

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 102**

51 Int. Cl.:

A23K 10/14 (2006.01)

A23K 10/38 (2006.01)

C12H 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/EP2013/055836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14127851**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13711665 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2958438**

54 Título: **Ligantes de micotoxinas**

30 Prioridad:

21.02.2013 EP 13156259

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

15.04.2019

73 Titular/es:

**DIREVO INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY GMBH
(50.0%)**

**Nattermannallee 1
50829 Köln, DE y
BASF ENZYMES, LLC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ELEND, CHRISTIAN y
KRÄMER, MARCO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 709 102 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

Ligantes de micotoxinas

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a un nuevo ligante de micotoxinas. La presente descripción se refiere además al uso de enzimas para mejorar la capacidad de unión a micotoxinas de subproductos derivados de un proceso de producción fermentativo y a composiciones que comprenden enzimas capaces de degradar componentes en la pasta fermentada en el proceso de fermentación.

Antecedentes de la invención

10 Las micotoxinas son metabolitos secundarios segregados por una diversidad de hongos, a menudo producidos en granos de cereales, así como en forrajes antes, durante y después de la recolección. En la naturaleza, los forrajes y los cereales se ponen en contacto con esporas fúngicas.

15 Algunos hongos producen toxinas solo a niveles específicos de humedad, temperatura u oxígeno. Los efectos de las micotoxinas varían mucho con respecto a su gravedad. Algunas micotoxinas son mortales, algunas provocan enfermedades identificables o problemas de salud, algunas debilitan el sistema inmunológico sin producir síntomas específicos de esa micotoxina, algunas actúan como alérgenos o irritantes, y algunas no tienen efectos conocidos sobre animales o seres humanos. Según informes recientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), aproximadamente 25% del suministro mundial de grano está contaminado con micotoxinas. La contaminación por micotoxinas tiene un impacto económico negativo sobre los productores de alimentos y piensos, en particular los productores de granos y aves de corral.

20 La formación de micotoxinas puede producirse cuando los hongos causativos crecen sobre los cultivos en el campo, durante la recolección, durante el almacenamiento o durante el procesamiento del pienso, fundamentalmente, siempre que existan condiciones favorables para su formación. Es difícil hacer generalizaciones acerca de la distribución geográfica de tipos concretos de micotoxinas, debido a la amplia distribución de los hongos causativos. Sin embargo, las aflatoxinas y la fumonisina tienden a prevalecer en climas más templados, mientras que en las regiones más frías con mayor humedad aparecen la ocratoxina, la zearalenona, la vomitoxina (desoxinivalenol, DON), la toxina T2 y otras. Cada micotoxina tiene su propio efecto concreto y todas pueden ser terribles. La cocontaminación por uno o más tipos de micotoxinas se produce de modo natural y ejerce un mayor impacto negativo sobre la salud y la productividad del ganado que la contaminación por micotoxinas individuales.

30 Los efectos físicos de las micotoxinas varían de una menor ingesta de alimentos y baja conversión del pienso a una incapacidad general para crecer de un animal. Los síntomas varían según la toxina. La vomitoxina, denominada factor de rechazo del pienso, afecta principalmente a los cerdos.

35 La zearalenona afecta a los órganos reproductores de cerdos y del ganado para la producción de leche. La fumonisina provoca un trastorno nervioso en caballos debido a su impacto sobre el cerebro. La ocratoxina provoca daños renales. Las aves de corral y los cerdos son sensibles a la ocratoxina, mientras que el ganado para la producción de leche puede tolerar niveles más altos de ocratoxina debido a su biotransformación en una forma no tóxica por las bacterias ruminales. Las aflatoxinas, la micotoxina más habitual, provocan una mayor susceptibilidad a enfermedades. Al nivel de órgano o celular, las micotoxinas se diferencian en sus efectos. Las aflatoxinas provocan daños graves en el hígado y el riñón y la zearalenona en los órganos reproductores. Otros índices de micotoxicosis incluyen el hinchamiento de las glándulas mamarias y la atrofia ovárica (zearalenona), lesiones orales en pollitos (toxinas T2), trastornos del sistema nervioso y necrosis de las extremidades (alcaloides ergóticos). Las micotoxinas también pueden afectar a la salud humana, puesto que muchas se trasladan a la leche o la carne tras su ingestión por el animal. Por ejemplo, las aflatoxinas aparecen en la leche como aflatoxina M1, un metabolito.

45 Los síntomas agudos de la micotoxicosis a menudo son relativamente fáciles de identificar. Sin embargo, los síntomas crónicos, que incluyen una actuación ligeramente disminuida y/o inmunosupresión, pueden provocar mayores pérdidas económicas. Los métodos tradicionales para enfrentarse a las micotoxinas incluyen el uso de inhibidores de mohos para prevenir el crecimiento de mohos en piensos almacenados. Sin embargo, en particular en la industria del ganado, las circunstancias económicas obligan a los productores a encontrar formas para emplear piensos contaminados por micotoxinas.

50 Las micotoxinas pueden aparecer en la cadena alimentaria como resultado de una infección fúngica de productos vegetales, tales como forraje, grano, proteína vegetal, fibra dietética y productos de melazas y en subproductos de cereales procesados, y pueden ser consumidas directamente por los seres humanos o pueden ser introducidas por granos, ganado u otros productos de piensos animales contaminados. Las micotoxinas son muy resistentes a la descomposición durante la digestión, por tanto permanecen en la cadena alimentaria en productos comestibles (por ejemplo, carne, pescado, huevos y productos lácteos) o bajo la forma de metabolitos de la toxina originaria ingerida.

55 Los métodos habituales han incluido la dilución de piensos contaminados con productos de piensos que se sabe que no contienen micotoxinas, la separación física para retirar los piensos muy contaminados, y la amoniación o el

calentamiento para desintoxicar los piensos. Estos métodos son muy trabajosos y caros, y pueden no ser eficaces contra ciertas micotoxinas.

Un método más viable para gestionar los piensos contaminados con micotoxinas es mezclar una sustancia capaz de unirse a las micotoxinas y captarlas, evitando así la absorción de las toxinas hacia la corriente sanguínea del animal. Muy pocos productos químicos han demostrado tener el éxito suficiente para poder ser usados a nivel comercial. Entre estos, el uso de arcillas minerales como ligantes es habitual. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.149.549 indica el uso de una arcilla de montmorillonita, en particular una arcilla de bentonita, mezclada con piensos animales como ligante de micotoxinas. La patente de EE. UU. n.º 5.165.946 indica el uso de una arcilla de montmorillonita en combinación con un secuestrante adecuado, en particular sales de fosfato y polifosfato, como ligante de micotoxinas. La patente de EE. UU. n.º 5.639.492 perfecciona aún más la técnica e indica el uso de una arcilla de bentonita de calcio activada con ácidos mezclada con piensos animales para reducir los efectos de la contaminación por micotoxinas.

Sin embargo, las arcillas como ligantes de micotoxinas presentan limitaciones significativas. Las arcillas deben incluirse en los piensos animales a niveles altos para que se produzca una unión de micotoxinas significativa.

Además, la mayoría de las arcillas presentan una gama de eficacia de unión limitada, y solo se unen a las aflatoxinas en un grado significativo. Además, en situaciones de producciones ganaderas domésticas, las arcillas excretadas pueden provocar problemas con la obturación del equipo de manipulación del estiércol. Así, es necesario un agente de unión a micotoxinas que sea eficaz contra una amplia gama de micotoxinas que pueda mezclarse con los piensos animales a unas tasas de inclusión más bajas que las que pueden usarse en la actualidad con sustancias empleadas habitualmente para unirse a micotoxinas en piensos.

El documento US 2010/189856 A1 describe el uso de DDGS para unirse a micotoxinas en un pienso animal. Los DDGS se tratan enzimáticamente con proteasa, beta-glucanasa y celulosa antes de ser utilizados.

El documento US 2010/189856 A1 describe el uso de una biomasa de levaduras con granos de destilería húmedos para la unión de micotoxinas en animales.

El documento WO 2012/084225 A1 se refiere a un proceso mejorado para producir un producto de fermentación, en particular etanol.

Por tanto, un objeto de la presente descripción consiste en proporcionar nuevos ligantes de micotoxinas y métodos mejorados para producir ligantes de micotoxinas para el uso en animales.

Sumario de la descripción

La presente descripción se refiere al uso de subproductos derivados de un proceso de producción fermentativo, en particular a partir de un proceso de fermentación de etanol, para unir micotoxinas en un animal, en el que el subproducto se selecciona del grupo que consiste en granos de destilería húmedos ("distillers' wet grain", DWG), granos de destilería desecados ("distillers' dried grains", DDG), productos solubles de destilería ("distillers' solubles", DS), productos solubles de destilería desecados ("distillers' dried solubles", DDS), granos de destilería desecados con productos solubles ("distillers' dried grain with solubles", DDGS), y sus mezclas.

La presente invención solo se define por sus reivindicaciones. El término "realizaciones" y la expresión "aspectos de la invención", etc., según se lista a continuación, tienen un objetivo ilustrativo.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para mejorar la capacidad de unión a micotoxinas de un subproducto derivado de un proceso de producción fermentativo, que comprenden las etapas de: i) someter la pasta fermentada después de la fermentación a una composición de enzimas capaz de degradar uno o más componentes de la pasta fermentada, ii) separar el producto de fermentación principal deseado, iii) separar el subproducto de la fermentación que tiene capacidades de unión a micotoxinas.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para producir un ligante de micotoxinas que comprende un subproducto de la fermentación surgido de un material que contiene almidón en un proceso de producción de etanol, comprendiendo dicho método las etapas de:

- i) convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables,
- ii) fermentar los azúcares fermentables con una levadura para producir una pasta fermentada,
- iii) someter la pasta fermentada después del proceso de fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa,
- iv) separar el etanol en la pasta fermentada mediante destilación,
- v) separar el subproducto.

Además, otros aspectos de la presente descripción se refieren al uso de una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa para mejorar la capacidad de unión a micotoxinas de un subproducto derivado de una pasta fermentada en un proceso de producción fermentativo de etanol.

5 Otro aspecto se refiere a métodos para producir un subproducto exento de micotoxinas derivado de un proceso de producción fermentativo que emplea un material que contiene almidón contaminado con micotoxinas, que comprenden las etapas de: i) someter la pasta fermentada después de la fermentación a una composición de enzimas capaz de degradar una o más micotoxinas, ii) separar el producto de fermentación principal deseado, iii) separar el subproducto de la fermentación que tiene un contenido bajo en micotoxinas.

