

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 746**

51 Int. Cl.:

**C02F 3/34** (2006.01)

**C02F 11/16** (2006.01)

**A23K 10/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2006 PCT/US2006/043246**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2007 WO07056321**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2006 E 06827583 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 1948569**

54 Título: **Deshidratación de vinaza total**

30 Prioridad:

**08.11.2005 US 734449 P**

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

**28.11.2018**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (100.0%)  
77 Perry Chapel Church Road  
Franklinton, North Carolina 27525, US**

72 Inventor/es:

**JUMP, JOSEPH;  
DELOZIER, GREGORY y  
LIU, JIYIN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 691 746 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**

Deshidratación de vinaza total

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento de deshidratación enzimática de vinaza total derivada de un proceso de producción de producto de fermentación, donde la vinaza total se deriva de un proceso de producción de etanol que utiliza material que contiene almidón como materia prima.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los productos de fermentación, tales como el etanol, se producen degradando primero material que contiene almidón en azúcares fermentables por licuefacción y sacarificación y luego convirtiendo los azúcares directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado utilizando un organismo fermentador. Los productos de fermentación líquidos se recuperan del triturado fermentado (frecuentemente referido como "triturado de cerveza"), por ejemplo, por destilación, que separa el producto de fermentación deseado de otros líquidos y/o sólidos. La fracción restante, referida como "vinaza total", se deshidrata y separa en una fase sólida y una fase líquida, por ejemplo, por centrifugación. La fase sólida es referida como "torta húmeda" (o "granos húmedos") y la fase líquida (sobrenadante) es referida como "vinaza ligera". La torta húmeda deshidratada se seca para proporcionar "granos secos de destilería" (DDG) usados como nutriente en el pienso para animales. La vinaza ligera se evapora típicamente para proporcionar condensado y jarabe o se puede reciclar alternativamente directamente al tanque de lodo como "agua de proceso". El condensado se puede o bien reenviar a un metanador antes de ser descargado o bien se puede reciclar al tanque de lodo. El jarabe que consiste principalmente en dextrinas límites y azúcares no fermentables se puede mezclar en DDG o añadirse a la torta húmeda antes del secado para producir DDGS (granos secos de destilería con solubles).

[0003] La solicitud de patente de EE. UU. N.º 2005/0079270 A1 divulga un método de deshidratación de sólidos de vinaza de maíz que comprende añadir a los sólidos un copolímero aniónico que comprende sal de sodio de ácido acrílico, sal de sodio de ácido metacrílico o sal de sodio de ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico para formar una mezcla de agua y sólidos coagulados y floculados; y separar el agua de los sólidos coagulados y floculados utilizando un dispositivo de deshidratación.

[0004] La deshidratación de vinaza total demanda energía y puede consumir hasta un tercio del requisito de energía de una planta de producción de etanol o un producto de fermentación similar. Por lo tanto, hay una necesidad de mejorar los procesos implicados en la deshidratación de vinaza total.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

40 [0005] La fig. 1 muestra esquemáticamente un proceso de producción de etanol.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0006] El objeto de la presente invención es proporcionar un método de deshidratación de vinaza total tal y como se define en la reivindicación 1. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que someter vinaza total a enzimas capaces de degradar componentes de vinaza total mejora la separación de sólido-líquido y aumenta así el contenido sólido en la torta húmeda después de la centrifugación en comparación con un método correspondiente realizado sin la presencia de enzima. Las enzimas usadas para degradar componentes de vinaza total incluyen carbohidrasas tales como alfa-amilasa, glucoamilasa, celulasa y/o hemicelulasa, tales como xilanasas y beta-glucanasa, pectinasa, y proteasa, o una mezcla de las mismas. El ejemplo 1 muestra que someter vinaza total a una o más enzimas capaces de degradar componentes de vinaza total aumenta el porcentaje de sólidos en la torta húmeda después de la centrifugación. Esto es ventajoso dado que el coste de energía de secar la torta húmeda se reduce al producir DDG o DDGS. El coste de transportar la torta húmeda de una posición a otra también se reduce. Además, la necesidad de mantenimiento y reparación de centrifugadoras, secadoras y otro equipo usado también se reduce. En resumen, el coste de producción se reduce. Los ejemplos 2 y 3 también revelan deshidratación enzimática con enzimas capaces de degradar al menos un componente de vinaza total.

[0007] Por lo tanto, la invención se refiere a un método de deshidratación de vinaza total que incluye los pasos de:

- i) someter la vinaza total derivada de un proceso de producción de etanol que utiliza material que contiene almidón como materia prima a una o más carbohidrasas seleccionadas del grupo que consiste en amilasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa, pectinasa, mananasa y proteasa, capaces de degradar uno o más componentes de vinaza total,
- ii) separar el material en una fracción sólida y una fracción líquida.

[0008] La fracción sólida es frecuentemente referida como "torta húmeda" y la fracción líquida es frecuentemente referida como "vinaza ligera". Los pasos i) y ii) se pueden realizar simultáneamente o consecutivamente.

5 Vinaza total y producción de productos de fermentación

[0009] El método de la invención se usa en la vinaza total derivada de la producción de etanol. La materia prima para producir el producto de fermentación es material que contiene almidón, preferiblemente material vegetal que contiene almidón, que incluye: tubérculos, raíces, grano entero; y cualquier combinación de los mismos. El material que contiene almidón se puede obtener de cereales. El material que contiene almidón adecuado incluye maíz, trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, patata, o cualquier combinación de los mismos. El maíz es la materia prima preferida, cuando el producto de fermentación es etanol. El material que contiene almidón también puede consistir en o comprender, por ejemplo, un flujo secundario de tratamiento de almidón, por ejemplo, flujos de proceso que contienen carbohidrato C<sub>6</sub> que pueden no ser adecuados para la producción de jarabes. La vinaza total contiene típicamente aproximadamente 10-15 % en peso de sólidos secos. Los componentes de vinaza total incluyen fibra, cáscara, germen, aceite y componentes de proteína de la materia prima que contiene almidón, así como almidón no fermentado.

[0010] La producción de un producto de fermentación se divide típicamente en los siguientes pasos de proceso principales:

- a) Reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, por ejemplo, por molido en seco o en húmedo;
- b) Cocer el material que contiene almidón en lodo acuoso para gelatinizar el almidón,
- c) Licuar el material que contiene almidón gelatinizado para descomponer el almidón (por hidrólisis) en maltodextrinas (dextrinas);
- d) Sacarificar las maltodextrinas (dextrinas) para producir azúcares de bajo peso molecular (por ejemplo, DP<sub>1-2</sub>) que se pueden metabolizar por un organismo fermentador;
- e) Fermentar el material sacarificado utilizando un organismo fermentador adecuado convirtiendo directa o indirectamente los azúcares de bajo peso molecular en el producto de fermentación deseado;
- f) Recuperar el producto de fermentación, por ejemplo, por destilación para separar el producto de fermentación del triturado de fermentación.

