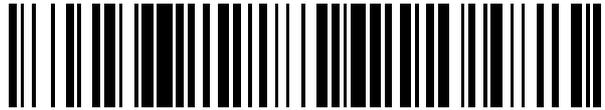


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 476**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06	(2006.01)
C02F 3/34	(2006.01)
C12F 3/10	(2006.01)
C12P 7/14	(2006.01)
A23K 10/38	(2006.01)
C12P 3/00	(2006.01)
C12P 7/10	(2006.01)
C12P 7/40	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2015 PCT/EP2015/064101**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020101**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2015 E 15733667 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3177727**

54 Título: **Métodos de deshidratación en procesos de fermentación**

30 Prioridad:

05.08.2014 EP 14179848
05.08.2014 US 201462033338 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KRÄMER, MARCO y
SVETLITCHNYI, VITALY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 709 476 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

Métodos de deshidratación en procesos de fermentación

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a un proceso mejorado para deshidratar la vinaza entera en procesos de fermentación.

Antecedentes de la invención

10 Los productos de fermentación, como el etanol, se producen degradando primero el material que contiene almidón en azúcares fermentables por licuefacción y sacarificación, y convirtiendo después los azúcares directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado utilizando un organismo de fermentación. Los productos de fermentación líquida como el etanol se recuperan de la masa fermentada (denominado con frecuencia "cerveza" o "masa de
15 cerveza"), por ejemplo, por destilación, que separa el producto de fermentación deseado de otros líquidos y/o sólidos. La fracción restante, conocida como "vinaza entera", se deshidrata y se separa en una fase sólida y una líquida, por ejemplo, por centrifugación. La fase sólida se denomina "torta húmeda" (o "granos húmedos" o "WDG") y la fase líquida (sobrenadante) se denomina "vinaza fina". La torta húmeda deshidratada se seca para proporcionar "granos secos de destilería" (DDG) utilizados como nutrientes en la alimentación animal. La vinaza fina se evapora típicamente para proporcionar el condensado y el jarabe (o "vinaza espesa") o, alternativamente, se pueden reciclar directamente al tanque de papilla como "backset". El condensado puede ser enviado a un metanador antes de ser descargado o puede ser reciclado al tanque de papilla. El jarabe, que consiste principalmente en dextrinas límite y azúcares no fermentables, puede mezclarse con DDG o agregarse a la torta húmeda antes de secar para producir DDGS (granos secos de destilería con solubles).
20

25 Las plantas de etanol se han esforzado para mantener la rentabilidad, que es altamente variable dependiendo del precio del maíz, la demanda y el precio de los DDGS, créditos fiscales, consumo de gasolina, exportaciones de etanol y cambios en los estándares de los combustibles renovables (RFS). Nuevas tecnologías para el ahorro de energía, mayor rendimiento de etanol y mayor valor para los coproductos, así como varias tecnologías de separación de aceite, contribuyen a la rentabilidad de la producción de etanol.

Los documentos WO2012/084225 y WO2007/056321 describen el tratamiento de la masa fermentada (cerveza) después de la fermentación con enzimas o composiciones enzimáticas para deshidratar la vinaza entera.

El documento WO2011/126897 describe el uso de una composición enzimática que comprende una hemicelulasa, una endoglucanasa y el polipéptido GH61 en un proceso de fermentación para deshidratar la vinaza entera.

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

35 La deshidratación de la vinaza entera requiere mucha energía y puede consumir hasta un tercio de las necesidades de energía de una planta productora de etanol o un producto de fermentación similar. Por tanto, existe la necesidad de mejorar los procesos que intervienen en la deshidratación de la vinaza entera.

Compendio de la descripción

40 La presente descripción se refiere a un método de deshidratación de las vinazas obtenidas de un proceso para la obtención de un producto de fermentación.

La presente descripción se refiere a métodos para deshidratar una vinaza entera en un proceso de fermentación, que comprende:

- (a) sacarificación de un material celulósico con una composición enzimática;
- 45 (b) fermentación del material celulósico sacarificado, con un organismo de fermentación para obtener un producto de fermentación en donde el medio de fermentación comprende una xilanasa y una pectinasa;
- (c) destilar el producto de fermentación para formar la vinaza entera; y
- (d) separar la vinaza entera en vinaza fina y torta húmeda, con lo que se transfiere más fase líquida a la vinaza fina, en donde el material celulósico es maíz y el producto de fermentación es etanol.

50 En un proceso para aumentar la deshidratación de la vinaza entera, la masa de grano entero licuada se puede diluir por tratamiento con una cantidad eficiente de actividad enzimática de una xilanasa en combinación con una pectinasa.