10 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para producir un ligante de micotoxinas que comprende un subproducto de la fermentación surgido de un material que contiene almidón en un proceso de producción de etanol, comprendiendo dicho método las etapas de:

i) convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables,

ii) fermentar los azúcares fermentables con una levadura para producir una pasta fermentada,

15 iii) someter la pasta fermentada antes o después del proceso de fermentación a una composición de enzimas que comprende una enzima capaz de degradar las micotoxinas presentes que se originan del material que contiene almidón,

iv) someter la pasta fermentada después del proceso de fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa,

v) separar el producto de fermentación principal en la pasta fermentada,

20 vi) separar el subproducto.

Además, otros aspectos de la presente descripción se refieren al uso de una composición de enzimas que comprende capacidades de degradación de micotoxinas para retirar las micotoxinas presentes en el material que contiene almidón y/o que comprende una beta-1,3-glucanasa para mejorar la capacidad de unión a micotoxinas de un subproducto derivado de una pasta fermentada en un proceso de producción fermentativo de etanol.

25 **Breve descripción de los dibujos**

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

La figura 2 muestra esquemáticamente un proceso de etanol que incluye un tanque de fermentación in situ para la producción de enzimas basada en WDG.

30 La figura 3 muestra esquemáticamente un proceso de etanol que incluye un tanque de fermentación in situ para la producción de enzimas basada en residuos de destilería totales.

La figura 4 es un diagrama que muestra la unión mayor de zearalenona por sobrenadantes de células de levadura tratadas de modo enzimático.

La figura 5 es un diagrama que muestra la unión mayor de zearalenona por sobrenadantes de células de levadura tratadas con Glu4 y Glu5.

35 La figura 6 es un diagrama que muestra las capacidades de unión de zearalenona por los DDGS, células de levadura y otros glucanos.

La figura 7 es un diagrama que muestra las capacidades de unión de zearalenona por diferentes productos de DDGS.

Descripción de la invención

40 El objeto de la presente es proporcionar nuevos productos con una mejor calidad y funcionalidad para unirse a micotoxinas en animales.

Se han identificado un gran número de micotoxinas. En la actualidad, existe cinco grupos principales de interés agrícola concreto: las aflatoxinas, los tricotenos (por ejemplo, desoxinivalenol), el grupo de la zearalenona, las fumonisinas y las toxinas endofíticas.

45 Las aflatoxinas pueden provocar una reducción del crecimiento, una inmunidad suprimida, una eficacia del pienso reducida y una mayor mortalidad en ganado, entre otros síntomas. En cerdos puede observarse una eficacia del pienso reducida, una mayor mortalidad y menores tasas de crecimiento. En las aves de corral se producen síntomas similares y una menor capacidad para metabolizar las grasas, las proteínas y el almidón.

La zearalenona, en el ganado y los cerdos, imita al estrógeno y produce una considerable reducción en la actuación reproductiva, un menor crecimiento, una producción reducida de leche y una eficacia del pienso reducida. En las aves de corral se observa una mayor mortalidad.

5 El desoxinivalenol (DON), un ejemplo de tricoteno, provoca síntomas graves en el ganado, cerdos y aves de corral, que incluyen efectos gástricos, tales como vómitos, tasas de crecimiento reducidas, menor producción de huevos, diarreas y una eficacia del pienso reducida.

10 La fumonisina produce efectos negativos a través de una reducción en la circulación de la sangre y del gasto cardíaco, al menos en parte debido a receptores de esfingosina agonizantes. De esta forma reducen el crecimiento y provocan edemas pulmonares en cerdos y aves de corral. Esta reducción de la circulación afecta a todos los órganos principales, incluyendo el hígado, y puede exacerbar y potenciar los efectos de otras toxinas que también pueden estar presentes.

La ocratoxina puede ser carcinogénica en el ser humano y produce inmunosupresión en animales de granja. El lolitreto B (*Acremonium lolii* en el césped inglés) es un ejemplo de una toxina endófitica que produce una forma de alteraciones nerviosas que a menudo se confunden con la hipomagnesemia.

15 De forma sorprendente, los inventores han descubierto que ciertos subproductos derivados de un proceso de producción fermentativo tienen un uso excelente como ligantes de micotoxinas en mamíferos. En particular, el subproducto de granos de destilería desecados con productos solubles ("distillers' dried grain with solubles", DDGS) del maíz se une de modo excelente a micotoxinas debido a su estructura específica.

20 En una realización ventajosa, el tratamiento de la pasta fermentada con una composición de enzimas que comprende beta-1,3-glucanasa en un proceso de producción de etanol que emplea levaduras como microorganismo fermentador produce un subproducto del proceso de fermentación con capacidades de unión a micotoxinas aún más mejoradas, que puede usarse, por tanto, como un pienso animal.

25 En una realización ventajosa, la micotoxina que se va a unir y/o que se va a degradar es un tricoteno, tal como desoxinivalenol, o es zearalenona, aflatoxina, fumonisina, roquefortina, una ocratoxina o una toxina endófitica. En particular, la micotoxina es zearalenona.

30 Un aspecto de la presente descripción se refiere a métodos para la producción de subproductos de unión a micotoxinas derivados de un proceso de producción fermentativo, que comprenden las etapas de: i) someter la pasta fermentada después de la fermentación a una composición de enzimas capaz de degradar uno o más componentes de la pasta fermentada, ii) separar el producto de fermentación principal deseado, iii) separar el subproducto de la fermentación que tiene capacidades de unión a micotoxinas.

35 Los subproductos o residuos de un proceso de fermentación incluyen granos de destilería, granos de cervecería, granos de destilería desecados, productos solubles de destilería desecados, granos de destilería desecados con productos solubles, WDG o/y restos de la industria de procesamiento de cereales o sus mezclas. Por ejemplo, los DDGS son el residuo desecado que permanece después de que la fracción de almidón del maíz se fermenta con levaduras y enzimas seleccionadas para producir etanol y dióxido de carbono. Después de finalizar la fermentación se retira el alcohol mediante destilación y los residuos de la fermentación remanentes se secan.

40 En algunas realizaciones ventajosas, el subproducto se selecciona del grupo que consiste en granos de destilería húmedos ("distillers' wet grain", DWG), granos de destilería desecados ("distillers' dried grains", DDG), productos solubles de destilería ("distillers' solubles", DS), productos solubles de destilería desecados ("distillers' dried solubles", DDS), granos de destilería desecados con productos solubles ("distillers' dried grain with solubles", DDGS), y sus mezclas. En particular, el subproducto que tiene capacidades de unión a micotoxinas es DDGS.

45 Los residuos de destilería son el producto que permanece después de que la pasta haya sido convertida en azúcares, fermentada y destilada para producir etanol. Los residuos de destilería pueden separarse en dos fracciones, tal como mediante centrifugación o tamizado: (1) la torta húmeda (fase sólida), y (2) los residuos de destilería finos (sobrenadante). La fracción sólida o granos de destilería húmedos (DWG) pueden prensarse para eliminar el exceso de humedad y después secarse para producir los granos de destilería desecados (DDG). Después de haber retirado el etanol de la fracción líquida, el líquido remanente puede evaporarse para concentrar el material soluble en productos solubles de destilería (DS) condensados o puede secarse y triturarse para crear los productos solubles de destilería desecados (DDS). Los DDS a menudo se mezclan con DDG para formar los granos de destilería desecados con productos solubles (DDGS). Los DDG, DDGS, y DWG se denominan colectivamente granos de destilería.

50 En una realización de la presente descripción se añaden enzimas durante y/o preferiblemente después de la fermentación a la pasta fermentada en el proceso de producción y antes de la etapa de separación del producto de fermentación principal, en particular mediante destilación, por lo cual el producto de fermentación principal deseado se separa del resto de la pasta fermentada. Las enzimas según la presente descripción son capaces de degradar, en particular, las células de levadura en la pasta fermentada (cerveza o pasta de cerveza), lo cual mejora la capacidad de unión a micotoxinas de los subproductos o residuos, tales como granos de cervecería, granos de

destilería desecados, productos solubles de destilería desecados, granos de destilería desecados con productos solubles, WDG o/y restos de la industria de procesamiento de cereales o sus mezclas, a la vista de su contenido en micotoxinas. Los componentes de la pasta fermentada pueden ser, en particular, las paredes celulares de las células de levaduras fermentadoras.

5 De modo sorprendente, la degradación de las propias células de levaduras fermentadoras mediante la adición de una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa y/o una esterasa y/o una epoxidasa, también provoca una disminución en el contenido en micotoxinas en la propia pasta de cervecera, lo cual produce un aumento en la calidad nutricional y la funcionalidad de los subproductos.

10 En una realización ventajosa, las composiciones de enzimas usadas en los métodos según la presente descripción son capaces de degradar los componentes de la pared celular de las células de levaduras fermentadoras después de la etapa de fermentación, lo cual provoca la unión de una o más micotoxinas en el subproducto de la fermentación.

15 Por tanto, la descripción se refiere además a métodos para producir un subproducto exento de micotoxinas derivado de un proceso de producción fermentativo que emplea un material que contiene almidón contaminado con micotoxinas, que comprenden las etapas de: i) someter la pasta fermentada después de la fermentación a una composición de enzimas capaz de degradar una o más micotoxinas, ii) separar el producto de fermentación principal deseado, iii) separar el subproducto de la fermentación que tiene un contenido bajo en micotoxinas.

20 En un aspecto de la presente descripción, la calidad de los subproductos procedentes de un proceso de producción fermentativo, tales como DDG, DDGS o WDG, puede mejorarse con los métodos según la presente descripción aumentando el contenido en β -glucano y, por tanto, las capacidades de unión a micotoxinas de los subproductos.

El método de la descripción puede usarse con una cerveza derivada de la producción de cualquier producto de fermentación adecuado. La materia prima para producir el producto de la fermentación puede ser cualquier material que contenga almidón y/o azúcar, preferiblemente, un material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, que incluye caña de azúcar, tubérculos, raíces, grano entero y cualquiera de sus combinaciones.

25 El material que contiene almidón puede obtenerse de cereales. Un material que contiene almidón adecuado incluye maíz, trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, triticale, patata o cualquiera de sus combinaciones.