[0011] Como se explica también en el apartado "Antecedentes" anterior la vinaza total es un subproducto que consiste en líquidos y sólidos que permanecen después de la recuperación (por ejemplo, por destilación) de un producto de fermentación deseado de triturado fermentado (triturado de cerveza). Según la invención, el producto de fermentación es etanol.

[0012] La vinaza total contemplada según la invención puede ser el producto secundario resultante de un proceso de producción de producto de fermentación que incluye los pasos a) a f) anteriormente mencionados.

Deshidratación de vinaza total

[0013] La deshidratación de vinaza total, para eliminar una porción significativa del líquido/agua, se puede hacer según la invención (paso ii) utilizando cualquier técnica de separación adecuada, entre las que se incluyen centrifugación, presión y filtración. En una forma de realización, la vinaza total se calienta a una temperatura de aproximadamente 20-60 °C o alrededor del valor óptimo de la(s) enzima(s) en cuestión. El pH está en el rango de 3-7, preferiblemente pH 3-6. En general el tratamiento enzimático de vinaza total se realiza bajo condición adecuada para la(s) enzima(s) en cuestión.

[0014] En una forma de realización preferida, la deshidratación se realiza por centrifugación. Las centrifugadoras preferidas en la industria de hoy son centrifugadoras de tipo decantador, preferiblemente centrifugadoras de tipo decantador de alta velocidad. Un ejemplo de una centrifugadora adecuada es la NX 400 steep cone series de Alfa Laval, que es un decantador de alto rendimiento.

[0015] En otra forma de realización preferida, la separación se realiza usando otro equipo de separación convencional tal como unas prensas de filtro de placa/bastidor, prensas de filtro de correa, prensas de tornillo, espesantes y drenajes por gravedad, o equipo similar.

60 Secado de torta húmeda

[0016] Después de que la torta húmeda, que contiene aproximadamente el 30-35 % en peso de sólidos secos, se haya deshidratado, se puede secar en una secadora de tambor, secadora de pulverización, secadora de anillo, secadora de lecho fluido o similares para producir "granos secos de destilería" (DDG). Los DDG son un ingrediente de pienso valioso para ganado, aves y pescados. Se prefiere proporcionar DDG con un contenido inferior a aproximadamente el 10-12 % en peso de humedad para evitar el moho y la descomposición microbiana

y aumentar el tiempo de conservación. Además, el alto contenido de humedad también hace que sea más caro transportar los DDG. La torta húmeda se seca preferiblemente bajo condiciones que no desnaturalizan las proteínas en la torta húmeda. La torta húmeda se puede mezclar con jarabe separado de la fracción de vinaza ligera y secarse en DDG con solubles (DDGS).

#### 5 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS USADAS PARA TRATAR VINAZA TOTAL

[0017] Una o varias de las siguientes actividades enzimáticas se pueden utilizar según la invención para tratar vinaza total para aumentar el contenido de sólidos en la torta húmeda. Según la invención, la(s) enzima(s) incluye(n) una o más carbohidrasas.

#### 10 Alfa-amilasas

[0018] El método de la invención, incluido el paso i), se puede realizar utilizando cualquier alfa-amilasa adecuada. En una forma de realización preferida, se pueden utilizar una alfa-amilasa bacteriana y/o una alfa-amilasa fúngica. La alfa-amilasa se puede adicionar en una cantidad eficaz, preferiblemente en el rango de 0,001-1 mg de proteína enzimática por g de DS (en la vinaza total), preferiblemente 0,01-0,5 mg de proteína enzimática por g de DS.

#### 20 Alfa-amilasas bacterianas

[0019] Ejemplos de alfa-amilasas adecuadas incluyen las mencionadas a continuación. Las alfa-amilasas bacterianas preferidas usadas en el paso i) se pueden derivar a partir de una cepa del género *Bacillus* (a veces referido como *Geobacillus*), que incluye una cepa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, o *Bacillus subtilis*. Otras alfa-amilasas bacterianas incluyen alfa-amilasa derivada a partir de una cepa de la especie *Bacillus* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas las cuales se describen con detalle en WO 95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31. La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrida, especialmente una descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa específicamente contempladas se describen en las patentes de EE. UU. N.º 6,093,562, 6,297,038 o la patente de EE. UU. N.º 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con una delección de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una doble delección descrita en WO 1996/023873, véase, por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID N.º: 3 descrita en WO 99/19467 o la delección de los aminoácidos R179 y G180 usando la SEQ ID N.º: 3 en WO 99/19467 para la numeración. Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una doble delección que corresponde con delta(181-182) y además comprenden una sustitución N193F (denominada también I181\* + G182\* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID N.º: 3 descrita en WO 99/19467.

[0020] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEQ ID N.º: 4 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en la SEQ ID N.º: 5 de WO 99/19467), con la sustitución siguiente: G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de la SEQ ID N.º: 4 en WO 99/19467). Especialmente preferidas son las variantes con una o más de las mutaciones H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente delección de E178 y G179 (utilizando la numeración de la SEQ ID N.º: 5 de WO 99/19467).

[0021] Los productos de alfa-amilasa bacteriana y productos que contienen alfa-amilasas disponibles comercialmente incluyen TERMAMYL™ SC, LIQUOZYME™ SC, BAN (Novozymes A/S, Dinamarca) DEX-LO™, SPEZYME™ ETHYL, SPEZYME™ XTRA, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ FRED-L, SPEZYME™ ALPHA, SPEZYME™ HPA y SPEZYME™ DELTA AA (de Genencor Int., EE. UU), ULTRA-THIN (Valley Research, IN, EE. UU). La alfa-amilasa se puede adicionar en una cantidad eficaz en el rango de  $0,0001 \times 10^6 - 1 \times 10^6$  KNU por sustrato de tonelada en seco (vinaza total).

#### 60 Alfa-amilasas fúngicas

[0022] Las alfa-amilasas fúngicas (EC 3.2.1.1) son preferiblemente de origen de fúngico filamentoso. La alfa-amilasa fúngica puede ser una alfa-amilasa ácida fúngica.

[0023] Las alfa-amilasas de ácido fúngico incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas a partir de una cepa del género *Aspergillus*, tales como las alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*.