5 El proceso para la deshidratación de una vinaza entera en un proceso de fermentación puede comprender secuencialmente las siguientes etapas: a) moler el grano entero; b) licuar el grano entero molido gelatinizado, en presencia de una alfa-amilasa; c) sacarificar el material licuado en presencia de una glucoamilasa; d) fermentar con un microorganismo; e) destilar el material fermentado y sacarificado, proporcionando una fracción de etanol, en donde la masa licuada se somete a una cantidad efectiva de actividad enzimática de una xilanasas y una pectinasa durante la fermentación.

Breve descripción de los dibujos

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

Descripción de la invención

10 El objeto de la presente invención es proporcionar un método para la deshidratación de vinazas enteras. La adición al medio de fermentación de una xilanasas en combinación con una pectinasa da como resultado una torta húmeda con una masa más seca. La ventaja aquí es el menor consumo de energía en el secado.

La presente descripción se refiere a métodos para deshidratar una vinaza entera en un proceso de fermentación, que comprende:

- 15 (a) sacarificación de un material celulósico con una composición enzimática;
- (b) fermentación del material celulósico sacarificado con un organismo de fermentación para obtener un producto de fermentación, en donde el medio de fermentación comprende una xilanasas y una pectinasa;
- (c) destilación del producto de fermentación para formar la vinaza entera; y
- (d) separar la vinaza entera en vinaza fina y torta húmeda, con lo que se transfiere más fase líquida a la vinaza fina,
- 20 en donde el material celulósico es maíz y el producto de fermentación es etanol.

La vinaza o vinaza entera es el producto que queda después de que la masa se ha convertido en azúcar, fermentado y destilado en etanol. La vinaza se puede separar en dos fracciones, como por centrifugación o cribado: (1) bizcocho húmedo (fase sólida) y (2) la vinaza fina (sobrenadante). La fracción sólida o el grano húmedo de destilería (DWG) se puede prensar para eliminar el exceso de humedad y luego secar para producir granos secos de destilería (DDG). Después de que el etanol ha sido retirado de la fracción líquida, el líquido residual se puede evaporar para concentrar el material soluble en solubles de destilería condensados (DS) o secados y molidos para crear solubles secos de destilería (DDS). Los DDS a menudo se mezclan con DDG para formar grano seco de destilería con solubles (DDGS). DDG, DDGS y DWG se denominan colectivamente grano o granos de destilería.

25

Las enzimas xilanasas y pectinasa se añaden durante la fermentación. Las enzimas fueron capaces de degradar componentes en el medio de fermentación.

30

La frase "medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al entorno en el que se realiza la fermentación y comprende el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidratos que se metaboliza por el organismo u organismos de fermentación.

35 El medio de fermentación puede comprender otros nutrientes y estimuladores de crecimiento para el organismo de fermentación. Los nutrientes y estimuladores del crecimiento son ampliamente utilizados en la técnica de la fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, como el amoníaco, vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos. Después de la fermentación, se puede separar el producto de fermentación 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 mediante técnicas de microfiltración o de membrana. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por arrastre. Los métodos de recuperación son bien conocidos en la técnica.

40

La materia prima para producir etanol es el maíz.

La obtención de un producto de fermentación se divide típicamente en las siguientes etapas principales del proceso:

- 45 a) reducción del tamaño de partícula del material que contiene almidón, por ejemplo, mediante molienda en seco o húmedo;
- b) cocción del material que contiene almidón en una papilla acuosa para gelatinizar el almidón,
- c) licuación del material gelatinizado que contiene almidón para romper el almidón (por hidrólisis) en maltodextrinas (dextrinas);
- 50 d) sacarificación de las maltodextrinas (dextrinas) para producir azúcares de bajo peso molecular (por ejemplo, DP1-2) que pueden ser metabolizados por un organismo de fermentación;

e) fermentación del material sacarificado utilizando un organismo de fermentación adecuado que convierte directa o indirectamente los azúcares de bajo peso molecular en el producto de fermentación deseado;

f) recuperación del producto de fermentación, por ejemplo, por destilación, para separar el producto de fermentación de la masa de fermentación.

- 5 Como también se explica en la anterior sección "Antecedentes", la vinaza entera es un subproducto que consiste en líquidos y sólidos que quedan después de la recuperación (p. ej., por destilación) de un producto de fermentación deseado de la masa fermentada (mezcla de cerveza). Según la invención, el producto de fermentación.

