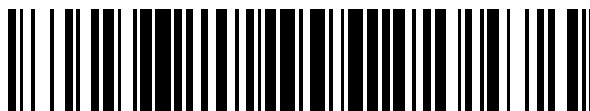


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 845**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2015 PCT/EP2015/064179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020103**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2015 E 15733668 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3177728**

54 Título: **Procesos de fermentación mejorados usando xilanasa y pectinasa**

30 Prioridad:

**05.08.2014 EP 14179851**  
**05.08.2014 US 20146203327 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.02.2019**

73 Titular/es:

**DIREVO INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY GMBH**  
**(50.0%)**  
**Nattermannallee 1**  
**50829 Köln, DE y**  
**BASF ENZYMES LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KRÄMER, MARCO y**  
**SVETLITCHNYI, VITALY**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 699 845 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

Procesos de fermentación mejorados usando xilanasas y pectinasas

### Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a procesos mejorados de producción de productos de fermentación a partir de material que contiene almidón usando un organismo fermentador. En particular, los procesos se caracterizan por la adición de una composición enzimática que comprende una xilanasas y una pectinasas durante la etapa de fermentación.

### Antecedentes de la invención

10 Un gran número de productos comerciales que son difíciles de producir sintéticamente son hoy en día producidos por organismos fermentadores. Tales productos incluyen alcoholes (por ejemplo, butanol, etanol, metanol, 1,3-propanodiol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, gluconato, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B<sub>12</sub>, beta-caroteno); y hormonas. La fermentación comúnmente también se usa en las industrias de alcohol de consumo (por ejemplo, cerveza y vino), productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogurt y queso), cuero y tabaco.

15 Los productos de fermentación, tales como etanol, se producen primero degradando material que contiene almidón en azúcares fermentables por licuefacción y sacarificación y, a continuación, convirtiendo los azúcares directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado usando un organismo fermentador. Los productos de fermentación líquidos tales como el etanol se recuperan del mosto ("mash") fermentado (con frecuencia referido como "cerveza" o "mosto 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 entera", se deshidrata y se separa en una fase sólida y una líquida, por ejemplo, por centrifugación. La fase sólida es referida como "torta húmeda" (o "granos húmedos" o "WDG") y la fase líquida (sobrenadante) es referida como "vinaza poco espesa". La torta húmeda deshidratada se seca para proporcionar "Granos Secos de Destilerías" (DDG, del inglés "Distillers Dried Grains") usados como nutriente en la alimentación animal. La vinaza poco espesa generalmente se somete a evaporación para proporcionar condensado y jarabe (o "vinaza espesa") o alternativamente se puede reciclar directamente al tanque de lechada ("slurry") como "agua del proceso" ("backset"). El condensado o bien puede ser dirigido a un reactor de metanación antes de ser descargado o puede ser reciclado al tanque de lechada. El jarabe que consiste principalmente en dextrinas límite y azúcares no fermentables se pueden mezclar con DDG o añadir a la torta húmeda antes de secar para producir DDGS (Grano Seco de Destilerías con Solubles).

20 Las plantas de etanol han logrado mantener la rentabilidad, la cual es altamente variable dependiendo del precio del maíz, la demanda y el precio de DDGS (del inglés "Distillers Dried Grain with Solubles"), los créditos fiscales, el consumo de gasolina, las exportaciones de etanol y los cambios en los mandatos del Estándar para Combustibles Renovables (RFS, del inglés "Renewable Fuels Standard"). Las nuevas tecnologías para el ahorro de energía, la mayor producción de etanol y el mayor valor para los coproductos así como varias tecnologías de separación de aceite contribuyen a la rentabilidad de la producción de etanol.

25 Por lo tanto, hay una necesidad de proporcionar procesos que puedan incrementar la producción del producto de fermentación y de ese modo reducir los costes de producción. Es un objetivo de la presente invención proporcionar procesos mejorados para producir productos de fermentación. El documento WO 2012/084225 describe la adición de mezclas enzimáticas, las cuales pueden incluir xilanasas y pectinasas, después de la fermentación.

30 El documento WO 2014/127851 (28 de Agosto de 2014) también describe la adición de tales cócteles enzimáticos después de la fermentación. *International Journal of the Computer*, 2012, pp. 22-27 (Kongkiattikajorn) describe un proceso SFS donde la piel de mandioca se expone a una mezcla enzimática que comprende xilanasas y pectinasas. *Bioresource Technology*; enero de 2014, pp. 258-265 (Li et al) describe el sinergismo de celulasas, xilanasas y pectinasas sobre la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar.

### Compendio de la descripción

35 La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación a partir de material que contiene almidón usando un organismo fermentador y adición de una composición enzimática particular durante la etapa de fermentación.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a métodos de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, comprendiendo dicho método las etapas de:

- i) convertir material que contiene almidón en azúcares fermentables, en donde el material que contiene almidón es maíz, seguido de

ii) fermentar los azúcares fermentables con un microorganismo a mosto fermentado

iii) someter el medio de fermentación durante el proceso de fermentación a una composición enzimática que comprende una xilanasas y una pectinasa

iv) separar el producto de fermentación en el mosto fermentado

5 En otro aspecto, la presente descripción concierne a un método de producción de un producto de fermentación, que comprende

(a) someter a licuefacción de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa y presacarificar del material licuado antes de la etapa (b);

(b) sacarificar del material licuado, seguido de

10 (c) fermentar usando un organismo fermentador; en donde se añade una composición enzimática que comprende una xilanasas y una pectinasa durante la etapa de fermentación (c).