[0024] Una alfa-amilasa fúngica preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que se deriva preferiblemente a partir de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente descripción, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una alta identidad, es decir, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 % o incluso el 100 % de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º: 10 en WO 96/23874.

[0025] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva a partir de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *A. niger* descrita como "AMYA\_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el n.º de acceso primario P56271 y descrita con más detalle en WO 89/01969 (ejemplo 3). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* ácido se muestra también como la SEQ ID N.º: 1 en WO 2004/080923 (Novozymes). También se contemplan variantes de dicha amilasa fúngica con al menos el 70 % de identidad, tal como al menos el 80 % o incluso al menos el 90 % de identidad, tal como al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID N.º: 1 en WO 2004/080923. Una alfa-amilasa fúngica ácida disponible comercialmente adecuada derivada a partir de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0026] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, un no híbrido), o una variante de los mismos. En una forma de realización, la alfa-amilasa fúngica ácida de tipo salvaje se deriva a partir de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

[0027] Las composiciones disponibles comerciales que comprenden alfa-amilasa fúngica incluyen FUNGAMYL™ y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0028] En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Los ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las descritas en WO 2005/003311 o la publicación de patente de EE. UU. N.º 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente de EE. UU. N.º 60/638,614 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a almidón, y opcionalmente un enlazador.

[0029] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en las tablas 1 a 5 de los ejemplos en la solicitud de patente de EE. UU. copendiente N.º 60/638,614, que incluye variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N.º: 2 en este documento y SEQ ID N.º: 100 en US 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG de *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID N.º: 3 en este documento y SEQ ID N.º: 101 en US 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD (que se describe en la tabla 5 como una combinación de las secuencias de aminoácidos SEQ ID N.º: 20, SEQ ID N.º: 72 y SEQ ID N.º: 96 de la solicitud de EE. UU. N.º 11/316,535 y además como la SEQ ID N.º: 13 en este documento), y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID N.º: 4 en este documento y SEQ ID N.º: 102 en US 60/638,614). Otras alfa-amilasas híbridas específicamente contempladas son cualquiera de las mencionadas en las tablas 3, 4, 5, y 6 en el ejemplo 4 en la solicitud de EE. UU. N.º 11/316,535 o (WO 2006/069290). Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2005/0054071, que incluyen las descritas en la tabla 3 en la página 15, tales como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión a almidón.

[0030] Las alfa-amilasas fúngicas se pueden adicionar en una cantidad eficaz, preferiblemente en el rango de 0,001-1 mg de proteína enzimática por g de DS (en la vinaza total), preferiblemente 0,01-0,5 mg de proteína enzimática por g de DS.

#### Glucoamilasa

[0031] El método de la invención, incluido el paso i), se puede realizar utilizando cualquier glucoamilasa adecuada. En una forma de realización preferible, la glucoamilasa es de origen bacteriano o fúngico.

[0032] La glucoamilasa se puede adicionar en una cantidad eficaz, preferiblemente en el rango de 0,001-1 mg de proteína enzimática por g de DS, preferiblemente 0,01-0,5 mg de proteína enzimática por g de sustrato seco.

[0033] Las glucoamilasas contempladas incluyen aquellas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *A. niger* G1 o G2 (Boel *et al.* (1984), EMBO J. 3 (5), págs. 1097-1102), o variantes de la misma, tales como las descritas en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), págs. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen *et al.*

(1996), Prot. Eng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al.* (1995), Prot. Eng. 8, 575-582); N182 (Chen *et al.* (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe *et al.* (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li *et al.* (1997), Protein Eng. 10, 1199-1204.

5 [0034] Otras glucoamilasas contempladas incluyen glucoamilasa derivada a partir de una cepa de *Athelia*, preferiblemente una cepa de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (denominada previamente *Corticium rolfsii*) (véase la patente de EE. UU. N.º 4,727,026 y (Nagasaka, Y. *et al.* (1998) "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamilasas from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol Biotechnol 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas a partir de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE. UU. N.º Ref. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente de EE. UU. N.º 4,587,215). También se contemplan las glucoamilasas de *Trichoderma reesei* descritas como la SEQ ID N.º: 4 en WO 2006/060062 y las glucoamilasas que son al menos el 80 % o al menos el 90 % idénticas a ellas y además la glucoamilasa derivada a partir de *Humicola grisea* descrita como la SEQ ID N.º: 3 en US 10/992,187 o secuencias con al menos el 80 % o al menos el 90 % de identidad con la misma.

15 [0035] Otras glucoamilasas contempladas incluyen glucoamilasa derivada a partir de una cepa de *Trametes*, preferiblemente una cepa de *Trametes cingulata* descrita en WO 2006/069289. Glucoamilasas híbridas también se contemplan según la invención. Ejemplos las glucoamilasas híbridas descritas en WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1. Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

20 [0036] Las composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

25 [0037] Las glucoamilasas se pueden adicionar en una forma de realización en una cantidad de 0,02-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,05-5 AGU/g de DS (en la vinaza total), especialmente entre 0,1-2 AGU/g de DS.

### 30 Celulasas y hemicelulasas

#### Celulasa

35 [0038] Una celulasa, usada según la invención, puede ser cualquier celulasa, en particular de origen microbiano, en particular origen fúngico u origen bacteriano, tal como una celulasa derivable a partir de una cepa de un hongo filamentoso (por ejemplo, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*). Preferiblemente, la celulasa actúa tanto en material celulósico como lignocelulósico. Las celulasas preferidas para el uso en la presente invención incluyen celulasas de acción exo y celobiasas, y combinaciones de las mismas. Más preferiblemente, el tratamiento implica la combinación de una celulasa de acción exo y una celobiasa. Preferiblemente, las celulasas tienen la capacidad de hidrolizar celulosa o lignocelulosa bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

40 [0039] Ejemplos de celulasas disponibles comercialmente adecuadas según la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLULCLAST™ (disponible de Novozymes A/S), NOVOZYM™ 188 (disponible de Novozymes A/S). Otras preparaciones disponibles comercialmente que comprenden celulasa incluyen CELLUZYME™, CEREFLO™ y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAMINEX™ y SPEZYME™ CP (Genencor Int.) y ROHAMENT™ 7069 W (de Röhm GmbH). La celulasa se puede adicionar en cantidades eficaces en el rango de  $0,1 \times 10^5$  -  $10 \times 10^6$  ECU por sustrato de tonelada en seco (en la vinaza total) o de  $0,1 \times 10^5$  -  $10 \times 10^6$  EGU por sustrato de tonelada en seco (en la vinaza total).