La vinaza entera contemplada de acuerdo con la presente descripción es el producto secundario resultante de un proceso de preparación del producto de fermentación, que incluye los pasos a) a c) mencionados anteriormente.

- 10 La deshidratación de la vinaza entera con el fin de eliminar una porción significativa del líquido/agua, se puede hacer usando cualquier técnica de separación adecuada, incluyendo la centrifugación, el prensado y la filtración. La vinaza entera puede ser calentada a una temperatura de aproximadamente 20-60°C. El pH está en el intervalo de 3 a 7, preferiblemente pH de 3 a 6.

- 15 En una realización preferida, la deshidratación se lleva a cabo mediante centrifugación. Las centrifugadoras preferidas en la industria actual son centrifugas de tipo decantador, preferiblemente centrifugas de tipo decantador de alta velocidad. Un ejemplo de centrifuga adecuada es la serie cónica NX 400 de Alfa Laval, que es un decantador de alto rendimiento.

- 20 En otra realización preferida, la separación se lleva a cabo utilizando otro equipo de separación convencional, como las prensas de filtro de placa/marco, prensas de filtro de banda, prensas de tornillo, espesadores y cubiertas por gravedad, o equipos similares.

- 25 Después de que haberse deshidratado, la torta húmeda, que contiene aproximadamente 30-35% en peso de sólidos secos, se puede secar en un secador de tambor, secador de pulverización, secador de anillo, secador de lecho fluidificado, o similares, para producir "Granos Secos de Destilería" (DDG). DDG es un valioso ingrediente del alimento para ganado, aves y peces. Se prefiere proporcionar al DDG un contenido de menos de aproximadamente 10-12% en peso de humedad para evitar la descomposición por mohos y microbios, y aumentar la vida útil. Además, un alto contenido de humedad hace que sea más caro transportar DDG. La torta húmeda se seca preferiblemente en condiciones en las que no se desnaturalizan las proteínas de la torta húmeda. La torta húmeda se puede mezclar con un jarabe separado de la fracción de vinaza fina, y secarse en DDG con solubles (DDGS).

El maíz es la materia prima y el producto de fermentación es el etanol.

- 30 Como se mencionó anteriormente, la cerveza (o la masa fermentada) comprende el producto de fermentación etanol.

- 35 El organismo de fermentación puede ser un organismo fúngico, tal como la levadura, o bacteriano. 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 *Penicillium*. Los organismos preferidos para la producción de etanol son levaduras, tales como, por ejemplo, *Pichia* o *Saccharomyces*. Levaduras preferidas de acuerdo con la descripción, son especies de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería.

Además, añadiendo las enzimas al medio de fermentación antes de la etapa de destilación se obtiene una ventaja ya que las enzimas en las composiciones enzimáticas se inactivan durante la destilación.

- 40 Los procesos para producir etanol a partir del maíz comienzan generalmente con la molienda del maíz en un proceso de molienda seca o de molienda húmeda. Los procesos de molienda húmeda implican fraccionar el maíz en diferentes componentes donde solo la fracción de almidón entra en el proceso de fermentación. Los procesos de molienda en seco implican moler los granos de maíz en harina y mezclar la harina con agua y enzimas. En general, se utilizan dos tipos diferentes de procesos de molienda en seco. El proceso más utilizado, denominado frecuentemente "proceso convencional", incluye moler el material que contiene almidón y luego licuar el almidón gelatinizado a una temperatura elevada usando típicamente una alfa-amilasa bacteriana, seguido de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) realizadas en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación. Otro proceso bien conocido, a menudo denominado proceso de "hidrólisis de almidón crudo" (proceso RSH), incluye la molienda del material que contiene almidón, y luego simultáneamente la sacarificación y la fermentación del almidón granular por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, típicamente en presencia de una alfa-amilasa ácida fúngica y una glucoamilasa.

- 50 En un proceso para producir etanol a partir del maíz, después del proceso SSF o RSH, el etanol se destila de la vinaza entera después de la fermentación. La papilla libre de etanol resultante, generalmente conocida como vinaza entera, se separa en fracciones sólida y líquida (es decir, torta húmeda y vinaza fina que contiene aproximadamente 35 y 7% de sólidos, respectivamente). La vinaza fina se condensa a menudo por evaporación dando una vinaza o jarabe espesos, se recombina con la torta húmeda y se sigue secando en granos secos de destilería con grano seco de destilería solubles, con solubles (DDGS) para uso en alimentación animal. En el método que se reivindica, no se utilizan SSF y RSH.