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra esquemáticamente un proceso de producción de etanol.

15 La Figura 2 es un diagrama que muestra el trascurso de tiempo de la producción de etanol durante el proceso de fermentación en presencia (75 g/t y 200 g/t) y ausencia (0 g/t) de la composición enzimática que comprende una xilanasas más una pectinasa.

### Descripción de la invención

20 El objetivo de la presente descripción es proporcionar métodos de producción de productos de fermentación a partir de material que contiene almidón usando un organismo fermentador, en donde se añade una composición enzimática que comprende una xilanasas y una pectinasa durante la etapa de fermentación.

En una realización, como se define en las reivindicaciones 1 a 5, la presente descripción se refiere a métodos de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, comprendiendo dicho método las etapas de:

25 i) convertir material que contiene almidón a azúcares fermentables, en donde el material que contiene almidón es maíz.

ii) fermentar los azúcares fermentables con un microorganismo a mosto fermentado

iii) someter el medio de fermentación durante el proceso de fermentación a una composición enzimática que comprende una xilanasas y una pectinasa,

iv) separar el producto de fermentación en el mosto fermentado.

30 En otra realización, como se define en las reivindicaciones 6 a 12, la presente descripción se refiere a un método de producción de un producto de fermentación, que comprende:

(a) someter a licuefacción un material que contiene almidón con una alfa amilasa y presacarificar el material licuado, antes de la etapa (b);

(b) sacarificar el material licuado;

35 (c) fermentar usando un organismo de fermentación; en donde una composición enzimática que comprende una xilanasas y una pectinasa se añade durante la etapa de fermentación (c).

40 La vinaza o la vinaza entera es el producto que queda después de que el mosto se haya convertido en azúcar, fermentado y destilado en etanol. La vinaza se puede separar en dos fracciones, por ejemplo, por centrifugación o cribado: (1) torta húmeda (fase sólida) y (2) la vinaza poco espesa (sobrenadante). La fracción sólida o de grano húmedo de destilerías (DWG, del inglés "Distillers' Wet Grain") se pueden presar para eliminar la humedad en exceso y, a continuación, secar para producir granos secos de destilerías (DDG). Después de que el etanol se haya separado de la fracción líquida, el líquido restante se puede evaporar para concentrar el material soluble en solubles de destilerías (DS, del inglés "Distillers' Solubles") condensados o secar y pulverizar para crear solubles secos de destilerías (DDS, del inglés "Distillers' Dried Solubles"). DDS con frecuencia se mezcla con DDG para formar grano seco de destilerías con solubles (DDGS). DDG, DDGS y DWG son referidos colectivamente como grano(s) de destilerías.

45 En la presente descripción se añaden enzimas durante la fermentación y antes de la etapa de separación tipo destilación, en donde el producto principal de fermentación deseado se separa del resto del mosto fermentado. Las

enzimas para su uso según la presente descripción eran capaces de degradar los componentes en el medio de fermentación.

La expresión “medios de fermentación” o “medio de fermentación” se refiere al ambiente en el que se lleva a cabo la fermentación y comprende el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidrato que es metabolizada por el(los) organismo(s) fermentador(es).

El medio de fermentación puede comprender otros nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el(los) organismo(s) fermentador(es). El nutriente y los estimuladores de crecimiento se usan mucho en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos. Recuperación posterior a la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. El medio de fermentación se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado se puede extraer del medio de fermentación por técnicas de microfiltración o por membrana. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por arrastre por vapor. Los métodos para la recuperación son bien conocidos en la técnica.

La materia prima para producir el producto de fermentación se define en las reivindicaciones 1 (maíz) y 6 (material que contiene almidón), y puede en el último caso ser cualquier material que contiene almidón, preferiblemente material vegetal que contiene almidón, incluyendo, tubérculos, raíces, grano entero; y cualquier combinación de los mismos. El material que contiene almidón se puede obtener de cereales. Material que contiene almidón adecuado incluye maíz (choclo), trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, patata, o cualquier combinación de los mismos. El maíz es la materia prima preferida, especialmente cuando el producto de fermentación es etanol. El material que contiene almidón también puede consistir en o comprender, por ejemplo, una corriente lateral a partir del procesamiento de almidón, por ejemplo, corrientes del proceso que contienen carbohidrato C6 que pueden no venir bien para la producción de jarabes. La vinaza entera generalmente contiene aproximadamente 10 a 15 % en peso de sólidos secos. Los componentes de la vinaza entera incluyen fibra, vaina, germen, aceite y componentes proteicos de la materia prima que contiene almidón así como almidón no fermentado.

La producción de un producto de fermentación generalmente se divide en las siguientes fases principales del proceso:

a) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, por ejemplo, por molienda en seco o húmeda;

b) cocer el material que contiene almidón en lechada acuosa para gelatinizar el almidón,

c) someter a licuefacción el material que contiene almidón gelatinizado para descomponer el almidón (por hidrólisis) en maltodextrinas (dextrinas);

d) sacarificar las maltodextrinas (dextrinas) para producir azúcares moleculares bajos (por ejemplo, DP1-2) que pueden ser metabolizados por un organismo fermentador;

e) fermentar el material sacarificado usando un organismo fermentador adecuado que convierte directa o indirectamente los azúcares moleculares bajos en el producto de fermentación deseado;

f) recuperar el producto de fermentación, por ejemplo, por destilación para separar el producto de fermentación del mosto de fermentación.