#### 50 Hemicelulasa

[0040] Cualquier hemicelulasa capaz de degradar un componente de vinaza total se puede usar según la invención en el paso i). Las hemicelulasas preferidas para el uso en la presente invención incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, esterasa de xilano de acetilo, glucuronidasas, endo-galactanasas, manasas, endo o exo arabinasas, exo-galactanasas, y mezclas de las mismas. Preferiblemente, la hemicelulasa para el uso en la presente invención es una hemicelulasa de actuación exo, y más preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa de actuación exo que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7. Un ejemplo de hemicelulasa adecuada para el uso en la presente invención incluye VISCOZYME L™ (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca). La hemicelulasa se puede adicionar en una cantidad eficaz en el rango de  $0,001 \times 10^5$  -  $10 \times 10^6$  FBG por sustrato de tonelada en seco (en la vinaza total).

#### Xilanasas

65 [0041] Según la invención, la vinaza total en el paso i) se puede someter a una cantidad eficaz de cualquier xilanasas (EC 3.2.1.8), tal como cualquiera de las xilanasas mencionadas a continuación. La actividad de xilanasas

se puede derivar de cualquier organismo adecuado, incluidos organismos fúngicos y bacterianos. Las xilanasas fúngicas se pueden derivar de cepas de géneros que incluyen *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium* y *Trichoderma*.

5 [0042] Ejemplos de xilanasas adecuadas incluyen xilanasas derivadas a partir de *H. insolens* (WO 92/17573; *Aspergillus tubigensis* (WO 92/01793); *A. niger* (Shei *et al.*, 1985, Biotech. y Bioeng. Vol. XXVII, págs. 533-538, y Fournier *et al.*, 1985, Bio-tech. Bioeng. Vol. XXVII, págs. 539-546; WO 91/19782 y EP 463 706); *A. aculeatus* (WO 94/21785).

10 [0043] Ejemplos de xilanasas bacterianas adecuadas incluyen xilanasas derivadas a partir de una cepa de *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*, tal como la descrita en la patente de EE. UU. N.º 5,306,633 o *Bacillus agaradhaerens*, que incluye *Bacillus agaradhaerens* AC13 descrita en WO 94/01532, una cepa de *Bacillus pumilus*, tal como la descrita en WO 95/182109, una cepa derivada a partir de *Bacillus stearothermophilus*, tal como la descrita en WO 95/182109.

15 [0044] En una forma de realización específica la xilanasas es xilanasas I, II o III descrita en WO 94/21785. Se prefiere la xilanasas II de *Aspergillus aculeatus*.

20 [0045] Las xilanasas disponibles comercialmente contempladas incluyen SHEARZYME™, BIOFEED WHEAT™, PULPZYME™ HC (de Novozymes A/S), BioBrite™ EB (de logen, Canadá) y SPEZYME™ CP (de Genencor Int.). La xilanasas se puede adicionar en una cantidad eficaz en el rango de  $0,001 \times 10^6$  -  $10 \times 10^6$  FXU por sustrato de tonelada en seco (en la vinaza total).

#### Mananasa

25 [0046] Las mananastas son hemicelulasas clasificadas como EC 3,2,1,78, y llamadas endo-1,4-beta-manosidasas. La mananasa incluye beta-mananasa, endo-1,4-mananasa, y galacto-mananasa. La mananasa es preferiblemente capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-manosídicos en mananos, incluidos glucomananos, galactomananos y galactoglu-comananos. Los mananos son polisacáridos principalmente o  
30 totalmente compuestos por unidades de D-manosa. La mananasa puede ser de cualquier origen tal como una bacteria o un organismo fúngico.

[0047] En una forma de realización específica, la mananasa se deriva a partir de una cepa del género de hongo filamentoso *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus niger* o *Aspergillus aculeatus* (WO 94/25576). WO 93/24622  
35 divulga una mananasa aislada de *Trichoderma reseei* útil para blanquear pulpas lignocelulósicas.

[0048] Las mananastas se han sido identificado en diferentes organismos de *Bacillus*. Por ejemplo, Talbot *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 56, n.º 11, págs. 3505-3510 (1990) describe una beta-mananasa derivada a partir de *Bacillus stearothermophilus*. Mendoza *et al.*, World J. Microbiol. Biotech., Vol. 10, N.º 5, págs. 551-555 (1994)  
40 describe una beta-mananasa derivada a partir de *Bacillus subtilis*. JP-A-03047076 divulga una beta-mananasa derivada a partir de la especie *Bacillus*. JP-A-63056289 describe la producción de una beta-mananasa alcalina termoestable. JP-A-63036775 se refiere al microorganismo de *Bacillus* FERM P-8856 que produce beta-mananasa y beta-manosidasas. JP-A-08051975 divulga beta-mananastas alcalinas de la especie *Bacillus alcalofílica* AM-001. Una mananasa purificada de *Bacillus amyloliquefaciens* se describe en WO 97/11164. WO  
45 91/18974 describe una hemicelulasa tal como una glucanasa, xilanasas o mananasa activa.

[0049] Ejemplos de mananastas disponibles comercialmente incluyen GAMANASE™ disponible de Novozymes A/S Dinamarca.

50 [0050] La mananasa se puede adicionar en una cantidad eficaz en el rango de  $0,01 \times 10^9$  -  $10 \times 10^9$  VHCU por sustrato de tonelada en seco (en la vinaza total).

#### Pectinasa

55 [0051] La pectinasa puede ser cualquier pectinasa, en particular de origen microbiano, en particular de origen bacteriano, tal como una pectinasa derivada a partir de una especie de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia*, o de origen fúngico, tal como una pectinasa derivada a partir de una especie de los géneros *Aspergillus*, en particular a partir de una cepa de las especies *A. niger* y *A. aculeatus*. Las pectinastas disponibles comercialmente contempladas incluyen BIO-PREP™, NOVOZYM™ 863, PECTINEX™  
60 3XL, PECTINEX™ SMASH, y PECTINEX™ SMACH XXL, BIOCIP™ MEMBRANE (todas disponibles de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0052] La pectinasa se puede adicionar en una cantidad eficaz en el rango de  $0,01 \times 10^6$  -  $10 \times 10^6$  PECTU por sustrato de tonelada en seco (en la vinaza total)

Proteasas

5 [0053] Según un proceso de la invención, una cantidad eficaz de proteasa puede estar presente en el paso i). Las proteasas son bien conocidas en la técnica y se refieren a enzimas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos. Las proteasas adecuadas incluyen proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

10 [0054] Las proteasas fúngicas ácidas adecuadas incluyen proteasas fúngicas derivadas a partir de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Entomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Se contemplan especialmente las proteasas derivadas a partir de *Aspergillus niger* (véase, por ejemplo, Koaze *et al.*, (1964), Agr. Biol. Chem. Japón, 28, 216), *Aspergillus saitoi* (véase, por ejemplo, Yoshida, (1954) J. Agr. Chem. Soc. Japón, 28, 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida *et al.*, (1977) Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*, tal como proteasa pepA; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

15 [0055] Las proteasas comerciales incluyen GC 106™ y SPEZYME™ FAN (disponibles de Genencor, EE. UU.). Las proteasas bacterianas adecuadas, aunque son proteasas no ácidas, incluyen los productos disponibles comercialmente ALCALASE™ y NEUTRASE™ (disponibles de Novozymes A/S).