55

5 La xilanasa puede ser preferiblemente de origen microbiano, tal como de origen fúngico (por ejemplo, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Meripilus*, y *Trichoderma*) o de una bacteria (por ejemplo, *Bacillus*). En una realización preferida, la xilanasa se deriva de un hongo filamentoso, preferiblemente derivado de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus*; o una cepa de *Humicola*, preferiblemente *humicola lanuginosa*. Los ejemplos de xilanasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, xilanasa de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP:AAR63790; WO 94/21785), xilanasas de *Aspergillus fumigatus* (documento WO 2006/078256), y xilanasas de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (documento WO 2009/079210). La xilanasa puede ser preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa, más preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa de GH 10 o GH 11. Los ejemplos de xilanasas comerciales incluyen SHEARZYME™, BIOFEED WHEAT™, HTec y HTec2 de Novozymes A/S, Dinamarca.

10 Los ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* (UniProtKB/TrEMBL número de registro Q92458), *Talaromyces emersonii* (número de registro Swiss Prot Q8X212) y *Neurospora crassa* (número de registro SwissProt Q7SOW4).

Los ejemplos de xilanasas bacterianas adecuadas incluyen xilanasas derivadas de una cepa de *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis*, como la descrita en la patente de EE.UU. 5.306.633.

15 Las xilanasas contempladas disponibles comercialmente incluyen SHEARZYME™, BIOFEED WHEAT™ (de Novozymes AJS), Econase CE™ (de AB Enzymes), Depol 676™ (de Biocatalysts Ltd.) y SPEZYME (TM) CP (de Genencor Int.).

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

20 Determinación de la actividad de la xilanasa (FXU)

La actividad de la endoxilanasa se determina mediante un ensayo en el que la muestra de xilanasa se incuba con un sustrato de remazolxilano (4-O-metil-D-glucurono-D-xilano teñido con Remazol Brilliant Blue R, Fluka), pH 6,0. La incubación se lleva a cabo a 50°C durante 30 min. El fondo del sustrato teñido no degradado se precipita con etanol. El restante color azul en el sobrenadante se determina espectrofotométricamente a 585 nm y es proporcional a la actividad de endoxilanasa. La actividad de endoxilanasa de la muestra se determina en relación con un estándar enzimático.

25

La pectinasa usada en los métodos de acuerdo con 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, como una pectinasa derivada de una especie dentro de los géneros *Trichoderma* o *Aspergillus*, en particular de una cepa dentro de las especies *A. niger* y *A. aculeatus*. Las pectinasas contempladas comercialmente incluyen Pectinex Ultra-SPL™ (de Novozymes), Pectinex Ultra Color (de Novozymes), Rohapect Classic (de AB Enzymes) y Rohapect 10L (de AB Enzymes). Se puede añadir pectinasa en una cantidad efectiva en el intervalo de $1,4 \times 10^9$ a 23.500×10^9 Unidades por tonelada de medio de fermentación.

30

35 Determinación de la unidad de pectintranseliminasa (PECTU)

El método se basa en la degradación enzimática de una solución de pectina por una reacción con transeliminasa, los dobles enlaces formados producen un aumento de la absorción a 238 nm, que es seguido por un espectrofotómetro.

Condiciones de reacción

Temperatura: 30°C ± 0,5°C.

40 pH: 3,50 ± 0,02

Sustrato: Pectina al 0,24% (Obipektin, Brown Ribbon Pure, Art. No. 1.1B00.A. Lote No. 0304)

Concentración de enzima: 1,9-2,3 PECTU/mL

Tiempo de reacción: 6 minutos

Tiempo de medida: 5 minutos

45 Longitud de onda: 238 nm

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

El término "alfa-amilasa" significa una alfa-1,4-glucano-4-glucanohidrolasa (EC 3.2.1.1) que cataliza la hidrólisis del almidón y otros oligo- y poli-sacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados.

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

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

- 5 Las etapas de sacarificación y fermentación se llevan a cabo secuencialmente. La xilanasa y la pectinasa se añaden durante la fermentación.

10 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. Begeerow GmbH & Co, Langenlonsheim, Alemania) ya que su actividad de exo-amilasa puede dividir el almidón líquido y también dextrina, maltosa y melibiosa.