Como también se explica en la sección anterior “Antecedentes”, la vinaza entera es un subproducto que consiste en líquidos y sólidos que quedan después de la recuperación (por ejemplo, por destilación) de un producto de fermentación deseado a partir del mosto fermentado (mosto de cerveza). Según la invención el producto de fermentación puede ser cualquier producto de fermentación, incluyendo alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. La Fermentación también comúnmente se usa en las industrias de alcohol de consumo (por ejemplo, cerveza y vino), productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogurt y queso), cuero, y tabaco. En una realización preferida el producto de fermentación es un líquido, preferiblemente un alcohol, especialmente etanol.

Como se mencionó anteriormente, el material que contiene almidón se puede obtener de cereales. El material que contiene almidón adecuado incluye maíz (choclo), trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, triticale, patata, o cualquier combinación de los mismos, sin embargo, en la realización definida en las reivindicaciones 1 a 5 se requiere maíz.

El maíz es la materia prima preferida en la realización definida en las reivindicaciones 6 a 12, especialmente cuando el producto de fermentación es etanol. El material que contiene almidón también consiste en o comprende, por

ejemplo, una corriente lateral a partir del procesamiento de almidón, por ejemplo, corrientes del proceso que contienen carbohidrato C6 que pueden no venir bien para la producción de jarabes. Los componentes de cerveza incluyen, fibra, vaina, germen, aceite y componentes proteicos de la materia prima que contiene almidón así como almidón no fermentado, levaduras, paredes celulares de levadura y restos. La producción de un producto de fermentación generalmente se divide en las siguientes fases principales del proceso: a) Reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, por ejemplo, por molienda en seco o húmeda; b) Cocer el material que contiene almidón en lechada acuosa para gelatinizar el almidón, c) someter a licuefacción el material que contiene almidón gelatinizado para descomponer el almidón (por hidrólisis) en maltodextrinas (dextrinas); d) Sacarificar las maltodextrinas (dextrinas) para producir azúcares moleculares bajos (por ejemplo, DP1-2) que se pueden metabolizar por un organismo fermentador; e) Fermentar el material sacarificado usando un organismo fermentador adecuado convirtiendo directa o indirectamente los azúcares moleculares bajos en el producto de fermentación deseado; f) Recuperar el producto de fermentación, por ejemplo, por destilación para separar el producto de fermentación del mosto de fermentación.

Como se mencionó anteriormente la cerveza (o mosto fermentado) es el producto de fermentación que consiste en etanol, otros líquidos y sólidos de un producto de fermentación deseado. Según la invención el producto de fermentación puede ser cualquier producto de fermentación, incluyendo alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. La Fermentación también comúnmente se usa en las industrias de alcohol de consumo (por ejemplo, licores, cerveza y vino); productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogurt y queso); cuero y tabaco. En una realización preferida el producto de fermentación es un líquido, preferiblemente un alcohol, especialmente etanol. La cerveza contemplada según la invención puede ser el producto resultante de un proceso de producción del producto de fermentación que incluye las anteriores etapas mencionadas a) y f). Sin embargo, la cerveza también puede ser el producto resultante de otros procesos de producción de producto de fermentación basados en material de partida que contiene almidón y/o lignocelulosa.

El organismo fermentador puede ser un organismo fúngico, tal como levadura, o bacterias. Las bacterias adecuadas pueden ser, por ejemplo, especies de *Zymomonas*, tales como *Zymomonas mobilis* y *E. coli*. Ejemplos de hongos filamentosos incluyen cepas de especies de *Penicillium*. Los organismos preferidos para la producción de etanol son levaduras, tales como, por ejemplo, *Pichia* o *Saccharomyces*. Las levaduras preferidas según la descripción son especies de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadero.

Además, el relleno de las enzimas durante la fermentación es una ventaja puesto que las enzimas en las composiciones enzimáticas están inactivadas durante la destilación.

Los procesos para producir los productos de fermentación, tales como etanol, a partir de un material que contiene almidón o lignocelulosa son bien conocidos en la técnica. La preparación del material que contiene almidón tal como maíz para su utilización en tales procesos de fermentación generalmente empieza con la pulverización del maíz en un proceso de pulverización en seco o molienda húmeda. Los procesos de molienda húmeda implican el fraccionamiento del maíz en diferentes componentes donde solamente la fracción de almidón entra en el proceso de fermentación. Los procesos de pulverizar en seco implican pulverizar los granos de maíz en harina de maíz y mezclar la harina de maíz con agua y enzimas. Generalmente se usan dos tipos diferentes de procesos de pulverizar en seco. El proceso más comúnmente usado, con frecuencia referido como "proceso convencional", incluye pulverizar el material que contiene almidón y, a continuación, someter a licuefacción el almidón gelatinizado a una temperatura alta usando generalmente una alfa-amilasa bacteriana, seguido de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) llevadas a cabo en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación. Otros procesos bien conocidos, con frecuencia referidos como proceso de "hidrólisis de almidón crudo" (proceso RSH), incluye pulverizar el material que contiene almidón y, a continuación, sacarificar y fermentar simultáneamente el almidón granular por debajo de la temperatura de gelatinización inicial generalmente en presencia de una alfa amilasa fúngica ácida y una glucoamilasa.

Sin embargo, SFS y RSH no se usan en los métodos reivindicados.