20 [0056] Preferiblemente, la proteasa es una proteasa de ácido aspártico, como se describe, por ejemplo, en Handbook of Proteolytic Enzymes, editado por A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, capítulo 270). Ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en R.M. Berka *et al.* Gene, 96, 313 (1990); (R.M. Berka *et al.* Gen, 125, 195-198 (1993)); y Gomi *et al.* Biosci. Biotech. Biochem. 57, 1095-1100 (1993). La proteasa se puede adicionar en una cantidad eficaz en el rango de  $0,0001 \times 10^6$ - $1 \times 10^6$  AU por sustrato de tonelada en seco (en la vinaza total).

25 [0057] La invención descrita y reivindicada en este documento no se debe limitar en su alcance por las formas de realización específicas descritas en este documento, ya que estas formas de realización se destinan como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención. Cualquier forma de realización equivalente se entiende que se incluye en el alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en este documento se harán aparentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente. Tales modificaciones también se entiende que se engloban en el alcance de las reivindicaciones anexas. En caso de conflicto, se regirá la presente descripción con las definiciones. La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no se deberían interpretar como que limitan el alcance de la invención.

## MATERIAL Y MÉTODOS

40

Enzimas:

[0058]

45 La celulasa DM es una preparación de celulasa multicomponente líquida derivada con celulasas derivada a partir de *Trichoderma reesei* y *Thielavia terrestris* y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

50 La celulasa CZ es una endoglucanasa EGV de *Humicola insolens* monocomponente y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

La celulasa C es una preparación de celulasa multicomponente líquida derivada a partir de *Trichoderma reesei* y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

55 La xilanasa HC es una xilanasa derivada a partir de *Bacillus agaradhaerens* descrita en WO 94/01532 y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

La xilanasa SZ es xilanasa derivada a partir de *Aspergillus aculeatus* descrita como XYL II en WO 94/21785 y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

60

Hemicelulasa VL: es un complejo multienzimático que contiene una amplia gama de carbohidrasas, que incluyen arabinanasa, celulasa, hemicelulasa, beta-glucanasa y xilanasa. La preparación enzimática se produce a partir de una cepa seleccionada de *Aspergillus aculeatus* y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

65

La mananasa GN es una mananasa derivada a partir de *Aspergillus niger* y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

5 La pectinasa BC es una preparación enzimática multiactiva de poligalacturonasa, glucoamilasa y pectinmetilesterasa y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

La beta-glucanasa CF es una beta-glucanasa derivada a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* y está disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

10 La beta-glucanasa BG es una beta-glucanasa derivada a partir de *Thermoascus aurantiacus* y disponible de Novozymes A/S.

15 La glucoamilasa SF es una glucoamilasa derivada a partir de una cepa de *Talaromyces emersonii* y se describe en WO9928448 y está disponible de Novozymes A/S.

La glucoamilasa TC es una glucoamilasa derivada a partir de *Trametes cingulata* descrita en la SEQ ID N.º: 2 de WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S.

20 La alfa-amilasa JA es una alfa-amilasa derivada a partir de *Rhizomucor pusillus* y descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290.

#### Determinación de actividad de alfa-amilasa (KNU)

##### 1. Ensayo Phadebas

25 [0059] La actividad de alfa-amilasa se determina por un método que emplea comprimidos de Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas (prueba de amilasa Phadebas®, suministrada por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón de color azul insoluble reticulado, que se ha mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia de tampón y se ha formado en comprimidos.

30 [0060] Para cada única medición un comprimido se suspende en un tubo que contiene 5 ml 50 mM de tampón Britton-Robinson (50 mM de ácido acético, 50 mM de ácido fosfórico, 50 mM de ácido bórico, 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza en un baño de agua a la temperatura de interés. La alfa-amilasa que se debe evaluar se diluye en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. 1 ml de esta solución de alfa-amilasa se añade a los 5 ml 50 mM de tampón Britton-Robinson. El almidón se hidroliza por la alfa-amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad de alfa-amilasa.

35 [0061] Es importante que la absorbancia a 620 nm medida después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de prueba) esté en el rango de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia. En este rango de absorbancia hay linealidad entre actividad y absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima se debe ajustar, por lo tanto, para cumplir este criterio. Bajo un conjunto específico de condiciones (condiciones de temperatura, pH, tiempo de reacción, tampón) 1 mg de una alfa-amilasa determinada hidrolizará una cierta cantidad de sustrato y se producirá un color azul. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de alfa-amilasa pura) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto dado de condiciones.

##### 2. Método alternativo

50 [0062] La actividad de alfa-amilasa se determina alternativamente por un método que utiliza el sustrato PNP-G7. PNP-G7 es una abreviatura de p-nitrofenil-alfa,D-maltoheptaosido es un oligosacárido bloqueado que se puede escindir mediante una endo-amilasa. Después de la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el equipo digiere el sustrato para liberar una molécula de PNP libre que tiene un color amarillo y, por lo tanto, se puede medir por espectrofotometría visible a longitud de onda lambda = 405 nm (400-420 nm). Los equipos que contienen sustrato PNP-G7 y alfa-glucosidasa se fabrican por Bohringer-Mannheim (N.º de cat. 1054635).

55 [0063] Para preparar el sustrato, una botella de sustrato (BM 1442309) se añade a 5 ml de tampón (BM1442309). Para preparar la alfa-glucosidasa, una botella de alfa-glucosidasa (BM 1462309) se añade a 45 ml de tampón (BM1442309). La solución de trabajo se hace mediante la mezcla de 5 ml de solución de alfa-glucosidasa con 0,5 ml de sustrato.

60 [0064] El ensayo se realiza mediante la transformación de 20 microL de solución enzimática en una placa de microtitulación de 96 pocillos y la incubación a 25 °C. 200 microL de solución de trabajo, 25 °C se añaden. La solución se mezcla y se preincuba 1 minuto y la absorción se mide cada 15 segundos durante 3 minutos a DO 65 405 nm.