30 La materia prima preferida es el maíz, en especial cuando el producto de la fermentación es el etanol. El material que contiene almidón también puede consistir o comprender, por ejemplo, una corriente lateral procedentes del procesamiento del almidón, por ejemplo, corrientes del proceso que contienen carbohidratos C6 que pueden no ser adecuados para la producción de jarabes. Los componentes de la cerveza incluyen los componentes de fibra, cáscaras, germen, aceite y proteínas procedentes de la materia prima que contiene almidón, así como almidón no fermentado, levaduras, paredes celulares de levaduras y productos residuales. La producción de un producto de fermentación generalmente se divide en las siguientes etapas principales del proceso: a) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, por ejemplo, mediante molienda en seco o en húmedo; b) cocer el material que contiene almidón en una suspensión acuosa para gelatinizar el almidón, c) licuar el material que contiene almidón gelatinizado para descomponer el almidón (mediante hidrólisis) en maltodextrinas (dextrinas); d) sacarificar las maltodextrinas (dextrinas) para producir azúcares de bajo peso molecular (por ejemplo, DP1-2) que pueden ser metabolizados por un organismo fermentador; e) fermentar el material sacarificado empleando un organismo fermentador adecuado que convierte, directa o indirectamente, los azúcares de bajo peso molecular en el producto de fermentación deseado; f) recuperar el producto de fermentación, por ejemplo, mediante destilación para separar el producto de la fermentación de la pasta de fermentación.

45 Tal como se explicó anteriormente, la cerveza (o la pasta fermentada) 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 principal puede ser cualquier producto de fermentación, que incluye alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanol); 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, H₂ y CO₂), y compuestos más complejos que incluyen, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. La fermentación también se utiliza habitualmente en la producción de alcoholes consumibles (por ejemplo, licores blancos, cerveza y vino), productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso), cuero y en la industria del tabaco. En una realización preferida, el producto de fermentación es un líquido, preferiblemente un alcohol, en especial etanol. La cerveza contemplada según la invención puede ser el producto que resulta de un proceso de producción de productos de fermentación que incluye las etapas a) a f) mencionadas anteriormente. Sin embargo, la cerveza también puede ser el producto que resulta de otros procesos de producción de productos de fermentación basados en un material de partida que contiene almidón y/o lignocelulosa.

55 El organismo fermentador puede ser un organismo fúngico, tal como levaduras, o bacterias. Las bacterias adecuadas pueden ser, por ejemplo, especies de *Zymomonas*, tales como *Zymomonas mobilis* y *E. coli*. Los

ejemplos de hongos filamentosos incluyen cepas de especies de *Penicillium*. Los organismos preferidos para la producción de etanol son las 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.

- 5 En otra realización, los sólidos procedentes de la etapa de fermentación pueden fraccionarse. Después de la fermentación pueden retirarse grandes trozos de fibras antes o después de la destilación. La retirada puede realizarse con un recogedor para superficies líquidas antes de la destilación de la cerveza. El material puede separarse de la mezcla de etanol/agua, por ejemplo, mediante centrifugación. Como alternativa, las fibras y los gérmenes puede retirarse tamizando los residuos de destilería totales después de la destilación o los granos triturados antes de la fermentación. Después de retirar los gérmenes y los trozos grandes de fibras, la cerveza o los residuos de destilería totales remanentes se tratan con enzimas o combinaciones de enzimas para mejorar aún más la calidad nutricional del subproducto final, tal como DDGS, que se va a usar.

Además, la adición de las enzimas según la presente descripción a la pasta fermentada antes de la etapa de separación, tal como una etapa de destilación, resulta ventajosa puesto que las enzimas en las composiciones de 15 enzimas son inactivadas durante la destilación.

Debido a su mejor calidad, los subproductos y los residuos pueden usarse como pienso animal de alta calidad con una mayor capacidad para unirse a micotoxinas en animales y/o los propios subproductos muestran un menor contenido en micotoxinas si el material que contiene almidón utilizado como materia prima para la fermentación estaba contaminado con micotoxinas.

- 20 En una realización, la descripción se refiere a métodos para formular aditivos de piensos útiles desde el punto de vista nutricional como coproductos de los métodos indicados anteriormente para mejorar las características de unión a micotoxinas de un producto de pienso animal.

Los procesos para producir productos de fermentación, tales como el etanol, a partir de un material que contiene almidón o lignocelulosa son muy conocidos en la técnica. La preparación del material que contiene almidón, tal como maíz, para su utilización en dichos procesos de fermentación generalmente comienza triturando el maíz en un proceso de trituración en seco o de molienda en húmedo. Los procesos de molienda en húmedo implican fraccionar el maíz en diferentes componentes, de los cuales solo la fracción del almidón entra en el proceso de fermentación. Los procesos de trituración en seco implican triturar los granos de maíz para producir una harina y mezclar la harina con agua y enzimas. En general, se emplean dos tipos diferentes de procesos de trituración en seco. El proceso que se emplea más habitualmente, a menudo denominado "proceso convencional", incluye triturar el material que contiene almidón y después licuar el almidón gelatinizado a alta temperatura usando generalmente una alfa-amilasa bacteriana, seguido de una sacarificación y fermentación simultáneas ("simultaneous saccharification and fermentation", SSF) realizada en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación. Otro proceso muy conocido, a menudo denominado proceso de "hidrólisis de almidón bruto" ("raw starch hydrolysis", proceso RSH), incluye triturar el material que contiene almidón y después 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.

En un proceso para producir etanol a partir del maíz, después de una SSF o del proceso RSH, el etanol se destila de la pasta total después de la fermentación. La suspensión sin etanol resultante, denominada habitualmente residuos de destilería totales, se separa en las fracciones sólida y líquida (concretamente, la torta húmeda y los residuos de destilería finos que contienen aproximadamente 35% y 7% de sólidos, respectivamente). Los residuos de destilería finos a menudo se condensan mediante evaporación para producir unos residuos de destilería espesos o jarabe y se recombinan con la torta húmeda y se vuelven a secar para producir granos de destilería desecados con productos solubles (DDGS) para su uso en piensos animales.

- 45 El método de la invención puede usarse con una cerveza derivada de la producción de cualquier producto de fermentación adecuado. La materia prima para producir el producto de la fermentación puede ser cualquier material que contenga almidón y/o azúcar, preferiblemente, un material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, que incluye caña de azúcar, tubérculos, raíces, grano entero y cualquiera de sus combinaciones.

El material que contiene almidón puede obtenerse de cereales. Un material que contiene almidón adecuado incluye maíz, trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, triticale, patata o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización ventajosa, las composiciones de enzimas comprenden una beta-1,3-glucanasa, en particular para la degradación de las paredes celulares de los microorganismos fermentadores. Para evitar la degradación de los microorganismos fermentadores, la composición de enzimas se añade después de la etapa de fermentación. Tal como se emplea en la presente "después de la fermentación" o "después de la etapa de fermentación" significa que una gran parte o todos los azúcares fermentables, tales como la glucosa, se convierten en los productos de fermentación deseados, tales como etanol.

En una realización, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa y una 1,6-beta-glucanasa. En otra realización, la composición de enzimas comprende una proteasa. En otra realización, la composición de

enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa y una proteasa. En otra realización, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa, una 1,6-beta-glucanasa y una proteasa.

En otra realización, la composición de enzimas comprende una mananasa. En otra realización, la composición de enzimas comprende una mananasa y una beta-1,3-glucanasa.

- 5 Otras realizaciones se refieren a métodos para producir un subproducto exento de micotoxinas derivado de un proceso de producción fermentativo que emplea un material que contiene almidón contaminado con micotoxinas, que comprenden las etapas de: i) someter la pasta fermentada después de la fermentación a una composición de enzimas capaz de degradar una o más micotoxinas, ii) separar el producto de fermentación principal deseado, iii) separar el subproducto de la fermentación que tiene un contenido bajo en micotoxinas. En realizaciones ventajosas, la composición de enzimas comprende una esterasa y/o una epoxidasa. En otras realizaciones, la composición de enzimas comprende además una beta-1,3-glucanasa.

15 Las beta-1,3-glucanasas, tal como se emplean en la presente, son enzimas capaces de degradar el glucano. El glucano y la quitina son mucho más resistentes a la degradación microbiana que la celulosa, que es el constituyente principal de la pared celular de muchas levaduras y organismos similares a hongos. El glucano está predominantemente beta-1,3-enlazado con algunas ramificaciones a través de un 1,6-enlace (Manners *et al.*, Biotechnol. Bioeng, 38, p. 977, 1973), y se sabe que es degradable por ciertos sistemas de beta-1,3-glucanasa. La beta-1,3-glucanasa incluye el grupo de endo-beta-1,3-glucanasas, también denominadas laminarinasas (E.C. 3.2.1.39 y E.C. 3.2.1.6, Enzyme Nomenclature, Academic Press, Inc. 1992).

20 En la técnica anterior se han descrito una serie de genes de beta-1,3-glucanasa y sus usos. Un ejemplo es el documento DD 226012 (Akad. Wissenschaft, DDR), que se refiere a un método para la producción de una beta-1,3-glucanasa de *Bacillus*. Además, el documento JP 61040792 A (DOI K) describe un plásmido recombinante de citolasa de la pared celular y beta-1,3-glucanasa para eliminar las paredes celulares de levaduras. El gen se deriva de *Arthrobacter* y se transforma en bacterias del grupo de la *Escherichia*. El documento EP 440.304 se refiere a plantas a las que se les proporciona una resistencia mejorada contra hongos patógenos transformadas con al menos un gen que codifica una quitinasa intracelular o una beta-1,3-glucanasa intra- o extracelular. También se describen los correspondientes polinucleótidos recombinantes. El documento WO 87/01388 (The Trustees of Columbia University) describe un método para preparar enzimas líticas celulares, tales como beta-1,3-glucanasas, que pueden ser producidas por *Oerksovia*. El documento WO 92/03557 (Majesty (Her) in Right of Canada) describe un vector de expresión de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN de 2,7 kb derivada de *Oerskovia xanthineolytica*, que codifica una beta-1,3-glucanasa. A partir del documento WO 92/16632 se conoce una secuencia de ADN recombinante para codificar una nueva proteína con actividad beta-1,3-glucanasa.

25 Los ejemplos de beta-1,3-glucanasas disponibles en el mercado son Rohalase BX de AB Enzymes y Rapidase Glucalees de DSM.