Solamente se menciona que en un proceso para la producción de etanol a partir de maíz, seguido de SFS o el proceso RSH el etanol se destila a partir del mosto entero después de la fermentación. La lechada libre de etanol resultante, normalmente referida como vinaza entera, se separa en fracciones sólidas y líquidas (es decir, torta húmeda y vinaza poco espesa que contienen aproximadamente 35 y 7 % de sólidos, respectivamente). La vinaza poco espesa con frecuencia se condensa por evaporación en un vinaza espesa o jarabe y se recombina con la torta húmeda y además se seca en granos secos de destilerías con solubles granos secos de destilerías con solubles (DDGS) para su uso en la alimentación animal.

En una realización de la presente descripción la xilanasa preferiblemente puede ser de origen microbiano, tal como de origen fúngico (por ejemplo, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Meripilus*, *Trichoderma*) o de una bacteria (por ejemplo, *Bacillus*). En una realización preferida la xilanasa se deriva de un hongo filamentos, preferiblemente se

deriva de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus*; o una cepa de *Humicola*, preferiblemente *Humicola lanuginosa*. Ejemplos de xilanasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP:AAR63790; documento WO 94/21785), xilanasas de *Aspergillus fumigatus* (documento WO 2006/078256), y xilanasas de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (documento WO 2009/079210). La xilanasas preferiblemente puede ser una endo-1,4-beta-xilanasas, más preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasas de GH 10 o GH 11. Ejemplos de xilanasas comerciales incluyen SHEARZYME(TM), BIOFEED WHEAT(TM), HTec y HTec2 de Novozymes A/S, Dinamarca.

Ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, beta-xilosidasas de *Trichoderma reesei* (número de acceso UniProtKB/TrEMBL Q92458), *Talaromyces emersonii* (número de acceso SwissProt Q8X212), y *Neurospora crassa* (número de acceso SwissProt Q7SOW4).

Ejemplos de xilanasas bacterianas adecuadas incluyen xilanasas derivadas de una cepa de *Bacillus*, tal como, *Bacillus subtilis*, tales como las descritas en la patente americana n.º 5.306.633 o las xilanasas comercialmente disponibles contempladas incluyen SHEARZYME E (TM), BIOFEED WHEAT(TM), (de Novozymes AJS), Econase CE™ (de AB Enzymes), Depol 676™ (de Biocatalysts Ltd.) y SPEZYME(TM) CP (de Genencor Int.).

La xilanasas se puede añadir en una cantidad eficaz en el intervalo de  $0,16 \times 10^6$  a  $460 \times 10^6$  unidades por tonelada de mosto de cerveza o medio de fermentación.

Ejemplo para la determinación de la Actividad de la Xilanasas (FXU).

La actividad de la endoxilanasas se determina por un ensayo, en el que la muestra de xilanasas se incuba con un sustrato de remazol-xilano (4-O-metil-D-glucurono-D-xilano teñido con Azul Brillante Remazol R, Fluka), pH 6,0. La incubación se realiza a 50 °C durante 30 min. El residual 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 la endoxilanasas.

La actividad de la endoxilanasas de la muestra se determina relativamente a un patrón enzimático.

La pectinasa usada en los métodos según la presente descripción puede ser cualquier pectinasa, en particular de origen microbiano, en particular de origen bacteriano, tal como una pectinasa derivada de una especie dentro de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia*, o de origen fúngico, tal como una pectinasa derivada de una especie dentro de los géneros *Trichoderma* o *Aspergillus*, en particular a partir de una cepa dentro de las especies *A. niger* y *A. aculeatus*. Pectinasas comercialmente disponibles contempladas incluyen Pectinex Ultra-SPL™ (de Novozymes), Pectinex Ultra Color (de Novozymes), Rohapect Classic (de AB Enzymes), Rohapect 10L (de AB Enzymes). La pectinasa puede ser añadida en una cantidad eficaz en el intervalo de  $1,4 \times 10^9$  a  $23.500 \times 10^9$  unidades por tonelada de medio de fermentación.

Ejemplo para la determinación de la Unidad de Pectintranseliminasa (PECTU).

El método se basa en la degradación de enzima de una solución de pectina mediante una reacción de transeliminasa, los enlaces dobles formados dan como resultado un incremento en la absorción a 238 nm que es seguido de 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. Lot n.º 0304)

Concentración de enzima: 1,9 a 2,3 PECTU/ml

Tiempo de reacción: 6 minutos

Tiempo de medición: 5 minutos

Longitud de onda: 238 nm

La actividad se determina en relación con un patrón de PECTU. El resultado se da en las mismas unidades que para el patrón, la cual se designa: PECTU-Unidad de Pectintranseliminasa.

El término "alfa-amilasa" significa una alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.1) que cataliza la hidrólisis de almidón y otros oligo- y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados.

En una realización, la xilanasas se añade en una cantidad de 1 a 30, por ejemplo, 5 a 30, 7 a 25, 10 a 20, 10 a 17, o 12 a 15 microgramos/g de sólidos secos.

En una realización, la pectinasa se añade en una cantidad de 0,01 a 1,0, por ejemplo, 0,015 a 0,08, 0,015 a 0,06, 0,015 a 0,04, o 0,02 a 0,03 FXU/g de sólidos secos.

En los métodos según la presente descripción, las etapas de sacarificación y fermentación se llevan a cabo secuencialmente. La xilanasas y la pectinasa se añaden durante la etapa separada de fermentación.