## ES 2 691 746 T3

[0065] La pendiente de la curva de absorción en función del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto dado de condiciones. Una descripción detallada del método de Novozymes para determinar la KNU y FAU está disponible bajo demanda como método estándar EB-SM-0009.02/01.

5 Determinación de actividad amilolítica ácida (FAU)

[0066] Una unidad de alfa-amilasa fúngica (1 FAU) se define como la cantidad de enzima que descompone 5,26 g de almidón (Merck Amylum solubile Erg. B.6, lote 9947275) por hora en el método estándar de Novozymes para la determinación de alfa-amilasa basándose en las siguientes condiciones estándar:

10

Sustrato	Almidón soluble
Temperatura	37 °C
pH	4,7
Tiempo de reacción	7-20 minutos

Una descripción detallada del método de Novozymes para la determinación de KNU y FAU está disponible bajo demanda como método estándar EB-SM-0009.02/01.

15

Determinación de actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0067] La actividad de alfa-amilasa ácida se mide en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con respecto a un estándar enzimático.

20

[0068] El estándar usado es AMG 300 L (AMG de *A. niger* G1 de tipo salvaje vendida por Novozymes A/S). La alfa-amilasa neutra de esta AMG cae después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 semanas de aprox. 1 FAU/mL a menos de 0,05 FAU/mL.

25

[0069] La actividad de alfa-amilasa ácida en este estándar de AMG se determina de acuerdo con AF 9 1/3 (método Novo para la determinación de alfa-amilasa fúngica). En este método, 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo condiciones estándar.

30

[0070] El yodo forma un complejo azul con el almidón, pero no con sus productos de degradación. La intensidad de color es, por lo tanto, directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo condiciones analíticas específicas.

35

Almidón + Yodo	Alfa-amilasa → 40 °C, pH 2,5	Dextrinas + Oligosacáridos
Azul/violeta		t = 23 s. Decoloración

Condiciones estándar/condiciones de reacción: (por minuto)

Sustrato:	almidón, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I <sub>2</sub> ):	0,03 g/L
CaCl <sub>2</sub> :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40 °C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	lambda = 590 nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Rango de trabajo enzimático:	0,01-0,04 AFAU/mL

40

[0071] Detalles adicionales se pueden encontrar en el documento del método estándar EB-SM-0259.02/01 disponible bajo demanda de Novozymes A/S.

Actividad de glucoamilasa y de alfa-glucosidasa (AGU)

45

[0072] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar de 37 °C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

50

[0073] Un sistema autoanalizador se puede utilizar. Se añade mutarrotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se vuelva beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona

## ES 2 691 746 T3

específicamente con beta-D-glucosa en la reacción anteriormente mencionada, y forma NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

### Incubación de AMG:

Sustrato:	maltosa 23,2 mM
Tampón:	acetato 0,1 M
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37 °C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Rango de trabajo enzimático:	0,5-4,0 AGU/mL

### Reacción de color:

GlucDH:	430 U/L
Mutarrotasa:	9 U/L
NAD:	0,21 mM
Tampón:	fosfato 0,12 M; 0,15 M de NaCl
pH:	7,60 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37 °C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

5 [0074] Una carpeta ([EB-SM-0131.02/01](#)) que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.

### Determinación de actividad de xilanasas (FXU)

10 [0075] La actividad de endoxilanasas se determina mediante un ensayo, donde la muestra de xilanasas se incuba con un sustrato de remazol-xilano (4-O-metil-D-glucurono-D-xilano teñido con Remazol Brilliant Blue R, Fluka), pH 6,0. La incubación se realiza a 50 °C durante 30 min. El antecedente del sustrato teñido no degradado se precipita por etanol. El color azul restante en el sobrenadante se determina espectrofotométricamente a 585 nm y es proporcional a la actividad de endoxilanasas.

15 [0076] La actividad de endoxilanasas de la muestra se determina con respecto a un estándar enzimático.

20 [0077] El ensayo se describe adicionalmente en el método analítico EB-SM-397.02 disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.

### Determinación de unidades de endoglucanasa (ECU)

25 [0078] La ECU (unidad de endocelulosa) se determina con respecto a un estándar enzimático. La endocelulosa descompone la carboximetilcelulosa, CMC. La solución de sustrato preparada contiene 35 g/l de CMC (Blanose Aqualon) en 0,1 M de tampón fosfato a pH 7,5. La muestra enzimática que se va a analizar se determina se disuelve en el mismo tampón. 0,15 ml de solución enzimática estándar o la muestra de enzima desconocida se coloca en tubos de ensayo de 10 ml. 5 ml de solución CMC-sustrato, precalentada a 40 °C, se añaden. La solución conjunta se mezcla íntegramente, se incuba durante 30 minutos y se coloca en el viscosímetro.

30 [0079] El método se describe adicionalmente en detalle en AF302/1-GB disponible de Novozymes A/S bajo demanda.

### Determinación de actividad de endoglucanasa (EGU)

35 [0080] Una solución de sustrato que contiene 34,0 g/l de CMC (Blanose Aqualon) en 0,1 M de tampón fosfato, pH 6,0 se prepara. La muestra enzimática que se va a analizar se disuelve en el mismo tampón. 14 ml de solución de sustrato y 0,5 ml de solución enzimática se mezclan y se transfieren a un viscosímetro de vibración (por ejemplo, MIVI 3000 disponible de Sofraser, Francia) termostaticado a 40 °C. La unidad de endoglucanasa (EGU) se determina como la proporción entre la viscosidad de la muestra y la viscosidad de una solución enzimática estándar.

40 [0081] El ensayo se describe adicionalmente en el documento del método estándar EB-SM-0275.02/01 disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.

45 Determinación de unidad de pectintranseliminasa (PECTU)

## ES 2 691 746 T3

[0082] El método se basa en la degradación de la enzima de una solución de pectina mediante una reacción de transeliminasa, los enlaces dobles formados suponen un aumento en la absorción a 238 nm que se sigue mediante un espectrofotómetro.

### Condiciones de reacción

Temperatura: 30 °C ± 0,5 °C  
pH: 3,50 ± 0,02  
Sustrato: 0,24 % de pectina (Obipektin, Brown Ribbon Pure, Art. N.º 1.1B00.A. Lote N.º 0304)  
Concentración enzimática: 1,9 - 2,3 PECTU/mL  
Tiempo de reacción: 6 minutos  
Tiempo de medición: 5 minutos  
Longitud de onda: 238 nm

5

[0083] La actividad se determina con respecto a un estándar PECTU. El resultado se da en las mismas unidades que para el estándar, que se designa: PECTU - unidad de pectintranseliminasa.

