

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 444**

51 Int. Cl.:

A23K 10/38 (2006.01)

A23K 10/12 (2006.01)

A23K 20/163 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

C12P 7/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012** **PCT/GB2012/050827**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012** **WO12140444**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012** **E 12716556 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2696700**

54 Título: **Proceso de hidrólisis y fermentación para la producción de piensos**

30 Prioridad:

13.04.2011 GB 201106261

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

14.06.2018

73 Titular/es:

ENSUS UK LIMITED (100.0%)
The Granary, 17A High Street, Yarm
TS15 9BW, GB

72 Inventor/es:

LYWOOD, WARWICK;
PINKNEY, JOHN;
JAVED, MUHAMMAD y
EDWARDS, JAMES

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 672 444 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

Proceso de hidrólisis y fermentación para la producción de piensos

5 ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a procesos para elaborar un producto de alimentación animal y a productos de alimentación animal. En particular la presente invención se refiere a procedimientos que se basan en la hidrólisis de materiales de partida fermentables o en productos secundarios no etanólicos de un proceso de fermentación y opcionalmente en fermentaciones, a fin de mejorar el contenido nutricional de los productos de alimentación animal resultantes.

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

Se han llevado a cabo trabajos para desarrollar microorganismos, incluyendo microorganismos termófilos del género *Geobacillus*, con el fin de producir bioetanol a partir de mezclas de azúcares pentosas (C5) y hexosas (C6) o solo de azúcares C5. La patente WO 2007/110606 describe microorganismos termófilos transformados con un gen codificador de una formiato deshidrogenasa unida a NAD para maximizar la producción de etanol. Las patentes WO 2006/117536 y WO 02/29030 describen respectivamente microorganismos termófilos que portan un gen de lactato deshidrogenasa inactivado.

Linde (Bioresource Technology 99 (2008) 6506 - 6511) investigó los incrementos teóricos del rendimiento de etanol mediante la aplicación de un tratamiento térmico, seguido de hidrólisis enzimática, a fracciones residuales de celulosa y hemicelulosa libres de almidón de suspensiones obtenidas de los flujos de proceso de una planta de producción de etanol a partir de almidón. Las suspensiones del proceso investigadas fueron la harina, la suspensión después de la sacarificación del almidón, antes de la fermentación y después de la fermentación. En comparación con el uso de solo almidón se podría lograr un aumento teórico del 14% de rendimiento de etanol, teniendo en cuenta la fermentación de los azúcares de pentosa y hexosa liberados adicionalmente. Así como la hidrólisis de la celulosa produce glucosa, que es fermentada fácilmente a etanol, la hidrólisis de la hemicelulosa produce una gran proporción de azúcares pentosas (C5). Los azúcares pentosas requieren levadura fermentadora de pentosa, que actualmente no se usa en procesos industriales. El proceso de Linde se realiza únicamente con el objetivo de maximizar los rendimientos de etanol.

Cookman (Bioresource Technology 100 (2009) 2012 - 2017) investigó la posibilidad de extraer aceite y proteínas del grano de destilería (GD) para obtener un producto rico en proteínas de mayor valor. Las extracciones de proteína se basaron en etanol acuoso, etanol alcalino y tratamientos enzimáticos acuosos. El carbohidrato restante se pretendía transformar en azúcares fermentables. La proteína recuperada no se examinó para determinar su valor.

Misailidis (Chemical Engineering Research and Design 87 (2009) 1239 - 1250) investigó la viabilidad económica de coproducir un producto de arabinoxilano (AX) con etanol derivado de trigo. Se modelaron tres escenarios: producción convencional de trigo a bioetanol con GSDS como coproducto principal; producción de bioetanol con coproducción de AX, empleando la molienda convencional de martillos y cribado a fin de recuperar el salvado para la extracción de AX; y el empleo de la tecnología de perlado para recuperar el salvado desinado a la extracción de AX. El envío directo a los GSDS del salvado eliminado mediante el perlado no era rentable.

Srinivasan (Bioresource Technology 100 (2009) 3548 - 3555) describe un cribado a escala de laboratorio y un proceso de clasificación por aire para eliminar la fibra de los GSDS.

La patente US 2010/0196979 describe el uso del grano sobrante de la industria cervecera como fuente de biomasa para obtener etanol y otros productos, como por ejemplo piensos para el ganado.

La patente WO 2010/107944 se refiere a la conversión de material lignocelulósico en azúcares fermentables y a otros productos obtenidos en este proceso, como por ejemplo piensos para animales.

La patente US 6,444,437 se refiere a un proceso de dos etapas para transformar biomasa rural y otros materiales celulósicos en un suplemento alimenticio rico en proteínas para animales.

La patente US 2003/0232109 describe un proceso para elaborar un producto rico en proteínas muy digestible a partir de endosperma de maíz, que se basa en una etapa inicial de descascarillado y desgerminación.

La patente WO 82/01483 se refiere a un proceso y a un aparato para recuperar materia orgánica e inorgánica de materiales residuales.

La patente WO 2005/079190 se refiere a etapas de pretratamiento para solubilizar almidón y favorecer la digestibilidad enzimática de la celulosa contenida en la fibra.

La patente US 2010/0167367 describe procesos para recuperar etanol de varios materiales celulósicos de partida.

La patente WO 2009/079183 se basa en el uso de la fermentación celulolítica del producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación, a fin de aumentar los niveles de proteína en la mezcla de alimentación.

La patente FR 2949645 describe procesos para recuperar los productos secundarios de destilación.

La patente WO 2007/056321 describe un método para deshidratar todos los residuos de destilación.

DESCRIPCIÓN DE LA PRESENTE INVENCION

Muchos de los materiales de alimentación animal coproducidos, tales como granos secos de destilación con solubles (GSDS), salvado de trigo, fibra de maíz y pulpa de remolacha azucarera, empleados para la alimentación animal, no se usan tan eficientemente como otros productos de alimentación animal, como la harina de soja. Las razones de ello son que tienen:

- menor contenido de proteína
- mayor contenido de fibra
- altos niveles de polisacáridos no amiláceos solubles (PNA)
- contienen azúcares reductores

El alto contenido de fibra reduce la digestibilidad de la proteína y la energía metabolizable en cerdos y aves de corral. Los niveles más altos de PNA causan fermentación en el intestino posterior de los cerdos, lo que limita las tasas de inclusión de GSDS en cerdos y aves de corral. Los azúcares reductores, como la glucosa, la maltosa y la arabinosa en los GSDS, y el salvado degradan la lisina (un aminoácido esencial) debido a la reacción de Maillard durante los procesos de secado de los GSDS o del salvado.

Los presentes inventores han ideado un proceso que tiene como objetivo controlar el grado de una etapa adicional de fermentación a etanol (además de la efectuada en el proceso existente de producción de bioetanol) para mejorar la calidad de la alimentación animal del flujo de coproducto (que surge del proceso existente de producción de bioetanol). La presente invención se define en las reivindicaciones. Por lo tanto, según un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para obtener un producto de alimentación animal, que comprende como parte de un proceso existente de producción de bioetanol:

- a) la hidrólisis parcial del producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable; una hidrólisis parcial que convierte polisacáridos no amiláceos en oligómeros y monómeros solubles, en la cual el producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable es un residuo de destilación de la producción de etanol o un derivado del mismo;
- b) la fermentación de los oligómeros y monómeros solubles del material de partida parcialmente hidrolizado o del producto secundario no etanólico para la obtención de más etanol, en comparación con el obtenido mediante el proceso existente de producción de bioetanol;
- c) la recuperación del producto secundario no etanólico de la fermentación de la etapa b) para elaborar un producto de alimentación animal con mejor contenido nutricional.

El método también se puede considerar un procedimiento para mejorar un producto de alimentación animal, de manera específica uno coproducido en un proceso de fermentación.

También se describe aquí un método para elaborar un producto de alimentación animal, en particular un producto de alimentación animal con contenido nutricional mejorado, que comprende:

- a) la hidrólisis parcial del producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable; una hidrólisis parcial que convierte polisacáridos no amiláceos en oligómeros y monómeros solubles;
- b) la recuperación del producto parcialmente hidrolizado de la etapa a) para excluir los oligómeros y monómeros solubles, a fin de obtener un producto de alimentación animal, de modo más concreto un producto de alimentación animal con mejor contenido nutricional.