35 Las mananasas son hemicelulasas clasificadas como EC 3.2.1.78, y se denominan endo-1,4-beta-manosidasas. La mananasa incluye la beta-mananasa, la endo-1,4-mananasa, y la galacto-mananasa. La mananasa preferiblemente es capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-manosídicos en mananos, que incluyen glucomanos, galactomananos y galactoglucomanos. Los mananos son polisacáridos compuestos principalmente o por completo de unidades de D-manosa. La mananasa puede tener cualquier origen, tal como una bacteria o un organismo fúngico. En una realización específica, la mananasa se deriva de una cepa del género de hongo filamentoso *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma reseei*. En una realización, la mananasa es una de las mananasas descritas en el documento WO2008/009673.

45 Las mananasas se han identificado en varios organismos de *Bacillus*. Por ejemplo, Talbot *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, n.º 11, pp. 3505-3510 (1990) describen una beta-mananasa derivada de *Bacillus stearothermophilus*. Mendoza *et al.*, World J. Microbiol. Biotech., vol. 10, n.º 5, pp. 551-555 (1994) describen una beta-mananasa derivada de *Bacillus subtilis*. El documento JP-A-03047076 describe una beta-mananasa derivada *Bacillus* sp. El documento JP-A-63056289 describe la producción de una beta-mananasa alcalina termoestable. El documento JP-A-63036775 se refiere al microorganismo de *Bacillus* FERM P-8856 que produce beta-mananasa y beta-manosidasa. El documento JP-A-08051975 describe beta-mananasas alcalinas procedentes de *Bacillus* sp. AM-001 alcalófilo. En el documento WO 97/11164 se describe una mananasa purificada a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*. El documento WO 91/18974 describe una hemicelulasa, tal como una glucanasa, xilanasa o mananasa activa. Los ejemplos de mananasas disponibles en el mercado incluyen GAMANASE (TM) disponible en Novozymes A/S Dinamarca, y Rohapect GMP™ disponible en AB Enzymes GmbH.

50 La mananasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,3 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^6$ unidades por tonelada de pasta de cerveza.

55 Las proteasas, tal como se emplean en la presente descripción, son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos. Las proteasas adecuadas incluyen proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas que se caracterizan por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7

- Las proteasas fúngicas ácidas adecuadas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Las proteasas comerciales incluyen GC 106(TM) y SPEZYME(TM) FAN (disponibles en Genencor, EE. UU.). Las proteasas bacterianas adecuadas, aunque no sean proteasas ácidas, incluyen los productos disponibles en el mercado ALCALASE(TM) y NEUTRASE(TM) (disponibles en Novozymes A/S).
- 5 La proteasa puede añadirse en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,002 \times 10^6$ - 314×10^6 unidades por tonelada de pasta de cerveza.
- En otro aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para producir un ligante de micotoxinas que comprende un subproducto de la fermentación surgido de un material que contiene almidón en un proceso de producción de fermentación, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 i) convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables,
- ii) fermentar los azúcares fermentables con una levadura para producir una pasta fermentada,
- iii) someter la pasta fermentada después del proceso de fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa,
- 15 iv) separar el producto de fermentación principal en la pasta fermentada,
- v) separar el subproducto.
- En otro aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para producir un ligante de micotoxinas que comprende un subproducto de la fermentación surgido de un material que contiene almidón en un proceso de producción de fermentación, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 20 i) convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables,
- ii) fermentar los azúcares fermentables con una levadura para producir una pasta fermentada,
- iii) someter la pasta fermentada después de la fermentación a una composición de enzimas capaz de degradar una o más micotoxinas,
- 25 iv) someter la pasta fermentada después del proceso de fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa,
- v) separar el producto de fermentación principal en la pasta fermentada,
- vi) separar el subproducto.
- La conversión del material que contiene almidón en azúcares fermentables puede realizarse (a) licuando un material que contiene almidón, y (b) sacarificando el material licuado obtenido en la etapa (a).
- 30 En una realización ventajosa, la composición de enzimas capaz de degradar una o más micotoxinas comprende una enzima seleccionada del grupo que consiste en una esterasa, lipasa, proteasa, oxidasa, aminoácido oxidasa, lactonohidrolasa, peroxidasa, lactoperoxidasa, manganeso peroxidasa, epoxidasa, polisacarasa o deshidrogenasa. En particular, la composición de enzimas comprende una lipasa y/o una epoxidasa.
- La licuación se realiza preferiblemente en presencia de una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana o una alfa-amilasa fúngica ácida. En una realización se añade una pululanasa, una isoamilasa y/o una fitasa durante la licuación.
- 35 Los organismos preferidos para la producción de etanol son las levaduras, tales como, por ejemplo, *Pichia* o *Saccharomyces*. La levadura preferida según la descripción es una especie de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadero. Las células de levadura pueden añadirse en cantidades de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , en especial un recuento de 5×10^7 levaduras viables por ml de caldo de fermentación. Durante la fase productora de etanol, el recuento de células de levadura debe estar preferiblemente en el intervalo de 10^7 a 10^{10} , en especial aproximadamente 2×10^8 . Pueden encontrarse más indicaciones con respecto a la utilización de levaduras para la fermentación, por ejemplo, en "The alcohol Textbook" (editores K. Jacques, T. P. Lyons y D. R. Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido, 1999).
- 40 El microorganismo utilizado para la fermentación se añade a la pasta, y la fermentación continúa hasta que se produce la cantidad deseada de producto de fermentación; en una realización preferida en la que el producto de fermentación que se va a recuperar es el etanol, este tiempo puede ser, por ejemplo, durante 24-96 horas, tal como 35-60 horas. La temperatura y el pH durante la fermentación es una temperatura y un pH adecuados para el microorganismo en cuestión y que toma en cuenta el uso previsto del producto de fermentación, tal como, por ejemplo, en una realización en la que el organismo fermentador es una levadura y el producto que se va a recuperar
- 50

es el etanol, la temperatura preferida estaría en el intervalo de aproximadamente 26-34 °C, por ejemplo, aproximadamente 32 °C, y el pH estaría, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente pH 3-6, por ejemplo, aproximadamente pH 4-5.

5 En otra realización en la que el organismo fermentado es una levadura y la pasta fermentada se va a utilizar como cerveza, la temperatura preferida de la pasta fermentada estaría de aproximadamente 10 a 35 °C, en particular 12-16 °C, en particular 14 °C.

10 Tal 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 emplea una cepa de levaduras de *Saccharomyces diastaticus* (SIHA Amyloferm®, E. Begeow GmbH&Co, Langenlonsheim, Alemania), puesto que su actividad exoamilasa puede romper el almidón líquido y también la dextrina, la maltosa y la melibiosa.

15 En la etapa de licuación, el almidón gelatinizado (pasta corriente abajo) se degrada (hidroliza) para producir maltodextrinas (dextrinas). Para lograr la hidrólisis del almidón se añade una enzima adecuada, preferiblemente una alfa-amilasa. La licuación puede realizarse como un proceso de suspensión en caliente de tres etapas. La suspensión se calienta hasta 60-95 °C, preferiblemente 80-85 °C, y puede añadirse una alfa-amilasa para iniciar la licuación (fluidificación). Después la suspensión puede cocerse a chorro a una temperatura de entre 95-140 °C, preferiblemente 105-125 °C, durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, y en especial durante aproximadamente 5 minutos. La suspensión se enfría hasta 60-95 °C y puede añadirse más alfa-amilasa para completar la hidrólisis (licuación secundaria). El proceso de licuación habitualmente se realiza 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 pueden realizarse como etapas del proceso separadas o como una etapa de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La sacarificación se realiza en presencia de una enzima sacarificante, por ejemplo, una glucoamilasa, una beta-amilasa o una amilasa maltogénica. Opcionalmente se añade una fitasa y/o una proteasa.

25 La sacarificación puede realizarse usando condiciones muy conocidas en la técnica con una enzima sacarificante, por ejemplo, beta-amilasa, glucoamilasa o amilasa maltogénica, y opcionalmente una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, aunque es habitual realizar una presacarificación durante generalmente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65 °C, generalmente de aproximadamente 60 °C, seguida de la sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (proceso SSF). La sacarificación se realiza generalmente a una temperatura de 20-75 °C, preferiblemente de 40-70 °C, generalmente a aproximadamente 60 °C, y a un pH de entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4,5.

30 El proceso que más se emplea para producir un producto de fermentación, en especial etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), en el que no hay una etapa de espera para la sacarificación, lo cual significa que pueden añadirse juntos un organismo fermentador, tal como una levadura, y una o más enzimas, que incluyen una o más hemicelulasas y/o una o más endoglucanasas específicas. El SSF generalmente se realiza a una temperatura de 25 °C a 40 °C, tal como de 28 °C a 35 °C, de 30 °C a 34 °C, preferiblemente a aproximadamente 32 °C. En una realización, la fermentación continúa durante 6 a 120 horas, en particular de 24 a 96 horas.

35 Después de la fermentación, la pasta fermentada se somete a una composición de enzimas según la presente descripción. En una realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa. En otra realización, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa y una 1,6-beta-glucanasa. En otra realización, la composición de enzimas comprende una xilanasa. En una realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa y una xilanasa. En otra realización, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa, una 1,6-beta-glucanasa y una xilanasa. En otras realizaciones, la composición de enzimas comprende además una pectinasa y/o una proteasa. En un ejemplo, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa, una xilanasa y una proteasa. En otro ejemplo, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa, una xilanasa y una pectinasa. En otra realización, la composición de enzimas comprende una mananasa. En una realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una mananasa y una beta-1,3-glucanasa.

50 En una realización concreta, el proceso de la invención comprende además, antes de licuar el material que contiene almidón, las etapas de:

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

55 La suspensión acuosa puede contener del 10-55% en p/p de sólidos secos ("dry solids", DS), preferiblemente del 25-45% en p/p de sólidos secos (DS), más preferiblemente del 30-40% en p/p de sólidos secos (DS) del material que contiene almidón. La suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y puede añadirse una alfa-amilasa, preferiblemente, una alfa-amilasa bacteriana y/o una alfa-amilasa fúngica ácida, para iniciar la licuación

(fluidificación). La suspensión puede cocerse a chorro para gelatinizar aún más la suspensión antes de someterla a una alfa-amilasa en la etapa (a).