15 En la etapa de licuefacción, el almidón gelatinizado (masa aguas abajo) se rompe (se hidroliza) en maltodextrinas (dextrinas). Para lograr la hidrólisis del almidón, se añade una enzima adecuada, preferiblemente una alfa-amilasa. La licuefacción puede ser realizada como un proceso de papilla caliente de tres etapas. La suspensión se calienta a una temperatura entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se puede añadir alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (adelgazamiento). Luego, la suspensión se puede cocer en *jet* a una temperatura entre 95 y 140°C, preferiblemente 105-125°C, durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. La papilla se enfría a 60-95°C y se puede añadir más alfa-amilasa para completar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se lleva a cabo generalmente 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 de proceso separadas. La sacarificación se realiza en presencia de una enzima sacarificadora, por ejemplo una glucoamilasa, una beta-amilasa o amilasa maltogénica. Opcionalmente se agrega una fitasa y/o una proteasa.

25 La sacarificación se puede llevar a cabo usando condiciones bien conocidas en la técnica, con una enzima sacarificadora, por ejemplo, beta-amilasa, glucoamilasa o amilasa maltogénica, y opcionalmente una enzima desramificadora, como una isoamilasa o una pullulanasa. Por ejemplo, un proceso completo de sacarificación puede durar de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas.

La sacarificación se realiza típicamente a una temperatura de 20-75°C, preferiblemente de 40-70°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4,5.

- 30 Durante la fermentación, el medio de fermentación es sometido a una composición enzimática de acuerdo con la presente descripción. La composición enzimática comprende una xilanasa y una pectinasa.

El proceso de la presente descripción puede comprender 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 papilla que comprende el material que contiene almidón, y agua.

- 35 La suspensión acuosa puede contener desde 10 a 55% p/p de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45% p/p de sólidos secos (DS), más preferiblemente 30-40% p/p de sólidos secos (DS) del material que contiene almidón. La suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y se puede añadir una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana y/o ácida fúngica, para iniciar la licuefacción (adelgazamiento). La papilla se puede cocer en *jet* para gelatinizar aún más la suspensión antes de someterla a una alfa-amilasa en el paso (a).

- 40 El material que contiene almidón es maíz que se puede moler y los métodos comprenden una etapa de molienda del maíz antes de la etapa (a). En otras palabras, la descripción también abarca métodos en los que el material que contiene almidón puede obtenerse por un proceso que comprende molienda del maíz, preferiblemente molienda en seco, por ejemplo mediante molinos de martillo o de rodillo.

45 La molienda también se entiende como trituración, como lo es cualquier proceso adecuado para abrir los granos individuales y exponer el endospermo para su posterior procesamiento. Dos procesos de molienda se utilizan normalmente en la producción de alcohol: molienda húmeda y seca. La expresión "molienda en seco" denota la molienda del grano entero. En la molienda en seco todo el grano se muele y se utiliza en la parte restante del proceso de formación de masa. La masa se puede proporcionar formando una papilla que comprende el material molido que contiene almidón y agua de elaboración. El agua de preparación puede calentarse a una temperatura adecuada antes de ser combinada con el material que contiene almidón molido para conseguir una temperatura de la masa de 45 a 70°C, preferiblemente de 53 a 66°C, más preferiblemente de 55 a 60°C. La masa se forma típicamente en un tanque conocido como tanque de papilla.

50 Después de la fermentación, el etanol del producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. La papilla se puede destilar para extraer el etanol del medio de fermentación mediante técnicas de microfiltración o de

membrana. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por arrastre. Los métodos para recuperar los productos de fermentación son bien conocidos en la técnica. Típicamente, se obtiene etanol con una pureza de hasta, por ejemplo, aproximadamente 96% vol. de etanol.

5 Después de la finalización del proceso de fermentación, el material restante se considera la vinaza entera. Tal como se usa en el presente documento, el término "vinaza entera" incluye el material que queda al final del proceso de fermentación después de la recuperación del etanol. El producto de fermentación se puede recuperar opcionalmente por cualquier método conocido en la técnica. La vinaza entera se separa o se reparte en una fase sólida y una fase líquida mediante uno o más métodos para separar la vinaza fina de la torta húmeda. Tales métodos incluyen, por ejemplo, centrifugación y decantación. El producto de fermentación puede ser recuperado antes de separar la vinaza entera en una fase sólida y una fase líquida.

Así pues, los métodos de la descripción comprenden la destilación para obtener el etanol como producto de fermentación. La fermentación y la destilación se llevan a cabo secuencialmente, seguidas opcionalmente de una o más etapas de proceso para continuar la refinación del producto de fermentación.