Este proceso se puede considerar como una parte del proceso más general efectuado directamente con el producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable. Por lo tanto este método puede incluirse en la "cola del proceso" de las plantas existentes de producción de bioetanol como medio para mejorar el producto de alimentación animal obtenido como coproducto del proceso de fermentación. La hidrólisis parcial seguida de la recuperación del producto parcialmente hidrolizado, sin incluir los azúcares reductores liberados, mejora el contenido nutricional relativo del producto de alimentación animal.

Según la presente invención, los oligómeros y monómeros solubles liberados se convierten en etanol por fermentación. En otros ejemplos, en vez de fermentar los oligómeros y monómeros solubles, estos se pueden separar simplemente del resto del producto parcialmente hidrolizado. Por ejemplo, el producto insoluble se puede separar por centrifugación para obtener el producto de alimentación animal en forma sólida.

En los métodos de la presente invención se puede usar cualquier material adecuado de partida fermentable. Existen muchas plantas de bioetanol donde se fermentan diversos materiales para producir etanol. En formas de ejecución específicas el material de partida fermentable lleva hemicelulosa y en particular es una materia vegetal. Como ejemplos adecuados cabe citar el maíz, el trigo, la cebada y la pulpa de remolacha azucarera. La presente invención se puede basar en microorganismos termófilos capaces de fermentar dichos azúcares hemicelulósicos derivados de materiales vegetales. El material de partida puede comprender adicional o alternativamente materia celulósica. Por consiguiente la fermentación puede ser de azúcares pentosas y/o hexosas.

La presente invención está basada en la hidrólisis parcial del producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable, una hidrólisis parcial que transforma los polisacáridos no amiláceos en oligómeros y monómeros solubles, en la cual el producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable es un residuo de destilación de la producción de etanol o un derivado del mismo. La hidrólisis es parcial, lo cual representa un equilibrio importante para asegurar mejores rendimientos de etanol respecto a los obtenidos sin hidrólisis, a la vez que permite mejorar el producto de alimentación animal. Maximizar los rendimientos de etanol extendiendo la hidrólisis puede ir en detrimento de la calidad del producto de alimentación animal. De manera similar, la hidrólisis extensiva puede aumentar los costos del proceso hasta hacerlo antieconómico. Por lo tanto, en formas de ejecución específicas la hidrólisis parcial llega hasta aproximadamente el 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% o alrededor del 10% de la hidrólisis total de los polisacáridos no amiláceos (que se encuentran en el producto secundario no etanólico del material de partida de un proceso de fermentación).

La hidrólisis parcial se puede efectuar por cualquier medio adecuado. En formas de ejecución específicas la hidrólisis parcial tiene lugar química y/o enzimáticamente. Normalmente, si se usa la hidrólisis química, la fermentación deberá realizarse por separad, en diferentes condiciones de reacción. En ciertas formas de ejecución, en particular cuando la hidrólisis es enzimática, la hidrólisis parcial y la fermentación pueden tener lugar simultáneamente. Dichos procesos pueden denominarse fermentación de sacarificación simultánea (FSS). En algunas formas de ejecución también puede combinarse la hidrólisis química y la hidrólisis enzimática.

La hidrólisis química parcial se puede llevar a cabo en condiciones adecuadas cualesquiera. En algunas formas de ejecución se emplea un ácido en la hidrólisis química parcial. En formas de ejecución específicas el ácido contiene, consta esencialmente de o está formado por ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido clorhídrico. Los ácidos concentrados pueden utilizarse en cantidades adecuadas, como puede determinar fácilmente un experto en la materia, con el fin de alcanzar los niveles de hidrólisis deseados. En formas de ejecución específicas el ácido se emplea a una concentración de aproximadamente 1 - 10% de ácido, o más concretamente 0,5 - 5% de ácido. Las condiciones hidrólisis adecuadas de ácida se describen en este documento.

La hidrólisis parcial también se puede llevar a cabo a una temperatura conveniente. Una temperatura mayor que la temperatura ambiente (o ambiental) puede facilitar el proceso de hidrólisis. Por consiguiente, en formas de ejecución específicas (químicas) la hidrólisis parcial se realiza a una temperatura comprendida aproximadamente entre 50 y 200 grados centígrados (°C), especialmente entre unos 100 y 150° C y concretamente entre unos 120 y 140°C. Por tanto se puede usar un ácido para hidrolizar el material de partida fermentable o el producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado a cualquiera de dichas temperaturas con un material de partida fermentable.

De forma similar la hidrólisis parcial se realiza durante un período de tiempo apropiado, para asegurar el nivel deseado de conversión de polisacáridos no amiláceos a oligómeros y monómeros solubles. En algunas formas de ejecución la hidrólisis química parcial se efectúa durante un período comprendido aproximadamente entre 10 minutos y 5 horas, especialmente entre unos 20 minutos y 3 horas o concretamente entre unos 30 y 120 minutos. Por tanto se puede usar un ácido para hidrolizar el material de partida fermentable o el producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado durante cualquiera de dichos períodos de tiempo con un material de partida fermentable.

La hidrólisis enzimática se puede realizar en lugar de o junto con la hidrólisis química. Si se combinan ambos métodos, estos se pueden realizar de manera simultánea, secuencial o separada. En función del método adoptado puede ser necesario ajustar las condiciones de temperatura, tiempo y concentración, tal como apreciaría un experto en la materia. Por ejemplo los enzimas pueden actuar ineficientemente a bajas temperaturas y desnaturalizarse (irreversiblemente) a mayores temperaturas. El tipo de enzima utilizado dependerá de la naturaleza del material de partida fermentable o del producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable. Normalmente se emplean enzimas glicosidasas. En formas de ejecución específicas la hidrólisis enzimática se realiza utilizando una hemi-celulasa y/o una celulasa. Los ejemplos específicos de tales enzimas incluyen glicano hidrolasa, E.C.3.2.1 y/o celulasas tales como endo beta-glucanasas y beta-glucosidasas.

De acuerdo con la fuente de material de partida fermentable, los polisacáridos no amiláceos pueden contener, constar básicamente de o estar formados por hemicelulosa. En formas de ejecución específicas los polisacáridos no amiláceos contienen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de hemicelulosa. Análogamente, en formas de ejecución específicas los polisacáridos no amiláceos contienen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de celulosa. En algunas formas de ejecución la celulosa y la hemicelulosa pueden constituir la cantidad total de polisacáridos no amiláceos. En función de la fuente de material de partida puede haber otros polisacáridos tales como pectinas, glucanos, gomas e inulina.

Del modo aquí descrito con mayor detalle, los procesos de la presente invención se pueden adaptar específicamente para permitir la fermentación de azúcares pentosas. Así, en algunas formas de ejecución la hidrólisis parcial produce oligómeros y monómeros solubles que contienen, constan esencialmente de o están formados por azúcares pentosas. Los microorganismos preferidos de la presente invención pueden fermentar tanto azúcares pentosas como hexosas, y los oligómeros y monómeros solubles contendrán normalmente tanto azúcares pentosas como hexosas. En formas de ejecución concretas los azúcares pentosas contienen, constan esencialmente de o están formados por xilosa y/o arabinosa. Los oligómeros solubles pueden incluir disacáridos tales como celobiosa.

Como se ha tratado anteriormente, la fermentación de un material de partida fermentable produce etanol y un producto secundario no etanólico, lo cual está representado esquemáticamente en la figura 1. La hidrólisis parcial del producto secundario no etanólico de la fermentación puede tener lugar en cualquier fase, una vez efectuada la fermentación. Así, tal como se define en las reivindicaciones, en la etapa a) el producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable es un residuo de destilación de la producción de etanol o un derivado del mismo. En formas de ejecución concretas se puede hidrolizar parcialmente el residuo de destilación, el cual puede contener, constar básicamente de o estar formado por los residuos líquidos y/o sólidos de la destilación.