En una realización preferida, el material que contiene almidón son cereales molidos, preferiblemente cebada o maíz, y los métodos comprenden una etapa de moler los cereales antes de la etapa (a). En otras palabras, la descripción también incluye métodos en los que el material que contiene almidón se obtiene mediante un proceso que comprende moler cereales, preferiblemente, moler en seco, por ejemplo, mediante un molino de martillo o de rodillos. La trituración también se entiende como molienda, así como cualquier proceso que sea adecuado para abrir los granos individuales y exponer el endospermo para su posterior procesamiento. En la producción de alcohol se emplean normalmente dos procesos de molienda: la molienda en húmedo y en seco. La expresión "molienda en húmedo" indica la molienda del grano entero. En la molienda en seco se muele el grano entero y se emplea en la parte remanente del proceso de formación de la pasta. La pasta puede proporcionarse formando una suspensión que comprende el material que contiene almidón molido y agua para la elaboración de cerveza. El agua para la elaboración de cerveza puede calentarse hasta una temperatura adecuada antes de combinarse con el material que contiene almidón molido para lograr una temperatura de la pasta de 45 a 70 °C, preferiblemente de 53 a 66°C, más preferiblemente de 55 a 60 °C. La pasta generalmente se forma en un tanque conocido como tanque de suspensión.

Después de la fermentación, el producto de fermentación puede separarse del medio de fermentación. La suspensión puede destilarse para extraer el producto de fermentación deseado del medio de fermentación mediante técnicas de microfiltración o de filtración con membrana. Como alternativa, el producto de la fermentación puede recuperarse mediante destilación. Los métodos para recuperar productos de fermentación son muy conocidos en la técnica. Generalmente, se obtiene el producto de la fermentación, por ejemplo, etanol, con una pureza de hasta, por ejemplo, aproximadamente 96% en vol. de etanol.

Después de completar el proceso de la fermentación, el material remanente se considera que son los residuos de destilería totales. Tal como se emplea en la presente, la expresión "residuos de destilería totales" incluye el material que queda al final del proceso de fermentación antes y después de la recuperación del producto de la fermentación, por ejemplo, etanol. El producto de fermentación puede recuperarse opcionalmente mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, los residuos de destilería totales se separan o reparten en una fase sólida y una fase líquida mediante uno o más métodos para separar los residuos de destilería finos de la torta húmeda. Estos métodos incluyen, por ejemplo, la centrifugación y la decantación. El producto de la fermentación puede recuperarse opcionalmente antes o después de separar los residuos de destilería totales en una fase sólida y una fase líquida.

Así, en una realización, los métodos de la descripción comprenden además una destilación para obtener el producto de fermentación, por ejemplo, etanol. La fermentación y la destilación pueden realizarse de modo simultáneo y/o por separado/de modo secuencial, opcionalmente seguidas de una o más etapas del proceso para refinar aún más el producto de la fermentación.

En una realización, el subproducto acuoso (residuos de destilería totales) procedente del proceso de destilación se separa en dos fracciones, por ejemplo, mediante centrifugación: grano húmedo (fase sólida), y residuos de destilería finos (sobrenadante). En otra realización, los métodos de la descripción comprenden además la separación de los residuos de destilería totales mediante una destilación para producir el grano húmedo y los residuos de destilería finos, y el reciclaje de los residuos de destilería finos en el material que contiene almidón antes de la licuación. En una realización, los residuos de destilería finos se reciclan en la suspensión de grano entero molido. La fracción del grano húmedo puede secarse, generalmente en un secador de tambor. El producto desecado se denomina granos de destilería desecados y puede usarse como se mencionó anteriormente como un pienso animal de alta calidad. La fracción de los residuos de destilería finos puede evaporarse para proporcionar dos fracciones (véase la figura 1 y la figura 2): (i) una fracción condensada de 4-6% de DS (principalmente almidón, proteínas y componentes de la pared celular), y (ii) una fracción de jarabe, que consiste principalmente en dextrinas límite y azúcares no fermentables, que puede introducirse en un secador junto con los granos húmedos (procedentes de la etapa de separación de los residuos de destilería totales) para proporcionar un producto denominado granos de destilería desecados con productos solubles que también puede utilizarse como pienso animal. Los residuos de destilería finos es la expresión usada para el sobrenadante de la centrifugación de los residuos de destilería totales. Generalmente, los residuos de destilería finos contienen 4-6% de DS (principalmente almidón y proteínas) y tienen una temperatura de aproximadamente 60-90 °C. En otra realización, los residuos de destilería finos no se reciclan, sino que el vapor condensado de los residuos de destilería finos evaporados se recicla en la suspensión que contiene el grano entero molido que se va a cocer a chorro.

Los expertos en la técnica conocen más detalles acerca de cómo realizar la licuación, la sacarificación, la fermentación, la destilación y la recuperación del etanol.

El producto o productos de fermentación pueden recuperarse opcionalmente a partir del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material celulósico fermentado y se purifica por medio de métodos convencionales de destilación, tal como se mencionó anteriormente. Puede obtenerse etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96% en volumen que puede

usarse, por ejemplo, como etanol para combustible, etanol para bebidas, concretamente, licores blancos neutros potables, o etanol industrial.

5 Las realizaciones específicas descritas en la presente no limitan el alcance de las invenciones descritas y reivindicadas en la presente, puesto que estas realizaciones pretenden ser ilustraciones de varios aspectos de la invención. Se pretende que cualquier realización equivalente se encuentre dentro del alcance de esta invención. En efecto, a partir de la anterior descripción, a los expertos en la técnica les resultarán evidentes diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente. También se pretende que estas modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

15 Las células de levadura de cerveza que se emplean tradicionalmente en las fermentaciones de etanol contienen grandes cantidades de β -glucanos en sus paredes celulares. Estos β -glucanos deben ser hidrolizados mediante el uso de enzimas, y los β -glucanos fragmentados resultantes se ensayan para determinar su capacidad para unirse a micotoxinas retirándolas de una disolución que contiene micotoxinas.

En aplicaciones posteriores, la levadura de cerveza, que es un ingrediente en la pasta fermentada procedente de la fermentación de etanol, debe hidrolizarse dentro del proceso para crear granos de destilería desecados con propiedades de unión a micotoxinas.

1.1 Enzimas:

20 Las siguientes enzimas listadas en la tabla 1 se usaron por sí solas o en diferentes combinaciones.

Tabla 1

Tipo	Nombre corto	Actividad principal	Unidades
β 1-4 glucanasa	Glu1	10016,97	U/g
β 1-4 glucanasa	Glu2	10594,57	U/g
β 1-4 glucanasa	Glu3	3583,18	U/g
β 1-3 glucanasa	Glu5	763,00	U/ml
β 1-3 glucanasa	Glu4	891,00	U/g
β 1-4 glucanasa, hemicelulasa	Glu9	2588,00	U/ml
xilanasa, β 1-4 glucanasa	Tre7		

1.2 Determinación de la actividad del producto de enzima:

25 Sustratos: Glucanasa: β -glucano de la cebada, viscosidad baja (Megazyme). Los sustratos se disolvieron en tampón a una concentración del 0,8% (en p/v). Tampón: Na-acetato 50 mM, pH 4,5.

30 Las enzimas se diluyeron en tampón; debe determinarse la concentración correcta de enzima para cada enzima. Se mezclaron 90 μ l de sustrato y 10 μ l de disolución de enzimas. Se midió un blanco reemplazando la disolución de enzimas por agua. Se realizó una incubación durante 30 min a 37 °C (después de 10 min a 4 °C). Los azúcares reductores se midieron después de mezclar 50 μ l de la mezcla de enzima-sustrato incubado con 50 μ l del reactivo DNSA-Reagent.

La actividad se calcula como unidades por μ l o mg del producto de enzima. Una unidad se define como la cantidad de extremos reductores formados en μ mol por minuto. Una unidad de proteasa se define como la formación de equivalentes de glicina por minuto.

1.3 Hidrólisis de las células de levadura

35 Para la preparación de los β -glucanos de levadura, se usó una disolución al 20% (en p/v) de levadura (polvo de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, Ohly, Hamburgo, Alemania) en tampón Na-acetato 50 mM, pH 4,5. Se introdujeron muestras de 45 ml en tubos Falcon de 50 ml y se trataron como sigue:

- se prepararon disoluciones madre de enzimas de 100 mg/ml en tampón (Na-acetato 50 mM, pH 4,5).

- se añadieron 360 μ l de disolución de enzimas a la disolución de células de levadura y se mezcló a fondo.

- las muestras se incubaron durante 18 h a 37 °C y agitación horizontal a 150 rpm.
 - se prepararon muestras de blanco añadiendo 360 µl de tampón en lugar de las enzimas.
 - se tomaron muestras de 1,5 ml para el análisis directamente después de la adición de las enzimas y se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior análisis.
- 5 - después de 18 h de incubación, las muestras se centrifugaron (4000 rpm, 4 °C, 15 min) y los sobrenadantes se analizaron para determinar su contenido en β-glucanos.

1.4 Análisis de los beta-glucanos

El análisis de los beta-glucanos se realizó con el kit Yeast beta Glucan Kit K-EBHLG de Megazyme, pero se usó una cuarta parte del volumen descrito en las instrucciones. El análisis se basa en la digestión enzimática específica de (1-3)(1-6)-beta-glucanos a glucosa. Los controles realizados sin digestión enzimática de los glucanos proporcionan las concentraciones de fondo de glucosa, que deben restarse de las muestras.

Digestión enzimática de los beta-glucanos

Se añadieron 200 µl de Na-acetato 1,2 M a una muestra de 50 µl que había sido pipeteada en un tubo Eppendorf. Las muestras se trataron con 5 µl de Gluczyme™, una mezcla de enzimas que contiene beta-glucanasa, beta-glucosidasa y quitinasa, se agitó con una espátula de plástico y después se mantuvo durante 16 h a 40 °C en un incubador. En los controles no se añadió Gluczyme™, añadiéndose en su lugar 5 µl de agua destilada.

Análisis de los monómeros de glucosa derivados de los beta-glucanos

Se añadieron 25 µl de las muestras de digestión y de los controles a 1000 µl de reactivo GOPOD (que contiene tampón ajustado a pH 7,4, glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-aminoantipirina ácido p-hidroxibenzoico) previamente ajustado a 40 °C en un baño de agua en una cubeta de fotómetro (cubetas desechables Rotilabo®, poliestirol). Las cubetas se incubaron a 40 °C durante 30 minutos y se determinó la densidad óptica a 510 nm frente al aire en el paso de luz.

1.5 Unión de zearalenona

Se preparó una disolución madre de la micotoxina zearalenona (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) a 1 mg/ml en acetonitrilo. Las diluciones de trabajo se volvieron a diluir en acetonitrilo hasta una concentración de 1,04 ppm (partes por millón).