5 Como se mencionó anteriormente, el organismo fermentador es preferiblemente levadura, por ejemplo, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces diastaticus*. En una realización ventajosa se usa una cepa de levadura de *Saccharomyces diastaticus* (SIHA Amyloferm®, E. Begerow GmbH&Co, Langenlonsheim, Alemania) puesto que su actividad de exoamilasa puede dividir el almidón líquido y también dextrina, maltosa y melibiosa.

10 En la etapa de licuefacción el almidón gelatinizado (mosto corriente abajo) se descompone (hidroliza) en maltodextrinas (dextrinas). Para conseguir la hidrólisis del almidón se añade un enzima adecuada, preferiblemente una alfa-amilasa. La licuefacción se puede llevar a cabo como un proceso de lechada caliente en tres etapas. La lechada se calienta a entre 60 a 95 °C, preferiblemente 80 a 85 °C, y una alfa-amilasa se puede añadir para iniciar la licuefacción (aclareo). A continuación, la lechada se puede cocer a chorro a una temperatura entre 95 a 140 °C, preferiblemente 105 a 125 °C, durante aproximadamente 1 a 15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente  
15 3 a 10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos. La lechada se enfría a 60 a 95 °C y se pueden añadir más alfa-amilasa para completar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción normalmente se lleva a cabo a un pH de 4,0 a 6,5, en particular a un pH de 4,5 a 6.

20 La etapa de sacarificación y la etapa de fermentación se realizan como etapas del proceso separadas. La sacarificación se lleva a cabo en presencia de una enzima de sacarificación, por ejemplo, una glucoamilasa, una beta-amilasa o amilasa maltogénica. Opcionalmente se añade una fitasa y/o una proteasa.

25 La sacarificación se puede llevar a cabo usando las condiciones bien conocidas en la técnica con una enzima de sacarificación, por ejemplo, beta-amilasa, glucoamilasa o amilasa maltogénica, y opcionalmente una enzima de desramificado, tal como una isoamilasa o una pululanasa. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas. La sacarificación generalmente se lleva a cabo a una temperatura de 20 a 75 °C, preferiblemente de 40 a 70 °C, generalmente alrededor de 60 °C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4,5.

Durante la fermentación, el mosto fermentado se somete a una composición enzimática según la presente descripción. Esta composición enzimática comprende una xilanasas y una pectinasa.

30 En una realización particular, el proceso de la presente descripción además comprende, antes de la licuefacción del material que contiene almidón, las etapas de:

- reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por molienda; y
- formar una lechada que comprende el material que contiene almidón y agua.

35 La lechada acuosa puede contener de 10 a 55 % en p/p de sólidos secos (DS, del inglés "Dry Solids"), preferiblemente 25 a 45 % en p/p de sólidos secos (DS), más preferiblemente 30 a 40 % en p/p de sólidos secos (DS) del material que contiene almidón. La lechada se calienta a por encima de la temperatura de gelatinización y una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana y/o fúngica ácida, se puede añadir para iniciar la licuefacción (aclareo). La lechada se puede cocer a chorro para gelatinizar más la lechada antes de someterse a una alfa-amilasa en la etapa (a).

40 En una realización preferida, como se define en la reivindicación 6, el material que contiene almidón es cereales molidos, preferiblemente es cebada o maíz, y los métodos comprenden una etapa de molienda de los cereales antes de la etapa (a). En otras palabras, la descripción también abarca los métodos, en donde el material que contiene almidón es obtenible por un proceso que comprende molienda de los cereales, preferiblemente molienda en seco, por ejemplo, por molinillos de martillo o rodillo. Pulverización también se entiende como molienda, ya que es cualquier proceso adecuado para la apertura de los granos individuales y exposición del endosperma para  
45 procesamiento adicional. Dos procesos de molienda normalmente se usan en la producción de alcohol; molienda húmeda y en seco. El término "molienda en seco" indica molienda del grano entero. En la molienda en seco el grano entero se muele y se usa en la parte restante del proceso de formación de mosto. El mosto se puede proporcionar formando una lechada que comprende el material que contiene almidón molido y agua de elaboración de cerveza. El agua de elaboración de cerveza se puede calentar a una temperatura adecuada antes de combinarse con el material  
50 que contiene almidón molido para conseguir una temperatura de mosto de 45 a 70 °C, preferiblemente de 53 a 66 °C, más preferiblemente de 55 a 60 °C. El mosto generalmente se forma en un tanque conocido como el tanque de lechada.

55 Posteriormente a la fermentación el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. La lechada se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado a partir del medio de fermentación mediante técnicas de microfiltración o por membrana. Alternativamente el producto de fermentación se puede recuperar por arrastre por vapor. Los métodos para recuperar los productos de

fermentación son bien conocidos en la técnica. Generalmente, el producto de fermentación, por ejemplo, etanol, se obtiene con una pureza de hasta, por ejemplo, aproximadamente 96 % en vol. de etanol.

- 5 Por tanto, en una realización, los métodos de la descripción además comprenden la destilación para obtener el producto de fermentación, por ejemplo, etanol. La fermentación y la destilación se pueden llevar a cabo separadamente o secuencialmente, con respecto a la inactivación enzimática como se indicó anteriormente; opcionalmente seguido de una o más etapas del proceso para refinamiento adicional del producto de fermentación.

Detalles adicionales sobre cómo llevar a cabo la licuefacción, sacarificación, fermentación, destilación y recuperación del etanol son bien conocidos por el experto en la técnica.