15 El subproducto acuoso (vinaza entera) del proceso de destilación se separa en dos fracciones, por ejemplo, por centrifugación: grano húmedo (fase sólida) y vinaza fina (sobrenadante). Los métodos de la descripción comprenden además la separación de la vinaza entera producida por destilación, en grano húmedo y vinaza fina; y puede comprender reciclar la vinaza fina al material que contiene almidón antes de la licuación. La vinaza fina puede ser reciclada a la papilla de grano entero molido. La fracción de grano húmedo se puede secar, típicamente en un secador de tambor. El producto seco se conoce como granos secos de destilería, y se pueden utilizar como se mencionó anteriormente como pienso de alta calidad para animales. La fracción de vinaza fina puede evaporarse proporcionando dos fracciones (véase la Fig. 1 (i) una fracción de condensado de 4-6% de DS (principalmente de almidón, proteínas, aceite y componentes de la pared celular), y (ii) una fracción de jarabe, que consiste principalmente en dextrinas límite y azúcares no fermentables, que puede ser introducida en un secador junto con los granos húmedos (desde la etapa de separación de la vinaza entera) para proporcionar un producto denominado grano seco de destilería con solubles, que también se pueden utilizar como pienso para animales. Vinaza fina es el término usado para el sobrenadante de la centrifugación de la vinaza entera. Típicamente, la vinaza fina contiene 4-6% de DS (principalmente almidón y proteínas) y tiene una temperatura de alrededor de 60-90°C. En otra realización, la vinaza fina no se recicla, pero la corriente de condensado de la vinaza fina evaporada se recicla a la papilla que contiene el grano entero molido para ser cocido en *jet*.

30 Los expertos en la técnica conocen más detalles sobre cómo llevar a cabo la licuefacción, la sacarificación, la fermentación, la destilación y la recuperación del etanol.

Los métodos para deshidratar las vinazas de un producto de fermentación son conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen decantar o separar de cualquier otra forma la vinaza entera en torta húmeda y vinaza fina. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n° 6.433.146, 7.601.858 y 7.608.729, y la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos n° 2010/0058649.

40 El etanol del producto de fermentación puede ser recuperado opcionalmente del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero sin limitarse a ellos, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material celulósico fermentado y se purifica por métodos de destilación convencionales mencionados anteriormente. Se puede obtener etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 % en volumen que, por ejemplo, puede ser utilizado como etanol para combustible, etanol para bebidas, es decir licores neutros potables, o etanol industrial.

La presente invención se describe con más detalle mediante los ejemplos que siguen.

Ejemplos

Deshidratación de la vinaza entera

45 En la especificación, una mejor capacidad de deshidratación de la vinaza entera da como resultado una torta húmeda con una masa más seca. La ventaja aquí es un menor consumo de energía durante el secado.

Para ese ejemplo, se probó y se determinó la capacidad de deshidratación de la vinaza entera durante la centrifugación.

Se probaron cuatro configuraciones diferentes.

50 En el primer fermentador (Fermentador #1), el cultivo de fermentación no se trató con enzimas (0 g/t de xilanasa; 0 g/t de pectinasa), en los fermentadores segundo, tercero y cuarto (Fermentador n° 2 a n° 4) el cultivo de fermentación se trató con la composición enzimática que comprende una xilanasa y una pectinasa desde el inicio de la fermentación en diferentes concentraciones (de 25 g/t a 200 g/t de xilanasa y de 25 g/t a 200 g/t de pectinasa).

ES 2 709 476 T3

Los ensayos se realizaron en una escala de fermentación de 2 L. Después de la destilación, se tomaron muestras de los fermentadores con la vinaza entera y la vinaza entera se centrifugó para obtener una vinaza fina y la torta húmeda. La deshidratación [%] se calculó a partir de la masa de vinaza fina [mg] dividida por la masa de vinaza entera [mg] multiplicada por 100.

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

A) Proceso para la obtención de productos de fermentación

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

- el maíz (Compañía Pannonia, Hungría) se molió a un tamaño de partícula de < 2 mm (molino de café, compañía Brunn)

10 b) Formación de una papilla que comprende el material que contiene almidón, y agua

- Se añadieron 1,5 kg de maíz molido a 4,96 L mL de agua caliente de planta (dureza del agua 3,57 mmol/L) a 35°C para obtener una solución sólida de 25% con un volumen final de 6 L en un fermentador Biostat C (compañía Sartorius), lo que lleva a un pH de aproximadamente 5,6.

c) Licuefacción del material que contiene almidón

15 - la temperatura se aumentó a 90°C

- 1 mL de α -amilasa " α -amilasa VF-Kartoffel" (Schliessmann, Nr. 5049) se diluyó en 10 mL de agua de planta y luego se añadió a la papilla la amilasa diluida.