[0084] El ensayo se describe adicionalmente en el documento del método estándar EB-SM-0573.02 disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.

10

Determinación de actividad de beta-glucanasa fúngica (FBG)

15

[0085] La beta-glucanasa fúngica reacciona con el beta-glucano para formar glucosa o reducir el carbohidrato que se determina como azúcar reductor utilizando el método de Somogyi Nelson.

[0086] 1 unidad de beta-glucanasa fúngica (FBG) es la cantidad de enzima que, bajo las condiciones estándar destacadas anteriormente, libera glucosa o reduce el carbohidrato con una capacidad de reducción equivalente a 1 micromol de glucosa por minuto.

20

### Condiciones de reacción

Concentración de sustrato : 0,5 % de beta glucano  
Temperatura : 30 °C  
pH : 5,0  
Tiempo de reacción : 30 minutos

### Detección:

Longitud de onda : 520 nm

25

[0087] El ensayo se describe adicionalmente en el documento del método estándar EB-SM-0338.02/01 disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.  
Determinación de hemicelulasa (VHCU)

[0088] La unidad de hemicelulasa (VHCU) es una expresión de la capacidad de la enzima de hidrolizar enlaces beta-1,4 entre las moléculas de manosa en un galactomanano disuelto y reducir así la viscosidad de la solución. La unidad se determina con respecto a un estándar enzimático de Novozymes A/S.

30

### Condiciones de reacción:

Temperatura: 30,0 °C  
pH: 5,0  
Tiempo de reacción: 60 minutos  
Conc. de sustrato: aprox. 0,5 % (p/v)  
Conc. enzimática: 0,03-0,08 VHCU/mL  
Tiempo de ebullición: 15 minutos

[0089] El ensayo se describe adicionalmente en el documento del método estándar EB-SM-0156.02/01 disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.

35

Determinación de actividad de beta-glucanasa (BGU)

[0090] 1 unidad de beta-glucanasa (BGU) es la cantidad de enzima que, bajo las condiciones estándar destacadas anteriormente, libera glucosa o reduce el carbohidrato con una capacidad de reducción equivalente a 1 micromol de glucosa por minuto.

Condiciones de reacción:

Concentración de sustrato: 0,5 % de beta-glucano  
 Temperatura: 30 °C  
 pH: 7,5  
 Tiempo de reacción: 30 minutos  
 Detección:  
 Longitud de onda: 520 nm

[0091] El ensayo se describe adicionalmente en el documento del método estándar EB-SM-0275.02/01 disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.

5 Determinación de actividad de proteasa (AU)

[0092] La dimetilcaseína (DMC) se hidroliza por la enzima proteolítica a pequeños péptidos. Los grupos amino primarios formados en este proceso reaccionan con ácido sulfónico de trinitrobenzeno (TNBS) y forman un complejo coloreado. Este desarrollo de color se controla *in situ* de modo que el cambio en la absorción por unidad de tiempo se puede calcular. Esta cifra es una medida de la velocidad de reacción y, por lo tanto, de la actividad enzimática.

Condiciones de reacción para la reacción DMC

Temperatura: 50 °C  
 pH: 8,3  
 Longitud de onda: 405 nm  
 Tiempo de reacción: 8 min.  
 Tiempo de medición: 2 min.  
 Rango de concentración enzimática: 0,072 - 0,216 MAU/ml.

La actividad se determina con respecto a un estándar enzimático.

15 [0093] El ensayo se describe adicionalmente en el documento del método estándar EB-SM-0218.02/02 disponible bajo demanda de Novozymes A/S, Dinamarca.

20 **EJEMPLOS**

**Ejemplo 1**

Deshidratación de vinaza total

25 [0094] La vinaza total (7,7 % en peso de sólidos secos, pH = 4,5) de fermentación de etanol convencional molida en seco se usó como sustrato.

30 [0095] Una parte alícuota (50 mL) de vinaza total se colocó en un tubo centrífugo y se calentó a 40 °C. La celulasa DM ( $1,8 \times 10^6$  EGU/sustrato de tonelada en seco) se añadió y la mezcla se agitó suavemente en un agitador giratorio durante 120 minutos.

[0096] El tubo se centrifugó durante 5 minutos a 2000 r.p.m.

35 [0097] El sobrenadante se decantó y la torta húmeda resultante se transfirió cuidadosamente a un crisol tarado y se secó en un horno (105 °C) durante toda la noche.

40 [0098] Los sólidos de la torta secada se pesaron y se compararon con el peso de los sólidos de control (donde no se había usado ninguna enzima). Los resultados, junto con varias otras enzimas evaluadas, se muestran en la tabla 1.

TABLA 1:

Enzima <sup>1</sup>	% de sólidos de la torta <sup>1</sup>	% de aumento relativo del control <sup>2</sup>	dosis/DT (sustrato de tonelada en seco)
Ninguna (control)	21,30	-	-
Celulasa DM	22,49	5,59	$1,8 \times 10^6$ EGU
Celulasa CZ	21,72	1,97	$4,5 \times 10^6$ ECU
Celulasa C	21,63	1,55	$5,0 \times 10^6$ ECU
Xilanasa HC	21,94	3,00	$0,133 \times 10^6$ FXU
Xilanasa SZ	22,37	5,02	$1,0 \times 10^6$ FXU
Hemicelulasa VL	22,29	4,65	$0,1 \times 10^6$ FBG

Mananasa GN	22,25	4,46	$1,0 \times 10^9$ VHCU
Pectinasa BC	22,38	5,07	$2,5 \times 10^6$ PECTU
Beta-glucanasa CF	22,12	3,85	$0,2 \times 10^6$ BGU

<sup>1</sup>masa de sólidos de torta seca dividido por masa de torta húmeda.

<sup>2</sup>(sólidos de la torta menos sólidos de la torta de control x 100) dividido por sólidos de la torta de control.