Como se ha descrito anteriormente, después de la hidrólisis parcial del producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable, los oligómeros y monómeros solubles del producto secundario no etanólico parcialmente hidrolizado (de la fermentación) se fermentan para producir etanol. Los procesos de fermentación adecuados son bien conocidos del estado técnico y se aplican fácilmente para optimizar la producción de etanol. La fermentación es normalmente anaeróbica, pero en ciertas formas de ejecución aquí descritas se puede realizar en condiciones parcialmente aeróbicas. Como se ha tratado anteriormente, la fermentación puede incluir la fermentación de azúcares pentosas. Por tanto, en formas de ejecución específicas la fermentación se realiza utilizando un microorganismo capaz de fermentar azúcares pentosas, que por ejemplo puede ser una bacteria o una levadura. En formas de ejecución más específicas la fermentación se realiza utilizando un microorganismo termófilo, en concreto una bacteria termófila capaz de fermentar azúcares pentosas. La bacteria termófila puede carecer de la actividad de lactato deshidrogenasa. Se ha demostrado previamente que los mutantes carentes en lactato son capaces de producir mayores rendimientos de etanol. Las técnicas idóneas para inactivar el gen *ldh* (codificador de lactato deshidrogenasa) están descritas, por ejemplo, en las patentes WO 2007/110608, WO 02/29030 y WO 2006/117536. Por tanto se puede inactivar el gen *ldh* mediante una mutación por inserción, delección o sustitución. Así se detiene la producción de lactato y el exceso de piruvato se desvía principalmente hacia la ruta de la piruvato-formiato liasa (PFL) ligada al crecimiento. Por lo tanto las bacterias termófilas expresan típicamente piruvato-formiato liasa. Sin embargo, a concentraciones de azúcar muy elevadas y/o a pH ácido disminuye el flujo de la ruta de PFL y el exceso de piruvato se desborda hacia una ruta anaeróbica de piruvato deshidrogenasa (PDH), que finalmente produce solo etanol y CO₂. Por lo tanto las condiciones preferidas para obtener altos rendimientos de etanol pueden ser aquellas que reducen el flujo a través de la ruta PFL y aumentan el flujo a través de la ruta PDH (Hartley, BS y Shama, G. Proc. Roy. Soc. Lond. 321, 555-568 (1987)). Desafortunadamente, en tales condiciones las células pueden sufrir estrés metabólico, con una producción reducida de ATP y un posible desequilibrio de las proporciones NAD/NADH y CoA/acetil-CoA.

Para abordar este posible problema de desequilibrio redox, sobre todo cuando hay altos niveles de azúcar (producidos por la hidrólisis parcial), en algunas formas de ejecución la bacteria termófila expresa una formiato deshidrogenasa (FDH) heteróloga ligada a NAD (o dependiente de NAD). Del estado técnico se conocen muchos genes codificadores de FDH ligada a NAD (véase, por ejemplo, Nanba y otros (Biosci. Biotechnol. Biochem. 67(10), 2145-2153 (2003)) y pueden emplearse para transformar una bacteria termófila adecuada. Así, la bacteria termófila se puede transformar con un gen *fdh*, en particular un gen *fdh1*. En algunas formas de ejecución la bacteria termófila puede incorporar un gen codificador de una formiato deshidrogenasa unida a NAD termoestable. En otras formas de ejecución la bacteria termófila se puede transformar con un gen cuya secuencia de nucleótidos ha sido optimizada por codón para facilitar la expresión de la bacteria termófila. La producción de dicha formiato deshidrogenasa ligada a NAD termoestable se describe detalladamente en la patente WO 2007/110608. En una forma de ejecución específica, el gen codificador de una formiato deshidrogenasa ligada a NAD contiene, consta esencialmente de o está formado por la secuencia de nucleótidos descrita como SED ID NO: 1. En otra forma de ejecución, la bacteria termófila incorpora un gen optimizado por codón (para la expresión en el gen de (Geo)Bacillus), codificador de una formiato deshidrogenasa ligada a NAD termoestable que contiene, consta esencialmente de o está formado por la secuencia de nucleótidos descrita como SEQ ID NO: 2. Esta secuencia, además de la secuencia básica de deshidrogenasa ligada a NAD termoestable, incluye regiones promotoras y finalizadoras, y también sitios de restricción adecuados, tales como sitios *Xba*1, para facilitar la clonación del gen en un constructo de ADN adecuado.

En otra forma más de ejecución el gen codificador de una formiato deshidrogenasa ligada a NAD es el gen *fdh1*. El gen *fdh1* puede proceder de cualquier fuente adecuada y preferiblemente está optimizado por codón para la expresión en la bacteria termófila relevante.

Así la fermentación puede usar una formiato deshidrogenasa sintética unida a NAD, diseñada para la expresión génica óptima, debido al uso de las preferencias codónicas de la bacteria termófila apropiada. El gen sintético puede incluir sitios de restricción diseñados para favorecer la inserción en el gen de la lactato deshidrogenasa. De esta manera se logra la inactivación del gen *ldh* y la expresión del gen *fdh* en una sola operación. En formas de ejecución concretas la formiato deshidrogenasa ligada a NAD termoestable conserva su funcionalidad a una temperatura igual o superior a 60°C. El enzima termoestable puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que se ha sido optimizada por codón para su expresión en una bacteria termófila. La formiato deshidrogenasa puede llevar, constar básicamente de o estar formada por la secuencia de aminoácidos indicada como SEQ ID NO: 3, tal como se describe en la patente WO 2007/110608. Aquí se diseñó una formiato deshidrogenasa específica ligada a NAD termoestable, basada en la secuencia de aminoácidos de la formiato deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp 101 (SEQ ID NO: 3) y en el uso de codones optimizados para el *Geobacillus thermoglucosidasius*. El especialista apreciará que los derivados de esta secuencia básica conservarán la funcionalidad. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras y semiconservadoras pueden dar como resultado formiato deshidrogenasas ligadas a NAD termoestable y se prevé incluir estos derivados dentro del alcance de la presente invención, siempre que conserven una actividad catalítica y una estabilidad térmica efectiva, que sea útil para producir etanol con el uso de bacterias termófilas. Análogamente, las pequeñas delecciones y/o adiciones de aminoácidos pueden producir derivados que retengan una funcionalidad apropiada.

En ciertas formas de ejecución, para abordar el posible problema del desequilibrio redox, el proceso de fermentación se puede llevar a cabo en condiciones parcialmente aeróbicas. Como la vía de PDH también funciona en condiciones aeróbicas, bajo las cuales tiene lugar principalmente a la producción de masa celular, el estrés metabólico mencionado anteriormente se puede atenuar inyectando parcialmente aire, en general a un caudal óptimo. Por caudal óptimo de aire se entiende el que es (preciso) suficiente para mitigar el estrés metabólico, permitiendo que disminuya el nivel de flujo a través de la vía de PDH aeróbica. Sin embargo este bajo nivel de flujo no permite ningún descenso importante de la anaerobiosis ni por tanto del flujo anaeróbico de PDH del proceso, lo cual significa que no deberían disminuir significativamente los niveles de producción de etanol. Asimismo, como la vía de PFL es muy sensible al aire, el aporte de aire puede tener la ventaja adicional de reducir el flujo a través de la vía de PFL e incrementar aún más el flujo a través de la vía anaeróbica de PDH, pero sin poner el microorganismo bajo estrés metabólico. El experto en la materia puede determinar fácilmente los caudales adecuados de aire, estudiando en el contexto de cualquier proceso particular de fermentación cuáles son los caudales que producen niveles óptimos de producción de etanol y/o minimizan la producción de formiato y acetato. La inyección de aire puede ser periódica o continua y el caudal se puede ajustar en consecuencia. El especialista también advertirá la posibilidad de usar técnicas parecidas a la inyección para exponer la fermentación a una cantidad limitada de aire, con el fin de conseguir el efecto deseado. El especialista advertirá igualmente que el aire puede ser reemplazado por una fuente de oxígeno, si se desea, variando (disminuyendo) los caudales de manera correspondiente. Así, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la producción de etanol a partir de azúcares C5 y C6, con niveles óptimos de inyección de aire. La optimización se logra controlando el nivel redox con el cual se obtienen los niveles más bajos de formiato y acetato en la fermentación, a la vez que se logra el nivel comparativamente más alto de concentraciones de etanol en el proceso.