- la temperatura se aumentó a 90°C

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

20 - la papilla se enfrió a 30°C, el pH se ajustó a ~4 con H₂SO₄ al 30%

d) Sacarificación del material licuado obtenido

- Se diluyeron 1,5 mL de glucoamilasa "Amylase GA 500" (Schliessmann, Nr. 5042) en 10 mL de agua de planta estéril y luego se añadió a la papilla la glucoamilasa diluida, que es el material licuado sacarificado.

e) Fermentación

25 - se añadieron 1,8 g de (NH₄)₂SO₄ (es decir, 300 ppm de sulfato amónico) a los 6 L de material licuado sacarificado.

- se agitó el material licuado sacarificado que contenía 300 ppm de sulfato amónico en el fermentador Biostat C, a 800 rpm durante 5 minutos para distribuir todo de manera uniforme.

30 - el material licuado sacarificado que contenía 300 ppm de sulfato amónico (masa) se distribuyó en porciones individuales de 1500 g en cuatro fermentadores Biostat B 2L (compañía Sartorius) que contienen un mezclador de herradura.

- Preparación del *stock* de enzimas: 2,5 g de la pectinasa (Pec3) con 90349 U/mL y 2,5 g de la xilanasa (Xyl16) con 10027 U/mL se añadieron a una probeta graduada de 50 mL, y se llenó hasta 50 mL con agua de planta.

El *stock* de enzima se pasó a un tubo de 50 mL y luego se almacenó a 4°C hasta su uso al cabo de una hora.

35 - Los siguientes volúmenes de la preparación de *stock* de enzimas se agregaron al fermentador de 2L Biostat B que contenía 1500 g del material licuado sacarificado que contiene 300 ppm de sulfato amónico.

Fermentador #1: 0 mL de la preparación de *stock* enzimático que conduce a 0 g/t de pectinasa y 0 g/t de xilanasa

Fermentador #2: 0,75 mL de la preparación enzimática que conduce a 25 g/t de pectinasa y 25 g/t de xilanasa

Fermentador #3: 2,25 mL de la preparación enzimática que conduce a 75 g/t de pectinasa y 75 g/t de xilanasa

Fermentador #4: 6,00 mL de la preparación enzimática que conduce a 200 g/t de pectinasa y 200 g/t de xilanasa

40 - Propagación de la levadura: 300 mL de medio YNB (base nitrogenada de levadura) autoclavado, más glucosa con medio de glucosa 10 g/L que resulta en un pH 5,7 en frascos de cultivo de 1 L, que habían sido inoculados con 2 mL de levadura (Etanol RED, compañía Fermentis) a partir de una crio-reserva a -80°C que contenía glicerol al 20%, se incubaron durante 23 horas (30°C, 150 rpm) llevando al cultivo de levadura.

- Cada uno de los cuatro fermentadores (Fermentador #1 a #4) se inoculó mediante 60 mL del cultivo de levadura.

ES 2 709 476 T3

- El cultivo de los fermentadores se llevó 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 con una pipeta recortada para controlar el progreso de la fermentación (concentración de etanol). Las muestras se pasaron a tubos de 15 mL y se centrifugaron a 4470 g durante 10 minutos a 4°C, y se almacenaron a -20°C hasta más análisis.

5 f) Finalización del proceso de fermentación y destilación del etanol

- Para finalizar el proceso de fermentación y destilar el etanol, los cuatro fermentadores se incubaron a 80°C durante 20 min y se agitaron a 150 rpm.

g) Toma de muestras para análisis de deshidratación

10 - Después de 20 minutos a 80°C y agitando a 150 rpm, se tomaron 3 x 40 a 45 mL de muestra de cada fermentador con una pipeta de 50 mL y se llenaron en tubos de 50 mL (muestras de vinaza entera).

B) Determinación de la actividad del producto enzimático:

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

- se disolvieron 5,00 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) en 300 mL de H₂O destilada

- se añaden 50 mL de una solución de NaOH/KOH (KOH 4M + NaOH 4M) gota a gota

15 - se añaden 150 g de tartrato de K-Na tetrahidrato

- se enfría la solución a temperatura ambiente

- se añade H₂O destilada hasta 500 mL de volumen final

- se almacena en la oscuridad

a) *Pectinasa*

20 Sustratos: Ácido poligalacturónico (Sigma 81325)

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

Tampón: acetato sódico 50 mM, pH 4,5

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

30 Se transfirieron 100 µL de la mezcla de reacción a un pocillo de una placa de microtitulación de fondo plano transparente de 96 pocillos, y se midió la adsorción a 540 nm mediante un lector de placas de microtitulación (Tecan M1000).

