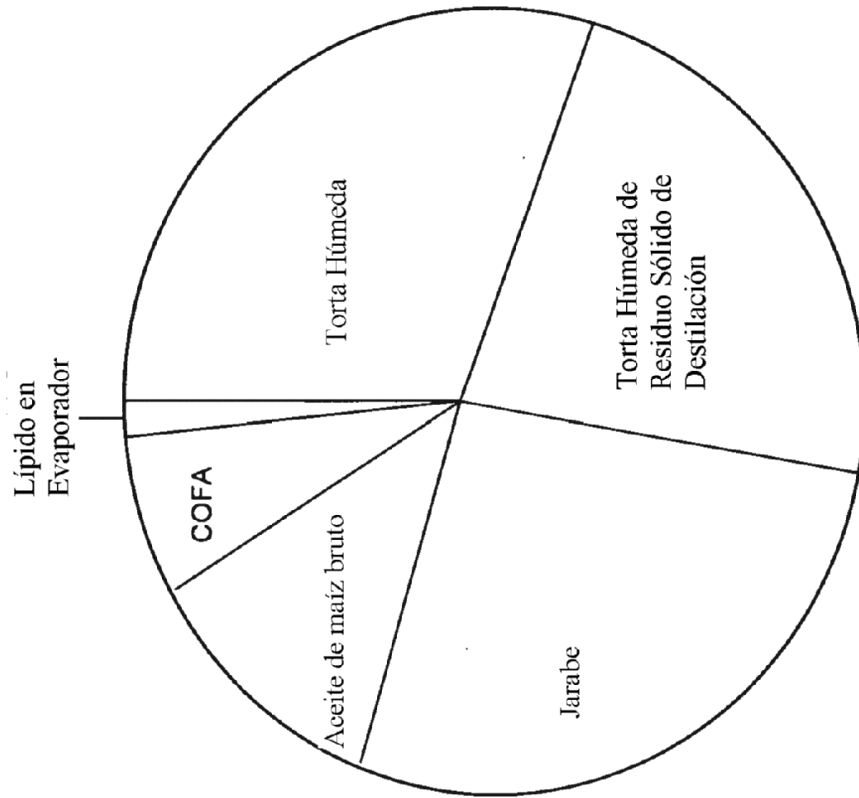


FIG. 9