En los métodos de la presente invención se puede usar cualquier bacteria termófila adecuada. En formas de ejecución concretas la bacteria es de la familia Bacillaceae y más concretamente puede ser del género *Geobacillus*. En formas de ejecución concretas el *Geobacillus* comprende *Geobacillus thermoglucosidasius* o *Geobacillus stearothermophilus*, en particular una cepa de *Geobacillus thermoglucosidasius* o *Geobacillus stearothermophilus* transformada con un gen codificador de una formiato deshidrogenasa ligada a NAD.

Aunque las bacterias termófilas tienen una baja tolerancia al etanol, esto se puede superar ventajosamente durante la fermentación mediante la extracción regular o continua de etanol. Así se asegura que la concentración de etanol en la fermentación se mantenga por debajo de la tolerancia de la bacteria termófila al etanol. El etanol se puede eliminar continua y ventajosamente de la fermentación (a temperatura alta) por evaporación o destilación tal como, por ejemplo, evaporación por membranas y/o a vacío suave. En algunas formas de ejecución la fermentación se puede realizar en un intervalo de temperatura comprendido aproximadamente entre 40°C y 80°C, por ejemplo entre unos 50°C y 70°C.

En los métodos de la presente invención el etanol es producido por la fermentación de los productos de una hidrólisis parcial. La presente invención está basada en esta combinación de características, que da como resultado un producto de alimentación animal mejorado, procedente del producto secundario no etanólico de la fermentación. En formas de ejecución concretas la recuperación del producto secundario no etanólico de fermentación, una vez terminada la etapa de fermentación que tiene lugar después o durante la hidrólisis parcial, comprende:

- la separación por centrifugación del residuo líquido y de la torta húmeda de los residuos sólidos de destilación
- la evaporación del residuo líquido

- la recombinación del jarabe resultante de la evaporación con la torta húmeda
- el secado del material recombinado para obtener un producto seco

En formas de ejecución alternativas, la recuperación del producto secundario no etanólico de fermentación incluye el secado de los residuos de destilación o del residuo sólido, para obtener un producto seco.

La naturaleza del producto de alimentación animal es determinada por el material de partida fermentable empleado en los procesos de la presente invención y en las etapas desarrolladas después de la fermentación. Así, en algunas formas de ejecución el producto de alimentación animal comprende grano de destilería (GD), grano seco de destilería (GSD), solubles de destilería (SD), granos secos de destilería con solubles (GSDS) y/o vinaza. La vinaza puede ser melaza de remolacha azucarera.

Tal como se expone aquí, los métodos de la presente invención dan como resultado un producto de alimentación animal con mejor contenido nutricional, gracias a la reducción de los niveles de los componentes anti-nutritivos. Más concretamente, la liberación de azúcares reductores y/o pentosas por hidrólisis parcial, seguida de la fermentación de estos azúcares a etanol mejora la calidad del producto de alimentación animal derivado del producto secundario no etanólico de la fermentación. Así, en formas de ejecución específicas el contenido nutricional mejorado (del producto de alimentación animal) comprende uno o más niveles reducidos de azúcares pentosas, mayor concentración relativa de proteínas, menor concentración relativa de fibra, niveles reducidos de oligómeros y monómeros solubles y menores niveles de azúcares reductores.

Por tanto la presente invención también se refiere a un producto de alimentación animal elaborado según los métodos de la presente invención. En algunas formas de ejecución el producto contiene menos del 10, 9, 8, 7, 6 o 5% en peso de hemicelulosa o menos del 5, 4, 3, 2 o 1% en peso de azúcares pentosas como la xilosa.

La presente invención se describe más detalladamente haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitativos:

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de la cola de proceso de una planta de producción de bioetanol a partir de cereales.

La figura 2 es un cromatograma del residuo líquido de destilación no tratado.

La figura 3 es un cromatograma del residuo líquido de destilación hidrolizado con ácido nítrico.

La figura 4 es una superposición de los cromatogramas de las muestras de residuo líquido de destilación sin tratar (línea de puntos) y tratadas con ácido nítrico (línea continua).

La figura 5 es un cromatograma del residuo líquido de destilación tratado con enzimas a pH 5,0 y a una temperatura de 50°C durante 24 horas.

La figura 6 es una superposición de los cromatogramas de las muestras de residuo líquido de destilación sin tratar (línea de puntos) y tratadas enzimáticamente (línea continua).

DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE EJECUCIÓN PREFERIDAS DE LA PRESENTE INVENCION

EJEMPLO 1 – Hidrólisis ácida y enzimática de residuo líquido de destilación

Introducción

El residuo líquido de destilación se obtuvo de una planta de proceso de bioetanol (Ensus). La figura 1 representa el proceso Ensus en el punto del proceso en que se produce el residuo líquido de destilación. Se indica el porcentaje de contenido de agua (p/p) en cada fase del proceso. El residuo líquido de destilación es el flujo residual semisólido del proceso de obtención de etanol después de separar la torta húmeda del residuo. Es de esperar que el residuo líquido de destilación esté exento de almidón y glucosa y que los carbohidratos sean principalmente residuos celulósicos y hemicelulósicos. También es de esperar que su hidrólisis libere en condiciones óptimas la mayor parte de azúcares de estos materiales.

Materiales y métodos

Residuo líquido de destilación

El residuo líquido de destilación lo facilitó Ensus de su planta de bioetanol (véase párrafo de introducción y figura 1).

Hidrólisis ácida del residuo líquido de destilación

En una botella Duran de 100 ml que contenía unos 12,5 ml de residuo líquido de destilación se introdujeron 0,125 ml de ácido nítrico o 0,136 ml de ácido sulfúrico concentrado y se hidrolizó (en autoclave) a 121°C durante 30 minutos.

Hidrólisis enzimática del residuo líquido de destilación

En frascos cónicos de 250 ml que contenían unos 50 - 100 ml de residuo líquido de destilación (ajustado a pH 4 o 5) se introdujeron distintos niveles de enzima(s) según la siguiente tabla 1. Luego los frascos se incubaron a 50 - 60°C durante varios intervalos de tiempo. Las muestras se extrajeron de los frascos y se analizaron por HPLC.

Tabla 1 - Enzimas empleados en la hidrólisis del residuo líquido de destilación. La concentración de enzima se calculó respecto al contenido sólido del residuo líquido de destilación (RL) al 8% p/v.

Enzimas de Genencor	Concentraciones recomendadas (g/g de peso seco)	Cantidad añadida/100 ml de RL*
Accellerase Duet	0,05 – 0,25	2 ml
Accellerase 1500	0,05 – 0,25	2 ml
Optimash BG	0,025 - 0,05	0,72 ml
Optimash TBG	0,025 - 0,05	0,72 ml
Accellerase XY	0,005 - 0,05	0,4 ml
Accellerase XC	0,0125 - 0,125	1,2 ml

Sólidos insolubles secados del residuo líquido de destilación

Los sólidos totales del residuo líquido de destilación se determinaron centrifugando el residuo líquido de destilación a 4.000 rpm durante 10 hasta 20 minutos, separando el sobrenadante y secándolo a 65°C durante 48 horas.

Sólidos solubles + insolubles secados del residuo líquido de destilación

El residuo líquido de destilación se mantuvo a 120°C hasta peso constante (al cabo de aproximadamente 8 minutos).

Análisis del residuo líquido de destilación

El residuo líquido de destilación se centrifugó dos veces a 14.000 rpm durante 5 minutos y luego se filtró a través de un filtro de 0,2 micras y se analizó mediante un aparato Dionex de HPLC provisto de una columna Dionex CarboPAC PA1 que se mantuvo a temperatura ambiente y se eluyó con un gradiente de fase móvil [100% de A (NaOH 50 mM) durante 20 minutos, seguido de 100% de B (NaOAc 250 mM/NaOH 250 mM) durante 10 minutos y luego 15 minutos de regeneración de la columna con 100% de A]. El tiempo total fue de 45 minutos a un caudal de 1 ml/min.