b) *xilanasa*

Sustratos: Xilano de madera de abedul (Sigma X0502)

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

Tampón: acetato sódico 100 mM, pH 5,0, que contiene CaCl₂ 20 mM y 0,4 g/L de Tween20

40 Para el ensayo se utilizaron placas de microtitulación de PCR de 96 pocillos (compañía Greiner). Las enzimas se diluyeron en tampón. Se mezclaron 90 µL de sustrato y 10 µL de solución de enzima. Se midió un blanco reemplazando la solución de enzima con agua. La incubación se llevó a cabo durante 20 minutos a 40°C, seguido de una etapa de inactivación enzimática de 5 minutos a 99°C y seguido de enfriamiento durante 5 minutos a 4°C. Se añadieron 45,5 µL de la solución de DNSA a la placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos mediante un multi-gota (compañía Fisher-Scientific) y luego la placa se incubó a 98°C durante 10 minutos, se enfrió a 4°C y se incubó durante 5 minutos a 4°C.

ES 2 709 476 T3

Se transfirieron 100 µL de la mezcla de reacción a un pocillo de una nueva placa de microtitulación de fondo plano transparente de 96 pocillos, y luego se midió la absorción a 540 nm mediante un lector de placas de microtítulo (Tecan M1000).

- 5 La actividad se calcula como Unidades por µL o mg de producto enzimático. Se define 1 unidad como la cantidad de extremos reductores formados en µmoles por minuto. Las actividades enzimáticas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tipo	Actividad	Nombre abreviado
Pectinasa	90349 U/mL	<i>Pec3</i>
Xilanasa	10027 U/mL	<i>Xyl16</i>

Ejemplo 1

- 10 Después del proceso de fermentación y la destilación del etanol, se realizaron los siguientes pasos para analizar la deshidratación:

Determinación de la masa de la vinaza entera

1. Se transfirieron aproximadamente 40 mL de la vinaza entera, después de la destilación a 80°C, a un tubo Falcon de 50 mL (FT1) y se determinó la masa (masa FT1sample). La masa del FT1 vacío se determinó previamente (masa FT1empty). El FT1 con la muestra (FT1sample) se centrifugó a 800 g durante 10 minutos.

- 15 Determinación de la masa de la vinaza fina

2. El sobrenadante se decantó en un nuevo tubo Falcon (FT2) de 50 mL, lo que condujo a la vinaza fina, y se determinó la masa (masa FT2sample). La masa de FT2 se determinó previamente (masa FT2empty).

Cálculo de la masa de la muestra:

$$\text{Masa de la vinaza entera [mg]} = [\text{masa de FT1sample} - \text{masa de FT1empty}]$$

- 20 $\text{Masa de la vinaza fina (sobrenadante) [mg]} = [\text{masa de FT2sample} - \text{masa de FT2empty}]$

Cálculo de la deshidratación

$$\text{Deshidratación [\%]} = \text{Masa de vinaza fina [mg]} / \text{Masa de vinaza entera [mg]} * 100$$

Tabla 2

xilanasa añadida [g/t]	pectinasa añadida [g/t]	Deshidratación [%]	Relativa al control [0 g/t = 100%]
0	0	68,5	100,0%
25	25	70,9	103,5%
75	75	71,3	104,0%
200	200	71,7	104,6%

- 25 La Tabla 2 muestra la cantidad de vinaza fina (sobrenadante) en % de la vinaza entera eliminada después de la centrifugación a 800 rpm durante 10 minutos. Aquí se demostró que un tratamiento con la composición enzimática que comprende una xilanasa y una pectinasa hace aumentar la capacidad de deshidratación en un 3,5% usando 25 ppm de cada enzima, un 4,0% usando 75 ppm de cada enzima y un 4,6% usando 200 ppm de cada enzima.

REIVINDICACIONES

1. Un método para deshidratar una vinaza entera en un proceso de fermentación, que comprende:

(a) sacarificar un material celulósico con una composición enzimática;

5 (b) fermentar el material celulósico sacarificado con un organismo de fermentación para producir un producto de fermentación, en donde el medio de fermentación comprende una xilanasa y una pectinasa;

(c) destilar el producto de fermentación para formar la vinaza entera; y

(d) separar la vinaza entera en vinaza fina y torta húmeda, por lo que se transfiere más fase líquida a la vinaza fina, en donde el material celulósico es maíz y el producto de fermentación es etanol.

10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el organismo de fermentación es una bacteria, una levadura o un hongo.

FIGURA 1