- 10 El(los) producto(s) de fermentación opcionalmente se pueden recuperar del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material celulósico fermentado y se purifica mediante métodos convencionales de destilación como se mencionó anteriormente. Se puede obtener etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 % en vol., el cual se puede usar como, por ejemplo, etanol de combustible, etanol de bebida, es decir, licores neutros para beber, o etanol industrial.

## 15 Ejemplos

Producción acelerada de etanol

La eficacia de cualquier proceso fermentativo se define por la tasa de producción del producto diana. Por lo tanto, incrementar la tasa de producción fermentativa de etanol, es decir, la aceleración de la producción de etanol es altamente económico.

- 20 Para ese ejemplo se ensayó la producción de etanol del proceso de fermentación en presencia y ausencia de enzimas adicionales que aceleran la concentración de etanol.

Se ensayaron tres diferentes montajes.

- 25 En el primer fermentador (Fermentador N°1) el cultivo de fermentación no se trató con las enzimas (0 g/t de xilanas; 0 g/t de pectinasa), en el segundo y tercer fermentador (Fermentador N°2 a N°3) el cultivo de fermentación se trató con la composición enzimática que comprendía una xilanas y una pectinasa desde el inicio de la fermentación en diferentes concentraciones (de 75 g/t a 200 g/t de xilanas y de 75 g/t a 200 g/t de pectinasa).

Las pruebas se realizaron a escala de fermentación de 2 l. Las muestras se tomaron durante el proceso de fermentación y las concentraciones de etanol se determinaron por HPLC.

Ejemplos

- 30 En una realización, el proceso de la producción de etanol a partir de maíz se realizó como sigue:

A) Proceso para la producción de productos de fermentación

a) Reducción del tamaño de partícula del material que contiene almidón mediante molienda

- se molió maíz (Empresa Pannonia, Hungría) a <2 mm de tamaño de partícula (molinillo de café, empresa Brunn)

- 35 b) Formación de una lechada que comprende el material que contiene almidón y agua

- se añadió 1,5 kg de maíz molido a 4,96 l ml de agua corriente templada (dureza del agua de 3,57 mmol/l) a 35 °C para obtener una solución sólida al 25 % con un volumen final de 6 l en un fermentador Biostat C (empresa Sartorius) conduciendo a un pH de aproximadamente 5,6.

c) Licuefacción del material que contiene almidón

- 40 - se incrementó la temperatura a 90 °C

- se diluyó 1 ml de  $\alpha$ -amilasa "a-amylase VF-Kartoffel" (Schliessmann, N.º 5049) en 10 ml de agua corriente y, a continuación, la amilasa diluida se añadió a la lechada

- la temperatura se incrementó a 90 °C

- el fermentador se incubó durante 90 min a 90 °C y 450 rpm

- 45 - la lechada se enfrió a 30 °C, el pH se ajustó a aproximadamente 4 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 30 %

d) Sacarificación del material licuado obtenido



## ES 2 699 845 T3

- se diluyó 1,5 ml de glucoamilasa "Amylase GA 500" (Schliessmann, N.º 5042) en 10 ml de agua corriente estéril y, a continuación, se añadió la glucoamilasa diluida a la lechada, lo cual es el material licuado sacarificado.

### e) Fermentación

5 - se añadió 1,8 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (es decir, 300 ppm de sulfato de amonio) a los 6 l de material licuado sacarificado.

- el material licuado sacarificado que contenía 300 ppm de sulfato de amonio en el fermentador de Biostat C se agitó con 800 rpm durante 5 min para distribuir todo equitativamente.

10 - el material licuado sacarificado que contenía 300 ppm de sulfato de amonio (es decir, mosto) se distribuyó en partes únicas de 1.500 g dentro de cuatro fermentadores Biostat B de 2 l (empresa Sartorius) que contenían un mezclador en herradura.

- Preparación de la reserva de enzima: se añadieron 2,5 g de la pectinasa (Pec3) con 90.349 U/ml y 2,5 g de la xilanasa (Xy116) con 10.027 U/ml en un cilindro graduado de 50 ml y se llenó hasta 50 ml con agua corriente.

15 La reserva de enzima se transfirió dentro de un tubo de 50 ml y, a continuación, se almacenó a 4 °C hasta el uso en una hora.

- Los siguientes volúmenes de la preparación de la reserva de enzima se añadieron al fermentador Biostat B de 2 l que contenía 1.500 g del material licuado sacarificado que contenía 300 ppm de sulfato de amonio.

20 Fermentador N°1: 0 ml de la preparación de reserva de enzima conduciendo a 0 g/t de pectinasa y 0 g/t de xilanasa

Fermentador N°2: 2,25 ml de la preparación de enzima conduciendo a 75 g/t de pectinasa y 75 g/t de xilanasa.

Fermentador N°3: 6,00 ml de la preparación de enzima conduciendo a 200 g/t de pectinasa y 200 g/t de xilanasa

25 - Propagación de levadura: 300 ml de medio YNB (del inglés, "Yeast nitrogen base"; base nitrogenada de levadura) sometida a autoclave más glucosa con 10 g/l de medio de glucosa dando como resultado pH 5,7 en un matraz de cultivo de 1 l, el cual se había inoculado con 2 ml de levadura (Etanol RED, empresa Fermentis) de una crío reserva a -80 °C que contenía glicerol al 20 %, se incubaron durante 23 horas (30 °C, 150 rpm) conduciendo al cultivo de levadura.