Alternativamente las muestras se analizaron con un aparato Shimadzu de HPLC provisto de una columna Bio-Rad Aminex-HPX87H que se mantuvo a una temperatura de 65°C y se eluyó con ácido sulfúrico 5 mM durante 25 minutos a un caudal de 0,6 ml/min.

ResultadosSólidos totales del residuo líquido de destilación

Se encontró que los sólidos totales (solubles + insolubles) del residuo líquido de destilación estaban comprendidos entre 60 y 85 g/l, cuando el residuo líquido se secó a 120°C durante 8 minutos, y la mayoría de las cargas de residuo líquido de destilación tenían alrededor de 80 g/l de contenido total de sólidos. Se encontró que los sólidos insolubles totales eran de 45 g/l aproximadamente, al separar primero los sólidos de los residuos y secar luego el resto a 65°C durante 48 horas.

Liberación de carbohidratos por hidrólisis ácida del residuo líquido de destilación

Los resultados de la tabla 2 (y la figura 2) indican que en el residuo líquido de destilación había muy poca cantidad de azúcares (solo 1,7 g/l de azúcares monómeros y 3 g/l de azúcares dímeros). Por simple autoclavado se liberó solo una cantidad muy pequeña de azúcares monómeros (unos 1,8 g/l). Sin embargo la hidrólisis ácida liberó una cantidad importante de azúcares del residuo líquido de destilación. La hidrólisis del residuo líquido de destilación a 121°C con ácido nítrico al 1% durante 30 minutos aumentó el contenido de azúcares monómeros solubles de 1,7 g/l hasta unos 26 g/l y redujo los azúcares dímeros de 3 g/l hasta menos de 0.1 g/l (figuras 3 y 4). El tratamiento con ácido sulfúrico al 1% produjo una reducción similar de los niveles de dímeros, mientras que el incremento de azúcares monómeros hasta 22,5 g/l fue algo menor que el logrado con ácido nítrico.

Liberación de carbohidratos por hidrólisis enzimática del residuo líquido de destilación

Los resultados presentados en las figuras 5 y 6 indican claramente que se liberó una cantidad importante de azúcares monómeros durante la hidrólisis enzimática. En la tabla 3 se muestran los resultados cuantitativos de la hidrólisis del residuo líquido de destilación con distintas enzimas. Los enzimas Accellerase 1500, Accellerase Duet, Optimash GB y Optimash TBG liberaron cantidades importantes de azúcares; hasta unos 25 g/l de azúcar se

podieron liberar del residuo líquido de destilación, mientras que los enzimas Accellerase XC y Accellerase XY también liberaron algunos azúcares del residuo líquido de destilación.

Conclusiones

- El contenido de sólidos insolubles secados del residuo líquido de destilación es aproximadamente de 45 g/l.
- El contenido de sólidos secados (solubles + insolubles) del residuo líquido de destilación está comprendido entre 60 y 85 g/l.
- Aproximadamente 21 g/l de azúcares con ácido sulfúrico al 1% y aproximadamente 23 g/l de azúcares con ácido nítrico al 1% fueron liberados mediante la hidrólisis del residuo líquido de destilación.
- La hidrólisis enzimática también liberó una cantidad importante de azúcares del residuo líquido de destilación.

Tabla 2: niveles de carbohidratos (g/l) en el residuo líquido de destilación con y sin tratamiento

Tratamiento	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Otros	Monómeros totales
Ninguno	0	0,73	1,01	3,01	1,74
121°C – 30 min	0,29	2,14	1,07	3,2	3,50
121°C – 30 min con NO ₃ H 1%	6,76	13,36	5,84	0,08	25,96
121°C – 30 min con SO ₄ H ₂ 1%	5,54	11,95	5,01	0,07	22,50

Los sólidos totales del residuo líquido de destilación fueron 45 g/l.

Tabla 3: niveles de carbohidratos (g/l) en el residuo líquido de destilación liberados con distintos enzimas (Genencor) a 60°C y pH 5 después de 24 horas.

Enzimas	Cantidad añadida/100 ml de RL	Arabinosa (g/l)	Glucosa (g/l)	Xilosa (g/l)	Azúcares totales (g/l)
Accellerase Duet	0,125 ml	0,69	12,11	4,39	23,19
Accellerase 1500	2 ml	5,5	17,9	2	25,5
Optimash BG*	0,72 ml	1,76	16,10	2,25	20,11
Optimash TBG*	0,72 ml	2,45	19,26	3,42	25,12
Accellerase XY	0,4 ml	6	10,9	0	17,3
Accellerase XC**	1,2 ml	3,7	3,64	0,48	11,8

* La hidrólisis se realizó a pH 4 (en vez de pH 5) y a 50°C ((en vez de 60°C)
 ** La hidrólisis se realizó durante 6 horas (en vez de 24 horas).

La presente invención no tiene un alcance limitado por las formas de ejecución específicas aquí descritas. De hecho para los expertos en la materia serán evidentes varias modificaciones de la presente invención aparte de las descritas en este documento según la descripción anterior y las figuras adjuntas. Está previsto que dichas modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, en líneas generales, todas las formas de ejecución aquí descritas se consideran aplicables y combinables con cualquiera y todas las demás formas de ejecución consecuentes, según corresponda.

REIVINDICACIONES

1. Método para elaborar un producto de alimentación animal que comprende, como parte de un proceso existente de producción de bioetanol:

a) la hidrólisis parcial del producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable; una hidrólisis parcial que convierte polisacáridos no amiláceos en oligómeros y monómeros solubles, en la cual el producto secundario no etanólico de un proceso de fermentación realizado con un material de partida fermentable es un residuo de destilación de la producción de etanol o un derivado del mismo;

b) la fermentación de los oligómeros y monómeros solubles del producto secundario no etanólico parcialmente hidrolizado para la obtención de más etanol, en comparación con el obtenido mediante el proceso existente de producción de bioetanol;

c) la recuperación del producto secundario no etanólico de la fermentación de la etapa b) para elaborar un producto de alimentación animal con mejor contenido nutricional.

2. El método de la reivindicación 1, en el cual:

a) el material de partida fermentable comprende un material vegetal que contiene hemicelulosa y/o,

b) la hidrólisis parcial alcanza un 75% aproximadamente de la hidrólisis total de los polisacáridos no amiláceos y/o,

c) los polisacáridos no amiláceos contienen al menos un 50% de hemicelulosa y/o,

d) los oligómeros y monómeros solubles comprenden azúcares pentosas y opcionalmente los azúcares pentosas llevan xilosa y/o arabinosa.

3. El método según cualquier reivindicación anterior, en el cual:

a) el residuo de destilación es líquido o sólido y/o,

b) el producto de alimentación animal contiene grano de destilería, grano seco de destilería, solubles de destilería, granos secos de destilería con solubles y/o vinaza.

4. El método según cualquier reivindicación anterior, en el cual la hidrólisis parcial se lleva a cabo química y/o enzimáticamente y cuando la hidrólisis parcial es opcionalmente de tipo químico se usa un ácido que puede ser ácido sulfúrico, ácido nítrico o ácido clorhídrico.

5. El método según la reivindicación 4, en el cual:

a) el ácido se usa a una concentración aproximada del 0,5-5% y/o,

b) el ácido se usa a una temperatura comprendida aproximadamente entre 100 y 150°C y/o,

c) el ácido se usa durante un periodo de tiempo comprendido entre unos 20 y 120 minutos.

6. El método de la reivindicación 5, en el cual el enzima o enzimas comprenden una hemicelulasa y/o una celulasa.

7. El método según cualquier reivindicación anterior, en el cual la fermentación de los oligómeros y monómeros solubles en la etapa b) se realiza en condiciones parcialmente aeróbicas, que opcionalmente se consiguen inyectando aire.

8. El método según cualquier reivindicación anterior, en el cual la fermentación de los oligómeros y monómeros solubles en la etapa b) tiene lugar mediante una bacteria termófila, de modo que opcionalmente:

a) la bacteria termófila carece de actividad de lactato deshidrogenasa y/o,

b) la bacteria termófila expresa una formiato deshidrogenasa heteróloga ligada a y/o,

c) la bacteria termófila es del género *Geobacillus* y opcionalmente el *Geobacillus* comprende *Geobacillus thermoglucosidasius* o *Geobacillus stearothermophilus*.