Las muestras de reacción se prepararon como sigue:

200 µl de disolución de levadura tratada con enzimas

64,6 µl de disolución madre de trabajo de zearalenona (concentración final 33,6 ppb (partes por billón)) hasta 2000 µl de dH₂O

Las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C con agitación horizontal (150 rpm). Tras la incubación, las muestras se centrifugaron (15 min, 5000 x g, temperatura ambiente) y se usó el sobrenadante para el análisis como se describe en la siguiente sección.

1.6 Determinación de las concentraciones de micotoxinas

Para la determinación de las concentraciones de micotoxinas se emplearon kits comerciales (RIDASCREEN® Zearalenon (artículo R1401), R-Biopharm AG, Darmstadt, Alemania) con ligeras modificaciones como se describe a continuación.

Se mezclaron 150 µl de sobrenadante con 350 µl de metanol para lograr una mezcla de metanol:agua de 70:30. Después las muestras se analizaron según las instrucciones del fabricante como sigue: El sobrenadante metanólico se diluyó 1:7 (1+6) con tampón de dilución de muestras (tampón 1, 100 µl de sobrenadante + 600 µl de tampón 1)

Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente (20-25 °C) antes del uso. El conjugado de enzima-zearalenona se proporciona como un concentrado. Puesto que el conjugado de enzima diluido tiene una estabilidad limitada solo debería reconstituirse la cantidad que realmente es necesaria. Antes de pipetear, el conjugado de enzima debe agitarse cuidadosamente. Para la reconstitución, el concentrado se diluye 1:11 (1+10) en tampón 1, por ejemplo, 200 µl de concentrado + 2,0 ml de tampón, suficiente para 4 tiras de microtitulación).

El procedimiento de lavado recomendado debe seguirse cuidadosamente y no se debe dejar que los micropocillos se sequen entre las etapas de trabajo.

1. Se inserta el número suficiente de pocillos de microtitulación en el soporte de micropocillos para que todos los

patrones y las muestras puedan ensayarse por duplicado.

2. Se añaden 50 µl de las disoluciones patrón o de la muestra preparada a pocillos por duplicado distintos.

3. Se añaden 50 µl del conjugado de enzima diluido a cada pocillo y se mezcla con cuidado agitando la placa a mano. La placa se incuba durante 2 h a temperatura ambiente (20-25 °C) en la oscuridad.

5 4. El líquido se vierte de los pocillos y el soporte de micropocillos se golpea con fuerza boca abajo (tres veces seguidas) contra un papel absorbente para asegurarse de la eliminación completa del líquido de los pocillos. Todos los pocillos se rellenan con 250 µl de agua destilada y el líquido se vuelve a verter. Este preferiblemente de lavado se repite dos veces.

10 5. Se añaden 50 µl de sustrato y 50 µl de cromógeno a cada pocillo. La placa después se mezcla a mano mediante agitación y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente (20-25 °C) en la oscuridad.

6. Se añaden 100 µl de la disolución de detención a cada pocillo. La placa después se mezcla a mano mediante agitación y se mide la absorbancia a 450 nm dentro de 30 minutos después de la adición de la disolución de detención.

15 Se determinan las concentraciones de zearalenona mediante una comparación con los patrones suministrados en el kit.

1.7 Resultados

20 Solo las enzimas Glu4 y Glu5 produjeron sobrenadantes que contenían β-glucano a partir de las células de levadura, y redujeron la cantidad de zearalenona hasta 54,9% y 60,1% (tabla 2) de las células de levadura no tratadas, tal como se muestra en la figura 4 y la figura 5. Por tanto, claramente presentan un potencial para liberar los β-glucanos con efectos de unión a micotoxinas de las células de levadura en DDGS y, con ello, generan unos con potencial de unión a micotoxinas.

Tabla 2

Enzima	% del blanco
Glu4	54,9%
Glu5	60,1%
sin enzima	100%

Ejemplo 2 (no según la invención)

25 Los granos de destilería desecados (DDGS), como un subproducto de un proceso de fermentación de etanol que contienen gran cantidad de células de levadura residuales procedentes del proceso de fermentación de etanol, deben ensayarse para su capacidad para unirse a micotoxinas. Como las paredes celulares de las levaduras contienen principalmente β-1,3-glucanos, los DDGS deben ensayarse contra otros productos de levaduras y β-glucanos puros para determinar sus capacidades de unión a micotoxinas.

30 2.1 Fermentación del maíz para producir etanol

En una realización, el proceso de producción de etanol a partir del maíz se llevó a cabo como sigue:

a) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón mediante molienda:

- el maíz se muele hasta < 2 mm de tamaño de partícula.

b) formar una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua:

35 - Se lavaron con agua de grifo 10 kg de maíz a 35 °C para obtener una disolución con aproximadamente 31,25% de sólidos, con un volumen total de 30 litros.

- el intervalo de pH fue de 5,6-6,0.

c) licuar el material que contiene almidón:

- la temperatura aumenta hasta 90 °C.

40 - se añaden 7 ml de alfa-amilasa (Novozymes Liquozyme SC).

- se añade antiespumante al 1‰ (30 ml).
- se incuba durante 90 min a 90 °C y 150 rpm.
- la suspensión se enfría hasta 30 °C, y el pH se ajusta a aproximadamente 4 con NH₂SO₄ 1.

d) sacarificar el material licuado obtenido:

- 5 - se añaden 12 ml de glucoamilasa (Novozymes Spirizyme Ultra).

e) fermentación:

- propagación de las levaduras: se incuban 200 ml de medio YNB-almidón durante la noche (30 °C, 150 rpm), se inoculan con 2 g de levaduras (SIHA Amyloferm), y el precultivo completo se añade a la fermentación.

- se añaden 300 ppm de ((NH₄)₂SO₄) (10 g) como fuente de nitrógeno.

- 10 - se añaden las levaduras.

- el pH se titula hasta 4,0 con una disolución de amoniaco (al 25%), que suministra más nitrógeno.

- se incuba durante un máximo de 48 h a 30 °C y 100 rpm.

- se toman muestras de 2 ml cada 12 h para controlar el avance de la fermentación (concentración de azúcar, concentraciones de etanol)

15 2.2 Unión de zearalenona

Se preparó una disolución madre de zearalenona (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemana) a 1 mg/ml en acetonitrilo. Las diluciones de trabajo se volvieron a diluir en acetonitrilo hasta una concentración de 1,04 ppm (partes por millón).

Las muestras de reacción se prepararon como sigue:

- 20 10 mg de DDGS o producto de levadura o β-glucano

64,6 μl de disolución madre de trabajo de zearalenona (concentración final de 33,6 ppb (partes por billón)

hasta 2000 μl de dH₂O

Las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C con agitación horizontal (150 rpm). Tras la incubación, las muestras se centrifugaron (15 min, 5000 x g, temperatura ambiente) y se usó el sobrenadante para el análisis como se describe en la siguiente sección.

- 25

2.3 Determinación de las concentraciones de micotoxinas

La determinación de la concentración de zearalenona se realizó como se describió anteriormente. Se determinan las concentraciones de zearalenona mediante una comparación con los patrones suministrados en el kit.

2.4 Resultados

- 30 La adición de diferentes β-glucanos (paquimano, β-glucano de levadura, β-glucano de cebada) no afectó a la concentración de zearalenona, como sí lo hicieron los controles negativos (1,4-β-D-manano, almidón). Incluso el β-glucano de levadura puro no tratado no afectó a la unión de la zearalenona. La adición de DDGS, paredes celulares de levadura y polvo de levadura redujo las concentraciones de zearalenona hasta 20%, 12% y 17%, respectivamente, tal como se muestra en la figura 6 y la tabla 3.

- 35 Tabla 3

Sustancia	Suministrador	Zearalenona residual - % del blanco
extracto de levadura	Ohly	112%
paredes celulares de levaduras	Ohly	12%
levadura seca inactiva	Ohly	17%
DDGS	Direvo	20%
CM-paquimano (β-1,3-glucano de <i>Poria cocos</i>)	Megazyme	111%
1,4- β-D-manano	Megazyme	117%

ES 2 709 102 T3

β-glucano de levadura	Megazyme	97%
β-glucano de cebada	Megazyme	86%
almidón	Megazyme	103%
sin zearalenona		0%
H2O - blanco		100%

Además, los resultados de la figura 7 muestran la capacidad positiva de unión a micotoxinas de diferentes productos de DDGS.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para mejorar la capacidad de unión a micotoxinas de un subproducto derivado de un proceso de producción fermentativo que emplea levadura como microorganismo fermentador, que comprende las etapas de: i) someter la pasta fermentada después de la fermentación a una composición de enzimas capaz de degradar uno o más componentes de la pasta fermentada, ii) separar el producto de fermentación principal deseado, iii) separar el subproducto de la fermentación que tiene capacidades de unión a micotoxinas, en el que dicha composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa y la pasta fermentada se deriva de un proceso de producción de alcohol fermentativo y el producto de fermentación principal deseado es el etanol.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el producto de fermentación principal deseado se separa mediante destilación.
- 3.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la pasta fermentada se deriva de un material que contiene almidón.
- 4.- El método según la reivindicación 3, en el que el material que contiene almidón se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, triticale, mandioca, sorgo, centeno, patata o cualquiera de sus combinaciones.
- 5.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el subproducto se selecciona del grupo que consiste en granos de destilería húmedos ("distillers' wet grain", DWG), granos de destilería desecados ("distillers' dried grains", DDG), productos solubles de destilería ("distillers' solubles", DS), productos solubles de destilería desecados ("distillers' dried solubles", DDS), granos de destilería desecados con productos solubles ("distillers' dried grain with solubles", DDGS), y sus mezclas.
- 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el subproducto comprende granos de destilería desecados con productos solubles (DDGS).
- 7.- Un método para producir un ligante de micotoxinas que comprende un subproducto de la fermentación surgido de un material que contiene almidón en un proceso de producción de etanol, comprendiendo dicho método las etapas de:
- i) convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables,
 - ii) fermentar los azúcares fermentables con una levadura para producir una pasta fermentada,
 - iii) someter la pasta fermentada después del proceso de fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa,
 - iv) separar el etanol en la pasta fermentada mediante destilación,
 - v) separar el subproducto.
- 8.- El método según la reivindicación 7, en el que el material que contiene almidón se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, triticale, mandioca, sorgo, centeno, patata o cualquiera de sus combinaciones.
- 9.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el subproducto se selecciona del grupo que consiste en granos de destilería húmedos ("distillers' wet grain", DWG), granos de destilería desecados ("distillers' dried grains", DDG), productos solubles de destilería ("distillers' solubles", DS), productos solubles de destilería desecados ("distillers' dried solubles", DDS), granos de destilería desecados con productos solubles ("distillers' dried grain with solubles", DDGS), y sus mezclas.
- 10.- El uso de una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa para mejorar la capacidad de unión a micotoxinas de un subproducto derivado de una pasta fermentada en un proceso de producción de etanol fermentativo que emplea levaduras como el microorganismo fermentador, en el que el subproducto se selecciona del grupo que consiste en granos de destilería húmedos ("distillers' wet grain", DWG), granos de destilería desecados ("distillers' dried grains", DDG), productos solubles de destilería ("distillers' solubles", DS), productos solubles de destilería desecados ("distillers' dried solubles", DDS), granos de destilería desecados con productos solubles ("distillers' dried grain with solubles", DDGS), y sus mezclas.