30 - Cada uno de los tres fermentadores (Fermentador N°1 a N°3) se inoculó con 60 ml del cultivo de levadura.

- Los cultivos de los fermentadores se llevaron a cabo a 30 °C a 150 rpm, sin control de pH durante 92,5 horas.

- Se tomaron muestras de 7 ml dos veces al día por corte de pipeta para hacer un seguimiento del proceso de fermentación (concentración de etanol). Las muestras se transfirieron a tubos de 15 ml y se centrifugaron a 4.470 g durante 10 minutos a 4 °C y se almacenaron hasta análisis adicional a -20 °C.

35 B) Determinación de la actividad del producto enzimático:

Solución de DNSA: para la solución de DNSA se usaron los siguientes compuestos:

- se disolvió 5,00 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA, del inglés "3,5-Dinitrosalicylic Acid") en 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

- añadir 50 ml de solución de NaOH/KOH (KOH 4M+NaOH 4M) gota a gota

40 - añadir 150 g de K-Na tartrato tetrahidrato

- enfriar la solución a temperatura ambiente

- añadir con H<sub>2</sub>O destilada hasta 500 ml de volumen final

- almacenar en oscuridad

### a) Pectinasa

45 Sustratos: ácido poligalacturónico (Sigma 81325)

## ES 2 699 845 T3

Los sustratos se disolvieron en tampón a una concentración de 0,8 % (p/v)

Tampón: acetato de sodio 50 mM, pH 4,5

5 Para el ensayo se usaron placas de microtitulación de PCR de 96 pocillos (empresa Greiner). Las enzimas se diluyeron en tampón. Se mezclaron 90  $\mu$ l de sustrato y 10  $\mu$ l de solución de enzima. Se midió un blanco reemplazando la solución enzimática con agua. La incubación se llevó a cabo durante 30 min a 37 °C, seguido de una etapa de inactivación enzimática de 5 minutos a 99 °C y seguido de enfriamiento durante 10 min a 4 °C. En una segunda placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos (empresa Greiner) 50  $\mu$ l de la mezcla de sustrato-enzima incubada se incubó con 50  $\mu$ l de la solución de DNSA a 98 °C durante 10 minutos y, a continuación, se enfrió a 4 °C y se incubó durante 5 minutos a 4 °C.

10 100  $\mu$ l de la reacción se transfirieron a un pocillo de la placa de microtitulación de fondo plano transparente de 96 pocillos y se midió la adsorción a 540 nm mediante un lector de placa de microtitulación (Tecan M1000).

### b) Xilanasa

Sustratos: Xilano de abedul (Sigam X0502)

El sustrato se disolvió en tampón a una concentración de 1,5 % (p/v)

15 Tampón: acetato de sodio 100 mM, pH 5,0 conteniendo  $\text{CaCl}_2$  20 mM y 0,4 g/l de Tween20.

20 Para el ensayo se usaron placas de microtitulación de PCR de 96 pocillos (empresa Greiner). Las enzimas se diluyeron en tampón. Se mezclaron 90  $\mu$ l de sustrato y 10  $\mu$ l de solución enzimática. Se midió un blanco reemplazando la solución enzimática con agua. La incubación se llevó a cabo durante 20 min a 40 °C, seguido de una etapa de inactivación enzimática de 5 minutos a 99 °C y seguido de enfriamiento durante 5 min a 4 °C. 45,5  $\mu$ l de la solución de DNSA se añadió a la placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos mediante un multigoteo (empresa Fisher-Scientific) y, a continuación, la placa se incubó durante 98 °C durante 10 minutos y se enfrió a 4 °C y se incubó durante 5 minutos a 4 °C.

25 100  $\mu$ l de la reacción se transfirieron al pocillo de una nueva placa de microtitulación de fondo plano transparente de 96 pocillos y, a continuación, se midió la adsorción a 540 nm mediante un lector de placa de microtitulación (Tecan M1000).

La actividad se calculó como Unidades por  $\mu$ l o mg de producto enzimático. 1 unidad se define como la cantidad de finales reductores formados en  $\mu$ mol por minuto. Las actividades enzimáticas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tipo	Actividad	Código
Pectinasa	90.349 U/ml	<i>Pec3</i>
Xilanasa	10.027 U/ml	<i>Xyl16</i>

### 30 *Análisis de etanol*

35 Se descongelaron muestras congeladas del proceso de fermentación y se midieron las concentraciones de etanol en las muestras de fermentación por HPLC. Las muestras de fermentación se centrifugaron a 20.000 g a 10 °C durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a viales de HPLC. Las muestras (30  $\mu$ l) se inyectaron en un equipo de VWR/Hitachi que comprendía la bomba isocrática L-2130, el automuestreador L-2200, el horno en columna L-2350, el detector de índice de refracción L-2490 y un desgasificador a 10 °C. Se usó el programa informático EZ Chrome Elite 3.3.1. La HPLC VWR/Hitachi estaba equipada con una Columna de LC de H+ (8 %) de ROA ácido orgánico de Rezex (300 x 7,8 mm, Phenomenex, Torrance CA) y una columna de guarda (carbo-H 4x3,0 mm, Phenomenex, Torrance CA). La columna se eluyó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,0025 M a 0,45 ml/min de flujo a 60 °C. El sistema se estandarizó por un patrón de etanol de calibración en 6 puntos (100 g/l, 50 g/l, 25 g/l, 12,5 g/l, 6,125 g/l y 0 g/l de etanol).