9. El método según cualquier reivindicación anterior, en el cual el etanol producido en la etapa b) se elimina por evaporación o destilación.

10. El método de cualquier reivindicación anterior, en el cual la recuperación del producto secundario no etanólico de fermentación en la etapa c) comprende:

(a) la separación centrífuga del residuo líquido y de la torta húmeda de los residuos sólidos de destilación

(b) la evaporación del residuo líquido

(c) la recombinación del jarabe resultante de la evaporación con la torta húmeda

(d) el secado del material recombinado para obtener un producto seco

11. El método de cualquier reivindicación anterior, en el cual la recuperación del producto secundario no etanólico de fermentación en la etapa c) comprende el secado de los residuos de destilación o residuo sólido para obtener un producto seco.
- 5 12. El método de cualquier reivindicación anterior, en el cual el contenido nutricional mejorado comprende uno o más niveles reducidos de azúcares pentosas, mayor concentración de proteínas, menor concentración de fibra, niveles reducidos de oligómeros y monómeros solubles y menores niveles de azúcares reductores.
- 10 13. Un producto de alimentación animal elaborado según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. El producto de alimentación animal según la reivindicación 13, en el cual el producto contiene menos del 10% en peso de hemicelulosa o del 5% en peso de azúcares pentosas.

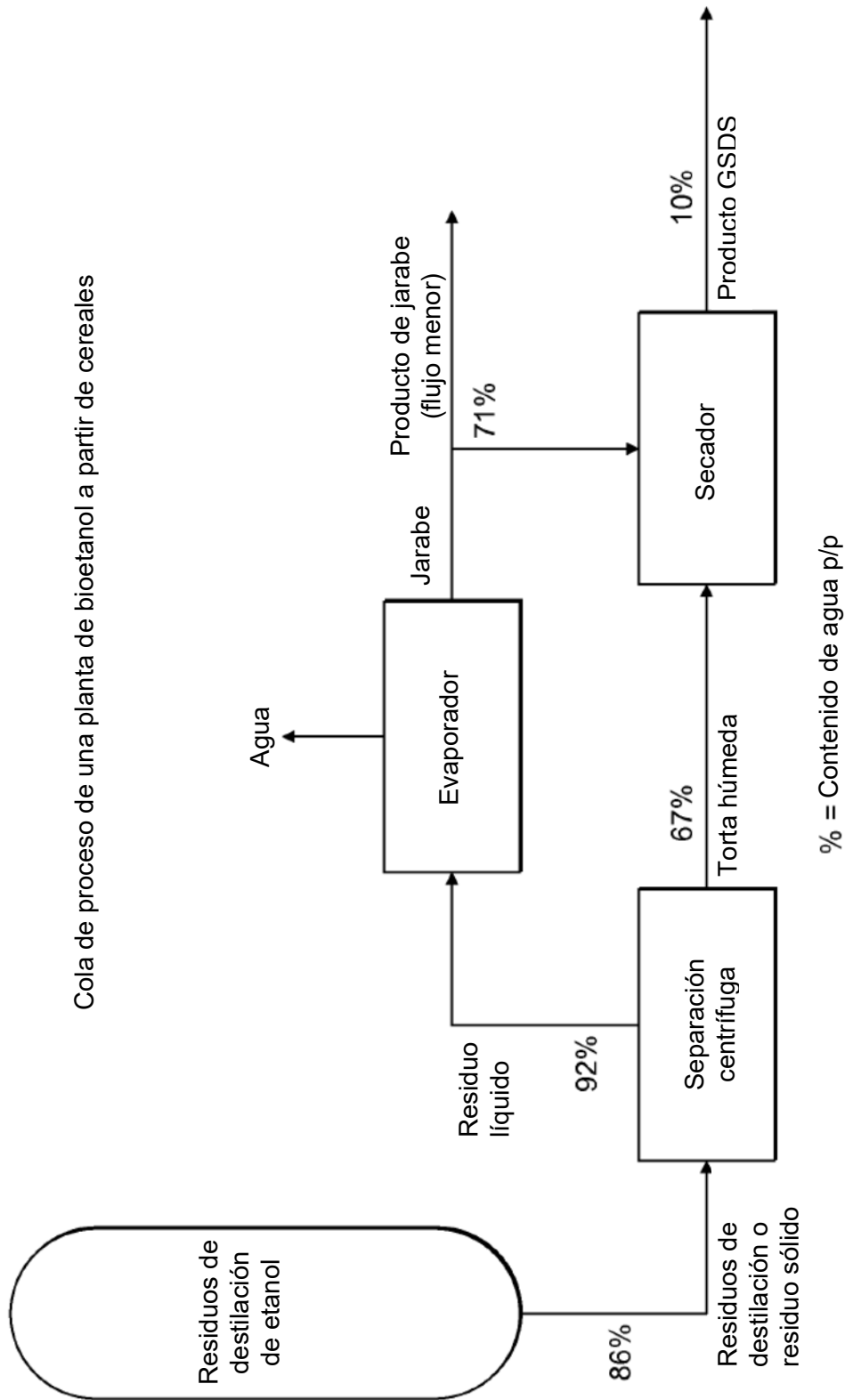


FIG. 1

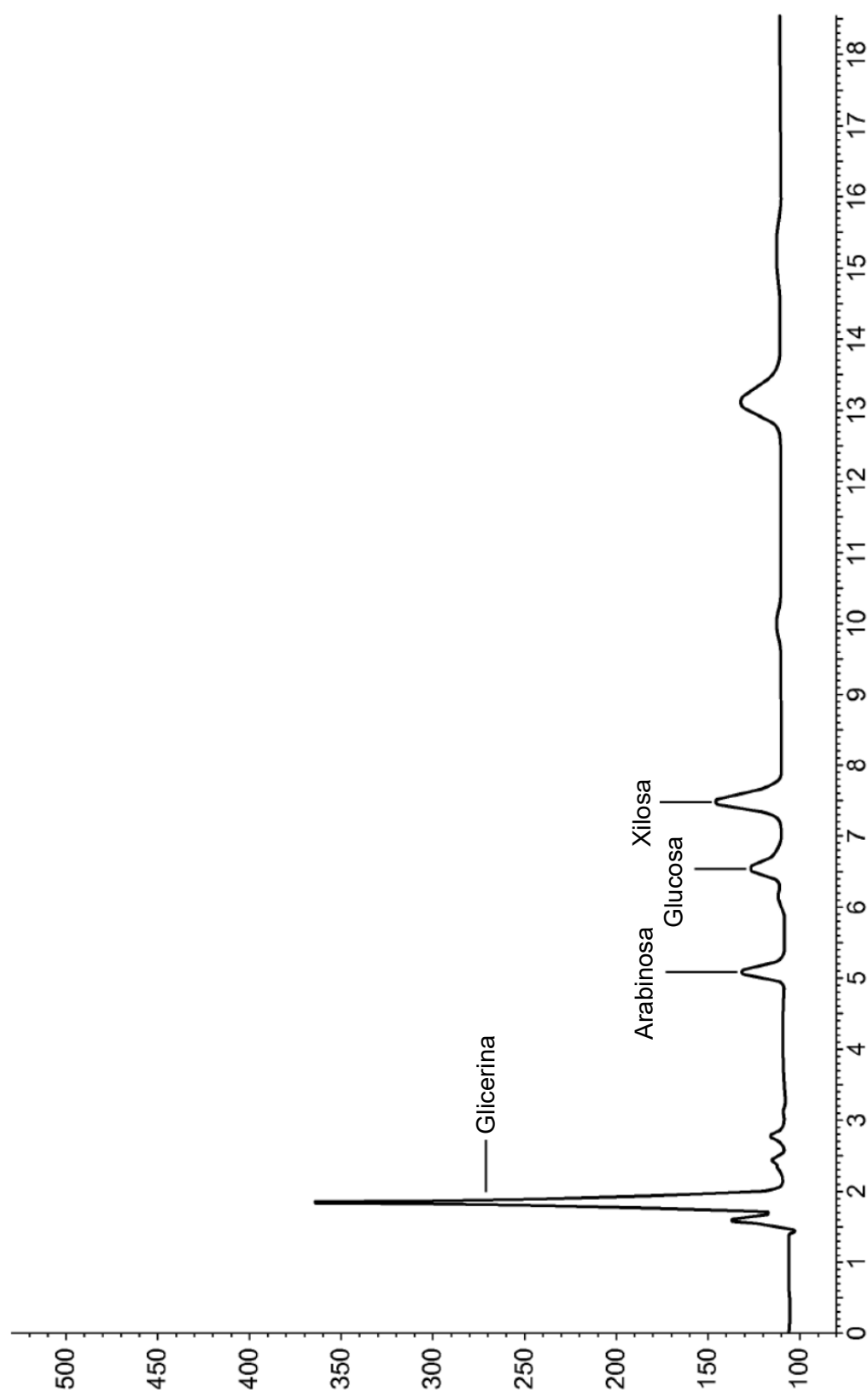


FIG. 2

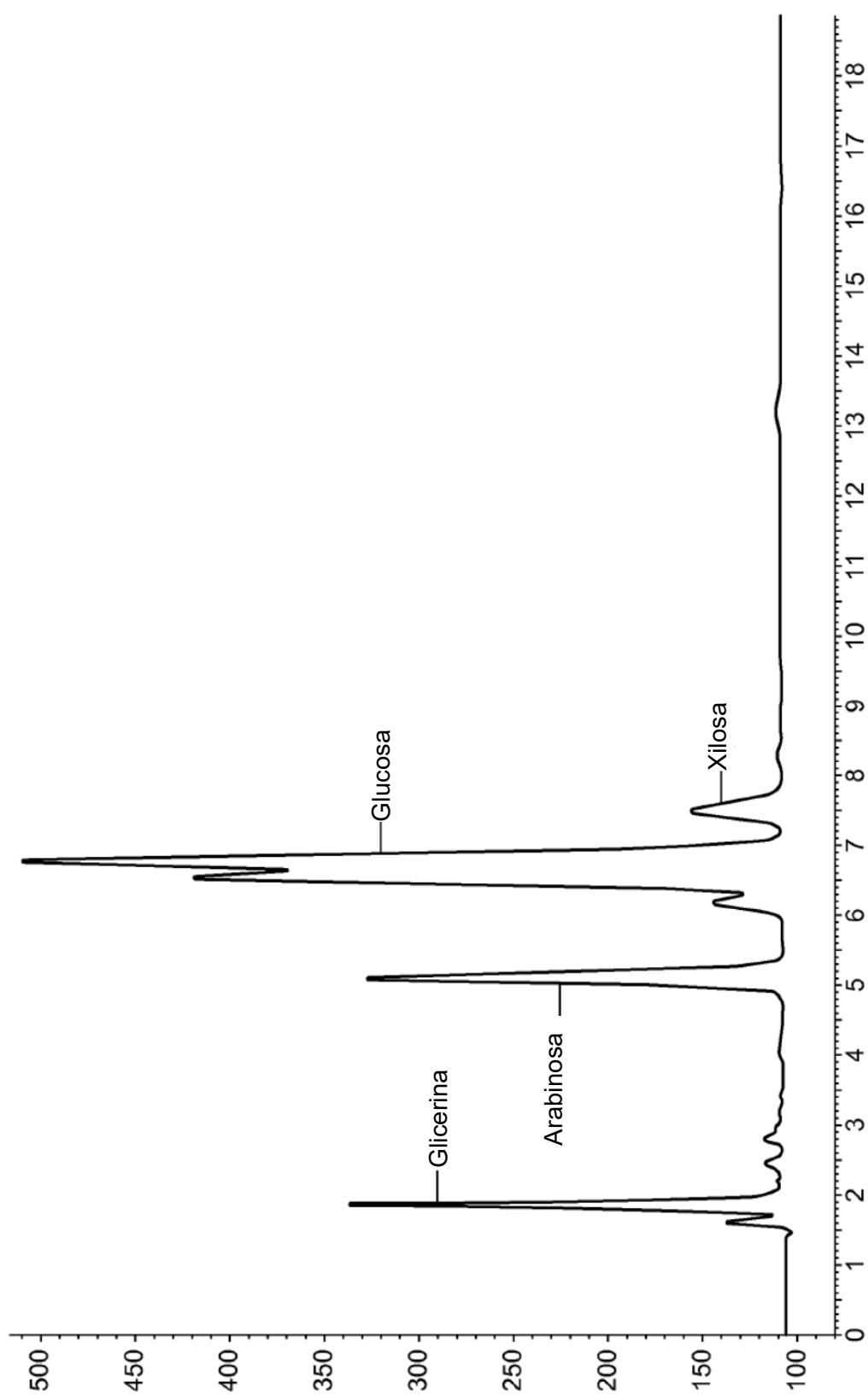


FIG. 3

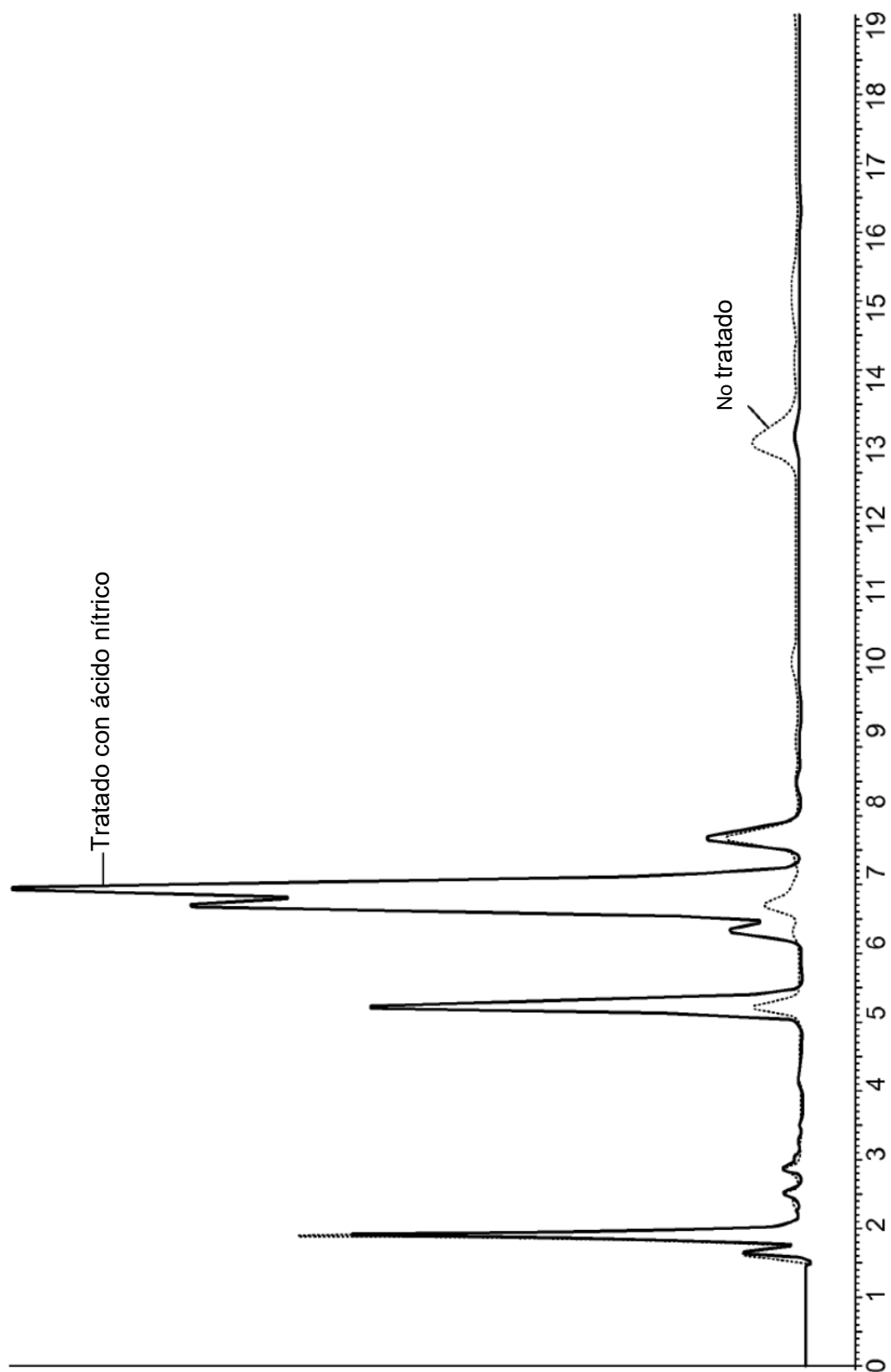


FIG. 4

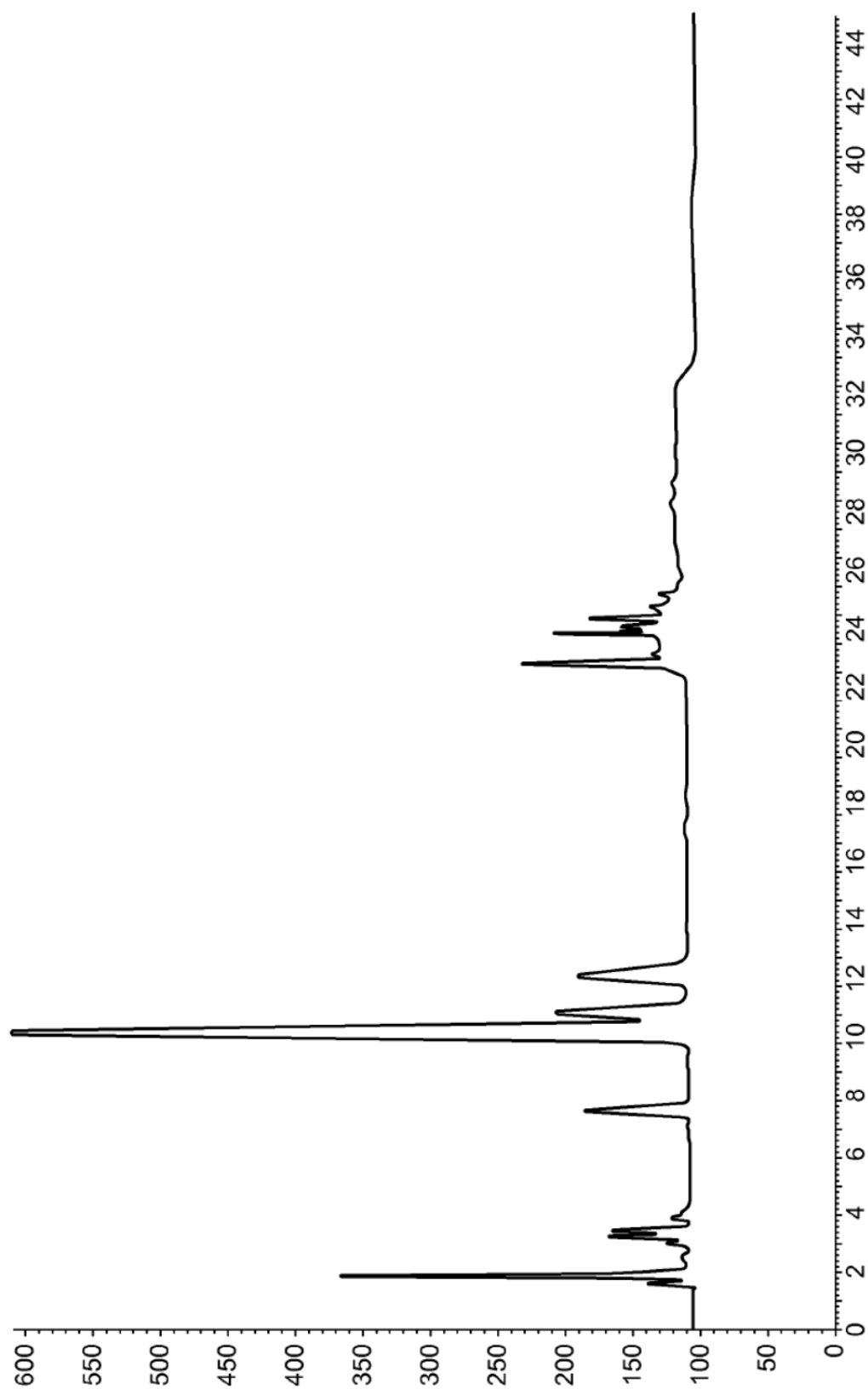


FIG. 5

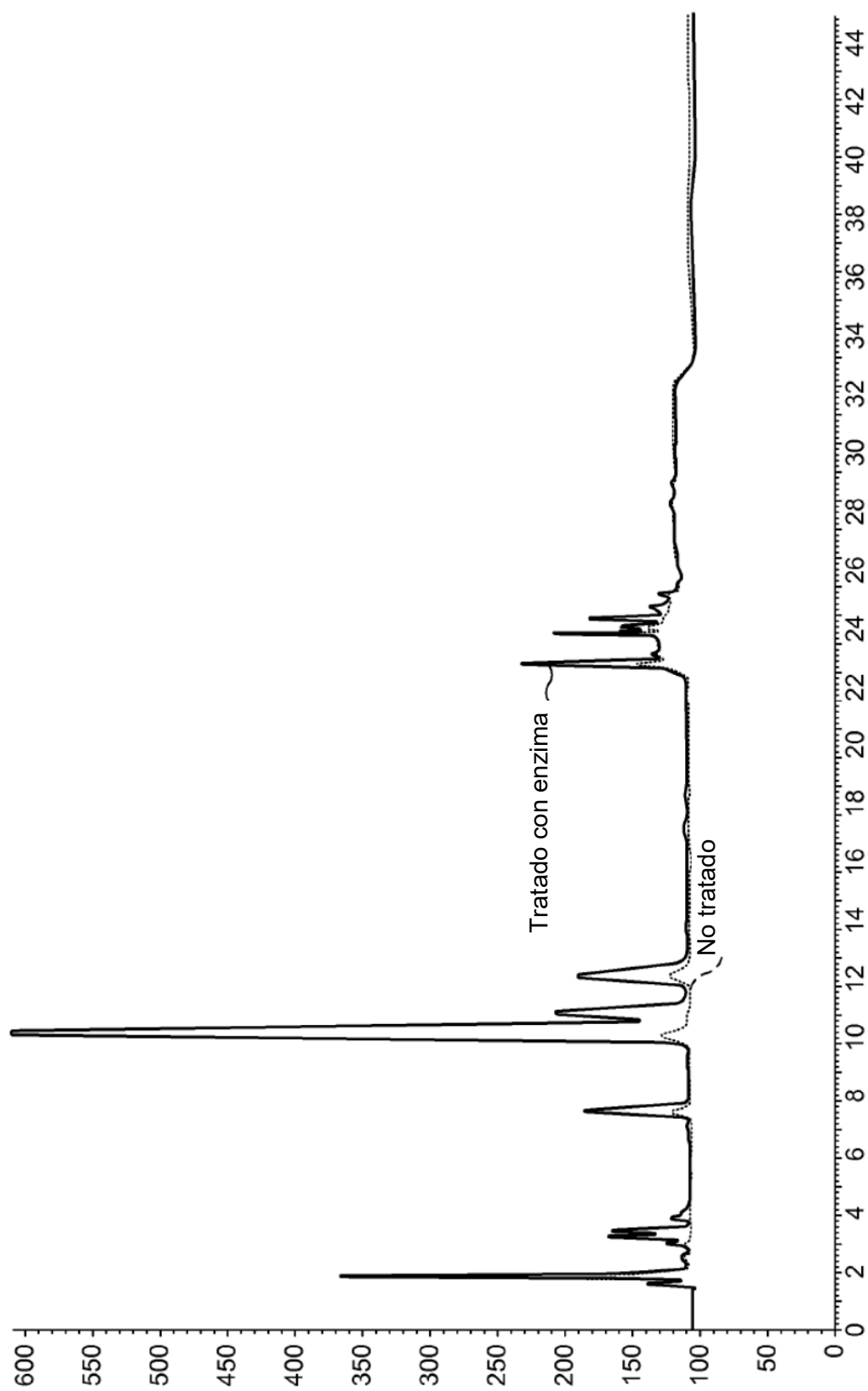


FIG. 6