FIGURA 1

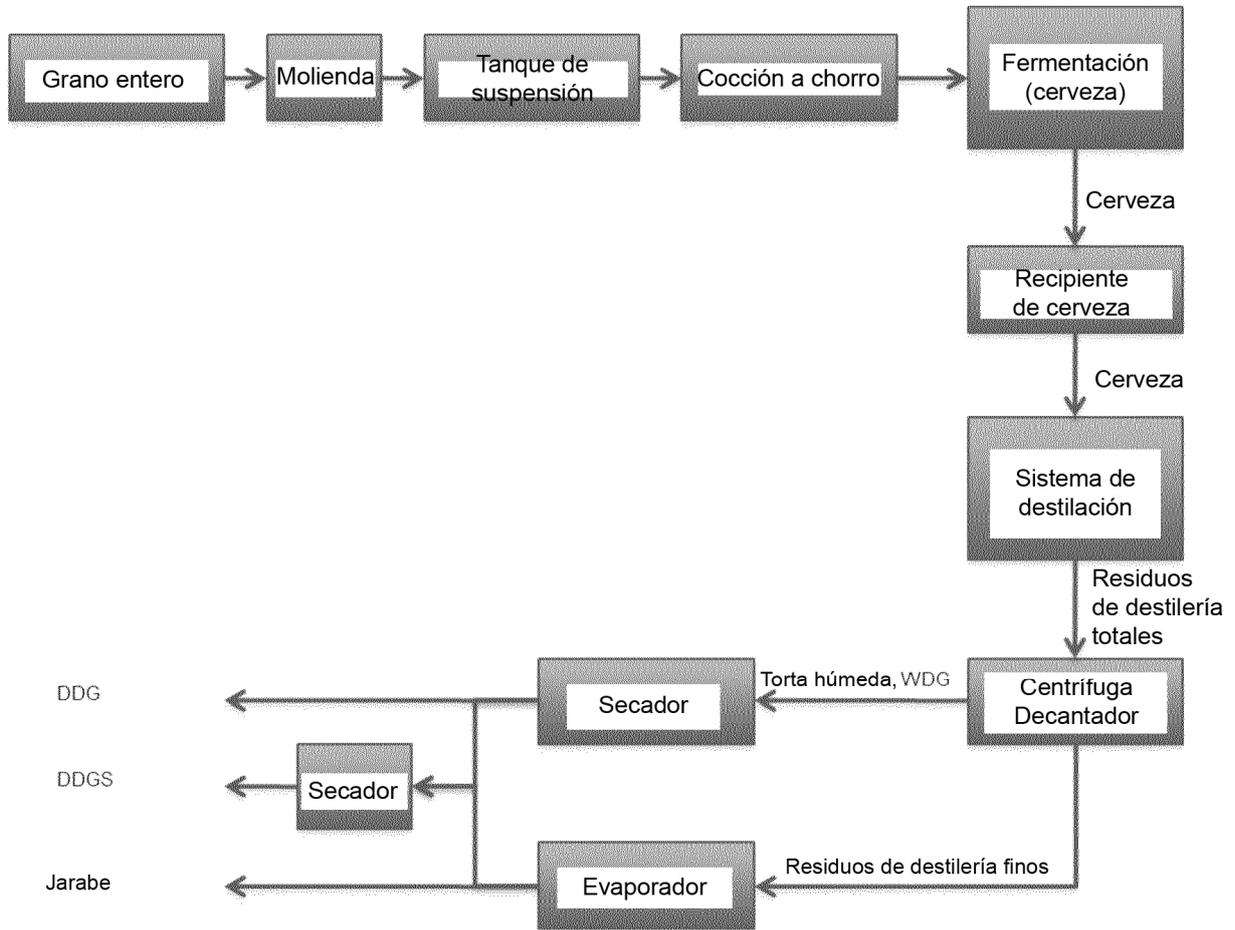


FIGURA 2

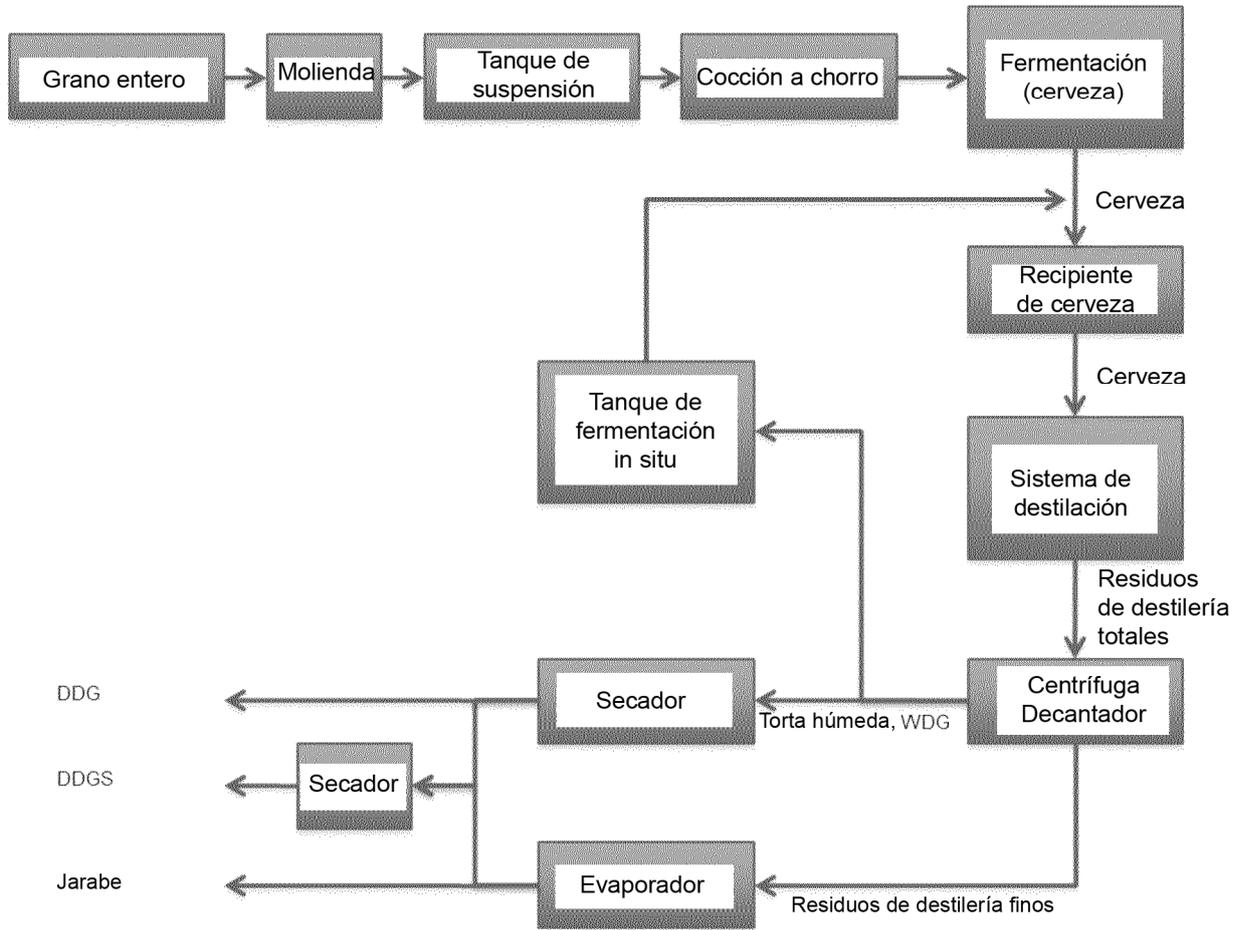


FIGURA 3

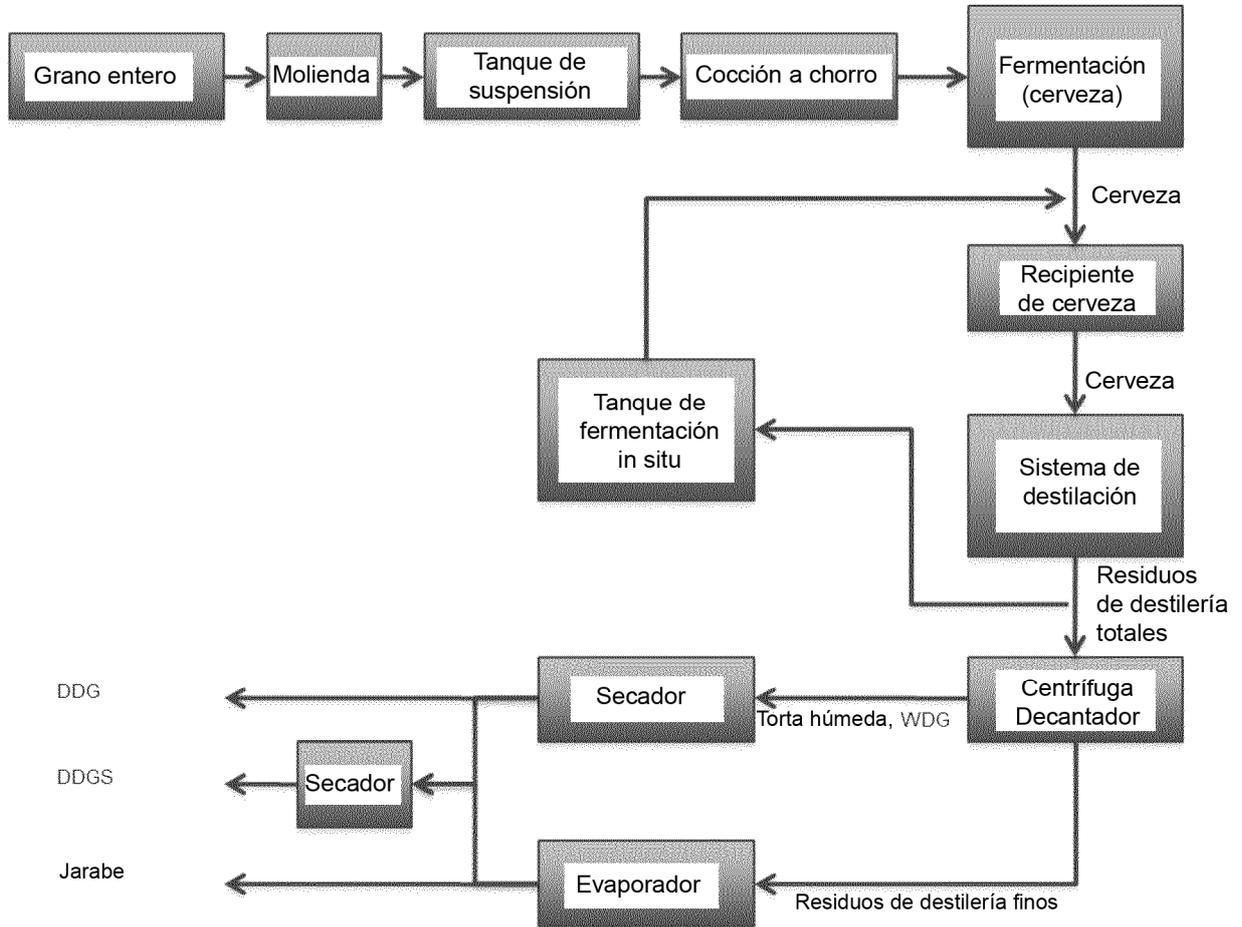