40

Tabla 2

Tiempo de crecimiento [h]	Etanol [g/l]		
	0 g/t pectinasa más 0 g/t xilanasa	75 g/t pectinasa más 75 g/t xilanasa	200 g/t pectinasa más 200 g/t xilanasa
1	0,0	0,0	0,0
21,5	39,3	41,0	41,0
29,75	51,3	53,7	54,5
46,5	69,4	74,9	75,4
54	76,8	81,8	80,0
69	80,8	81,6	81,8
76	81,3	82,4	82,1
92,5	81,8	81,8	82,9

Figura 2: El trascurso de tiempo de la producción de etanol durante el proceso de fermentación en presencia (75 g/t y 200 g/t) y ausencia (0 g/t) de la composición enzimática que comprende una xilanasa más una pectinasa.

- 5 La Tabla 2 y la Figura 2 demuestran que un tratamiento con la composición enzimática que comprende una xilanasa y una pectinasa (75 g/t y 200 g/t de ambas enzimas) acelera la producción de etanol durante el proceso de fermentación en comparación con la ausencia de la composición enzimática que comprende una xilanasa y un pectinasa (0 g/t de ambas enzimas).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 i) Convertir el material que contiene almidón a azúcares fermentables, en donde el material que contiene almidón es maíz, seguido de
- ii) Fermentación de los azúcares fermentables con un microorganismo a mosto fermentado,
- iii) Someter el medio de fermentación durante el proceso de fermentación a una composición enzimática que comprende una xilanasa y una pectinasa,
- iv) Separación del producto de fermentación en el mosto fermentado.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el producto de fermentación se selecciona del grupo que consiste en un ácido, un alcohol e hidrógeno.
3. El método según la reivindicación 2, en donde el alcohol se selecciona del grupo que consiste en etanol, butanol, propanol, metanol, propanodiol y butanodiol.
- 15 4. El método según la reivindicación 2, en donde el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, ácido butírico y ácido fórmico.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el microorganismo es una bacteria, levadura u hongo.
6. Un método de producción de un producto de fermentación, que comprende
- 20 (a) someter a licuefacción un material que contiene almidón con una alfa amilasa y presacarificar el material licuado, antes de la etapa (b);
- (b) sacarificar el material licuado, seguido de
- (c) fermentar usando un organismo de fermentación; en donde una composición enzimática que comprende una xilanasa y una pectinasa se añade durante la etapa de fermentación (c).
- 25 7. El método según la reivindicación 6, en donde el producto de fermentación se selecciona del grupo que consiste en un ácido, un alcohol e hidrógeno.
8. El método según la reivindicación 7, en donde el alcohol se selecciona del grupo que consiste en etanol, butanol, propanol, metanol, propanodiol y butanodiol.
9. El método según la reivindicación 7, en donde el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, ácido butírico y ácido fórmico.
- 30 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el material que contiene almidón se obtiene de cereales y/o tubérculos.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el material que contiene almidón se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, centeno, mijo, sorgo y milo.
- 35 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde el microorganismo es una bacteria, levadura u hongo.

FIGURA 1

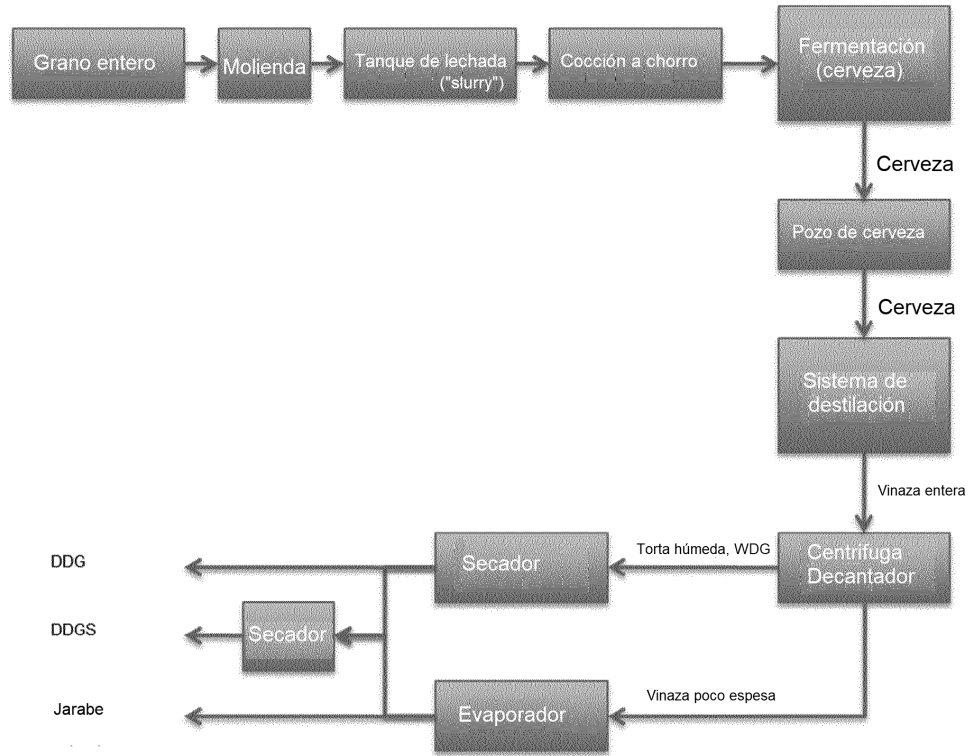


FIGURA 2