## Ejemplo 2

### Deshidratación de vinaza total usando el método CST

5 [0099] Para este estudio, se usó vinaza total de fermentación de etanol convencional de maíz molido en seco. El contenido de sólidos secos se determinó en 10,58 % de DS utilizando un analizador de humedad IR-200 (Denver Instrument). El pH de la vinaza total se midió en 4,05. El pH no se ajustó durante este estudio. 50 mL de vinaza total se pipetearon en cada tubo de ensayo. 100 microL de las enzimas listadas en la tabla siguiente se  
10 adicionaron en tubos. Todos los tubos se colocaron en un baño de agua con agitación a 45 °C después de la mezcla con Vortex-2 Genie (Scientific Industries). Después de 20 horas de agitación suave, los tubos se sacaron y se enfriaron a temperatura ambiente. El efecto de deshidratación de las enzimas se evaluó utilizando un temporizador de succión capilar (CST) (Triton Electronics, Ltd). El tiempo de desplazamiento de agua en el papel de filtro se registró. Cuanto más corto es el tiempo, mejor es el efecto de deshidratación. Las celulasas y/o  
15 hemicelulasas que incluyen xilanasa, glucanasa, y mananasa tienen efecto de deshidratación en la vinaza total. Las enzimas con baja actividad a pH4 han mostrado poco efecto o ninguno. Todos los experimentos fueron duplicados. Los resultados están en la tabla siguiente.

Nombre	pH	Temp. (°C)	Tiempo (horas)	CST medio (s)
control sin enzima	4,05	45	20	89,8
Hemicelulasa VL	4,05	45	20	71,0
beta-glucanasa BG	4,05	45	20	80,6
Xilanasa SZ	4,05	45	20	80,1

## 20 Ejemplo 3

### Deshidratación de vinaza total usando el método CST

25 [0100] La vinaza total fue la misma que en el ejemplo sin modificación en este estudio. 50 ml de vinaza total se pipetearon en cada probeta. Una cantidad específica de enzima se añadió en los tubos. Todos los tubos se colocaron en incubadora de agitación a 50 °C después de la mezcla con Vortex-2 Genie (Scientific Industries). Después de 45 minutos de agitación, los tubos se sacaron y se enfriaron a temperatura ambiente. El efecto de deshidratación de la enzima se evaluó utilizando temporizador de succión capilar (CST) (Triton Electronics, Ltd).  
30 Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Enzima	mg proteína enzimática/g DS	CST (s)	%
Control	0	116,5	100 %
Glucoamilasa SF	0,025	109,0	94 %
Glucoamilasa SF	0,25	111,7	96 %
Glucoamilasa TC	0,025	100,8	86 %
Glucoamilasa TC	0,25	99,0	85 %
Amilasa JA	0,05	104,6	90 %

**REIVINDICACIONES**

1. Método de deshidratación de vinaza total que incluye los pasos de  
5 i) someter vinaza total derivada de un proceso de producción de etanol que utiliza material que contiene almidón como materia prima a una o más carbohidrasas seleccionadas del grupo que consiste en amilasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa, pectinasa, mananasa, y proteasa,  
ii) separar el material en una fracción sólida y una fracción líquida.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde el paso i) y ii) se realizan simultáneamente o consecutivamente.
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además un paso iii) de secado de la fracción sólida.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la separación en el paso ii) se realiza por centrifugación, preferiblemente una centrifugadora decantadora.
- 20 5. Método según la reivindicación 1 o 3, donde la separación en el paso ii) se realiza por filtración, preferiblemente utilizando una prensa de filtro, una prensa de tornillo, una prensa de placa y bastidor, un espesante o drenaje por gravedad.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el paso i) se realiza a una temperatura de 20-60 °C.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el paso i) se realiza a un pH en el rango de 3-7, preferiblemente de 3-6.
8. Método según la reivindicación 1, donde la materia prima es un cereal.
- 30 9. Método según las reivindicaciones 1-8, donde la materia prima se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, patata, o cualquier combinación de los mismos.
10. Método según la reivindicación 1, donde la amilasa usada en el paso i) es alfa-amilasa o glucoamilasa, y la hemicelulasa es xilanasa.

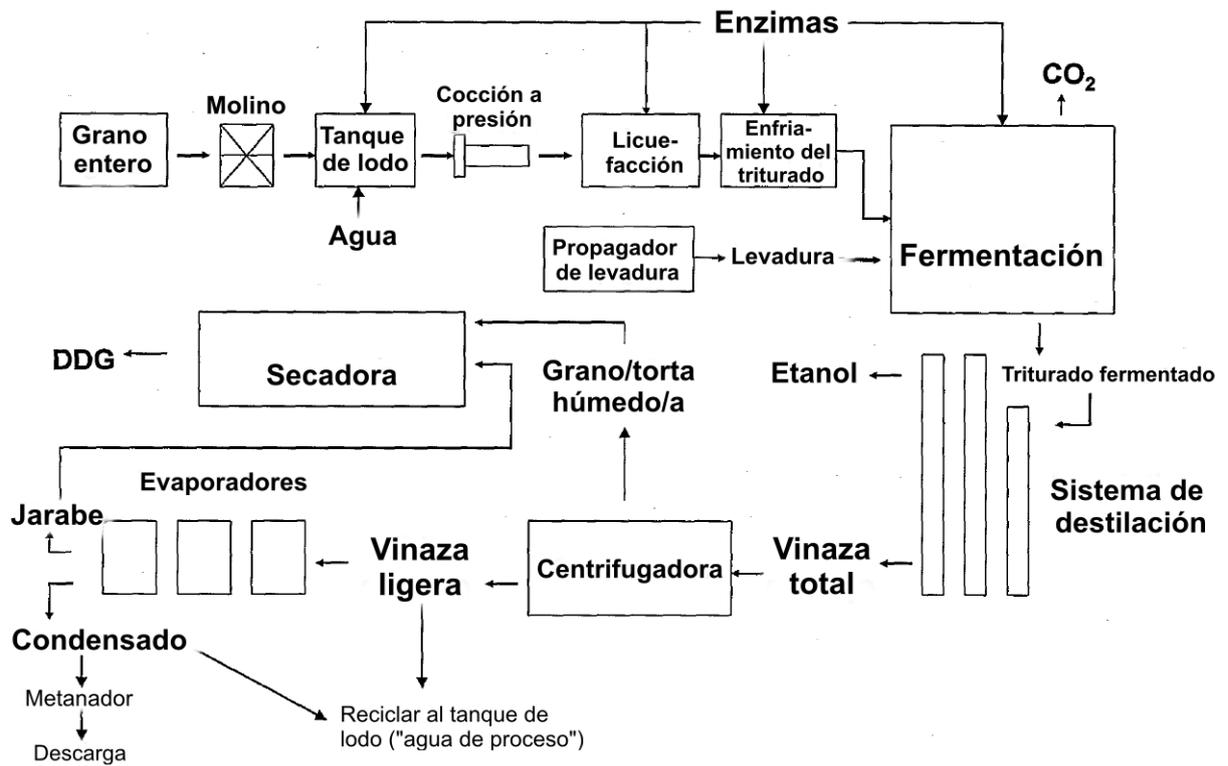


Figura 1