FIGURA 4

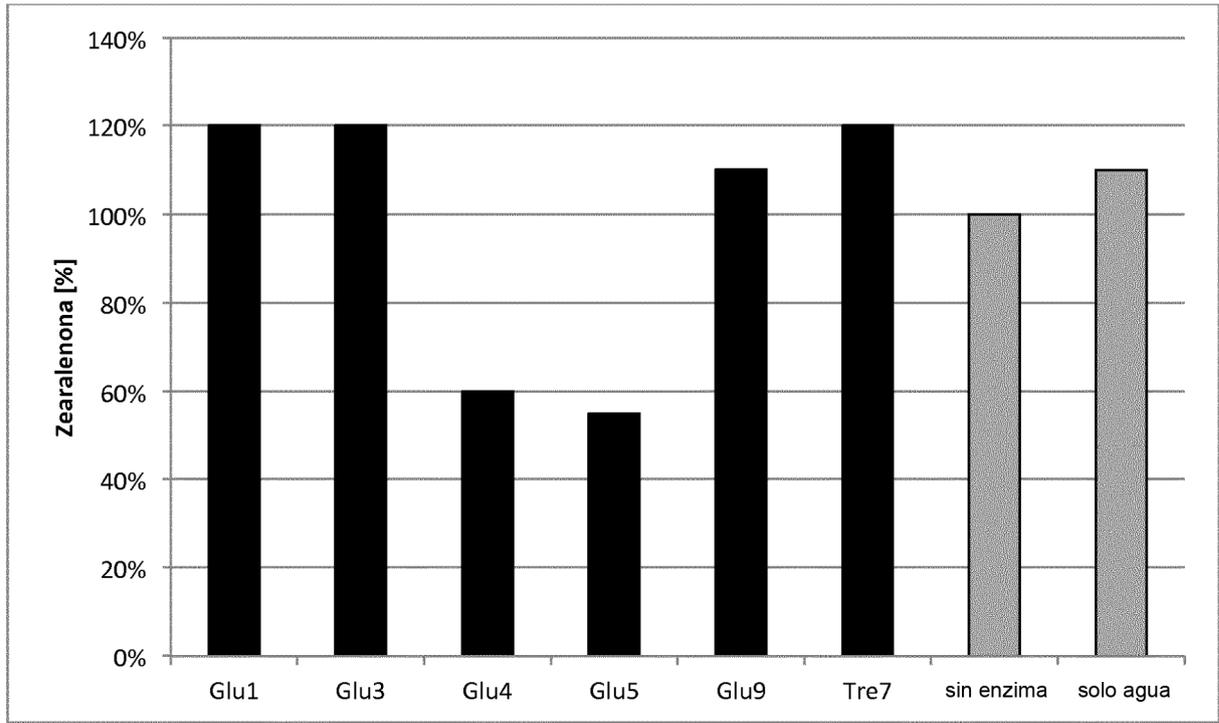


FIGURA 5

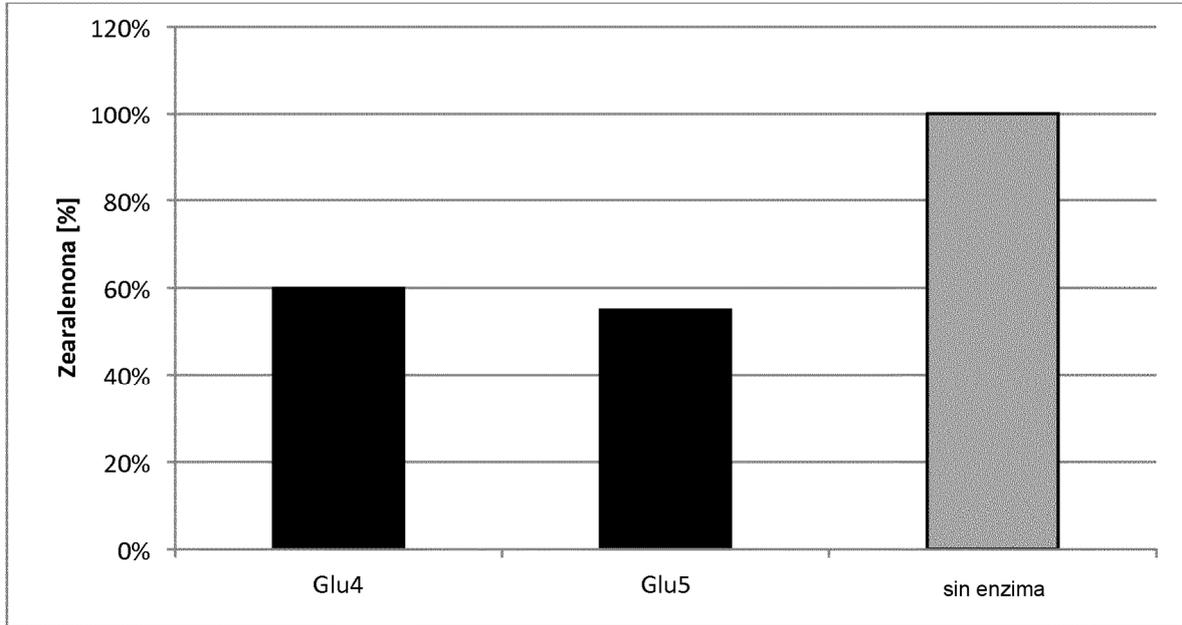


FIGURA 6

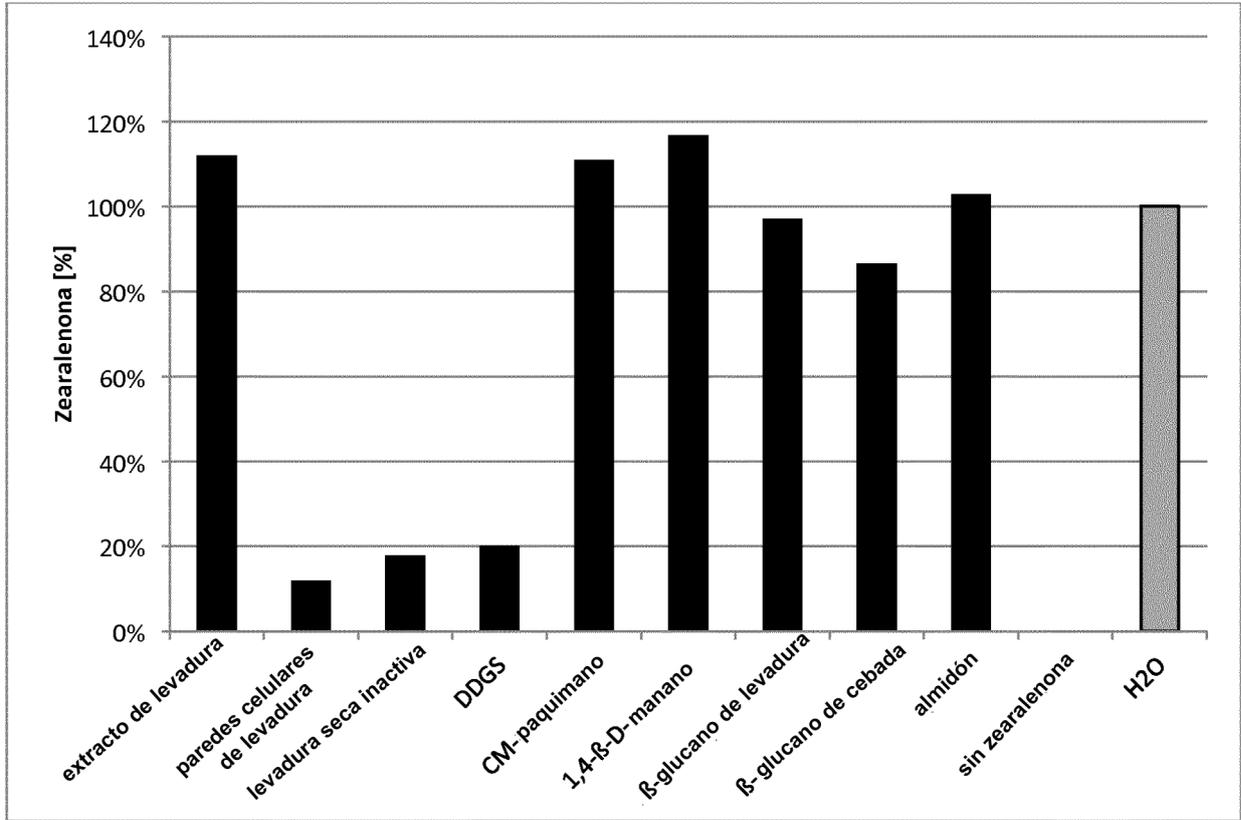


FIGURA 7

