(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 709 491**

(51) Int. CI.:

C12P 7/14 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12F 3/10 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12C 7/053 (2006.01)
A23K 10/38 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A23K 50/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/EP2011/006473**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12084225**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11815437 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2655644**

(54) Título: **Mejora de procedimientos de fermentación y subproductos**

(30) Prioridad:

22.12.2010 US 201061425893 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:

MILOS, KLAUDIJA;
KÖHLER, STEFFEN;
ELEND, CHRISTIAN y
DEGENER, LÉONIE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Mejora de procedimientos de fermentación y subproductos

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a un procedimiento mejorado de producción de un producto de fermentación, en particular etanol. La presente descripción se refiere también al uso de enzimas para mejorar la calidad de subproductos en los procedimientos de producción fermentativos y a composiciones que comprenden enzimas capaces de degradar componentes en el mosto fermentado en el procedimiento de fermentación.

Antecedentes de la invención

Los productos de fermentación, tales como el etanol, se producen primero por degradación del material que contiene almidón en azúcares fermentables por licuefacción y sacarificación y después conversión de los azúcares directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado usando un organismo fermentador. Los productos de fermentación líquidos tales como el etanol se recuperan del mosto fermentado (denominado a menudo "macerado" o "mosto macerado"), p. ej., por destilación, que separa el producto de fermentación deseado de otros líquidos y/o sólidos. La fracción que queda, denominada "vinaza entera", se deshidrata y se separa en una fase sólida y una fase líquida, p. ej., por centrifugación. La fase sólida se denomina "torta húmeda" (o "granos húmedos" o "WDG") y la fase líquida (líquido sobrenadante) se denomina "vinaza fina". La torta húmeda deshidratada se seca para proporcionar los "granos secos de destilería" (DDG) usados como nutrientes en piensos animales. La vinaza fina típicamente se evapora para proporcionar el condensado y jarabe (o "vinaza densa") o alternativamente se puede recircular directamente al tanque de suspensión como "vinaza reciclada". El condensado se puede enviar a un metanizador antes de descargarlo o se puede recircular al tanque de suspensión. El jarabe que consiste principalmente en dextrinas límite y azúcares no fermentables, se puede mezclar en los DDG o añadir a la torta húmeda antes de secado para producir los DDGS (granos secos de destilería con solubles).

Se conoce el uso comercial de diferentes subproductos y residuos derivados de los procedimientos de fermentación como el procedimiento de producción de etanol. Se sabe que los residuos o subproductos de destilerías, así como los subproductos de cereales y otros de fabricación de la industria alimentaria, tienen un cierto valor como fuentes de proteínas y energía para piensos animales. Además, el aceite de los subproductos como los DDGS se puede recuperar como un subproducto separado para usar en la producción de biodiesel o se buscan otros productos biorrenovables.

Los subproductos como DDG, DDGS o WDG comprenden proteínas, fibras, grasa y almidón no convertido. Por ejemplo, los DDGS contienen típicamente aproximadamente 30% de proteína. Aunque el contenido de proteínas es alto, la composición de aminoácidos no es adecuada para animales monogástricos si se usa como pienso animal. En general, el procesamiento de los DDGS, en especial tiempo y temperatura de secado afectan a la disponibilidad y digestibilidad de los aminoácidos, en especial la lisina.

Además, los subproductos son principalmente subproductos fibrosos que comprenden fibra bruta (CF), que son hidratos de carbono estructurales que consisten en celulosa, hemicelulosa y materiales indigeribles como la lignina. Los hidratos de carbono estructurales no son digestibles en el intestino delgado de los animales. Las fibras se caracterizan y analizan por diferentes métodos, y se pueden dividir en fibra bruta (CF), fibra detergente neutro (NDF) y fibra detergente ácido (ADF). La proporción de celulosa y lignina en la fracción de fibra bruta también determina la digestibilidad de la fibra bruta o su solubilidad en el intestino. Concentraciones altas en celulosa y lignina significa digestibilidad reducida y viceversa. Las hemicelulosas son capaces de unir agua. La parte soluble de las fibras, los polisacáridos no amiláceos solubles (NSP), no pueden ser digeridos por animales monogástricos como cerdos y aves de corral, pero aumentan la viscosidad debido a su capacidad para unir agua, y son una restricción nutricional, puesto que pueden producir heces húmedas, pegajosas y suciedad húmeda. El efecto antinutricional de los NSP solubles está relacionado principalmente con el aumento de la viscosidad de la digesta. La mayor viscosidad ralentiza la velocidad de paso del pienso y dificulta la absorción intestinal de nutrientes y puede conducir a una menor absorción de pienso. El aumento de viscosidad a) dificulta la absorción intestinal de nutrientes y puede dar como resultado un efecto negativo en la consistencia de las heces e incluso síntomas de diarrea, b) ralentiza la velocidad de paso del pienso y posiblemente disminuye la ingesta de pienso. Otro efecto de los NSP es la llamada "encapsulación de nutrientes". Los NSP en la pared celular de las plantas encapsulaban almidón, proteínas, aceite y otros nutrientes dentro de la célula de la planta, lo cual es una barrera impermeable que previene el uso completo de los nutrientes dentro de la célula.

Además, los NSP solubles son responsables de altas viscosidades durante la fermentación e influyen directamente en las condiciones de separación y secado de los subproductos de fermentación como los DDGS en el procedimiento de producción. El agua unida o encapsulada en el producto es difícil de eliminar y causa el uso de temperaturas de secado más altas y también tiempo de secado más prolongado, afectando de forma adversa a la calidad de productos sensibles a la temperatura como los aminoácidos. La disponibilidad y digestibilidad de aminoácidos esenciales en los subproductos disminuyen por las altas temperaturas y el tiempo de secado largo durante la producción. Los ejemplos de NSP son arabinoxilanos, beta-glucanos, galactomananos y alfa-

galactósidos.

Puesto que los subproductos se usan en piensos animales para animales monogástricos como cerdos y aves de corral, es importante que los subproductos tengan concentraciones altas de proteína con una buena composición de aminoácidos y alta disponibilidad y bajo contenido en fibras solubles.

Por lo tanto, las dos formas para mejorar una planta de producción fermentativa para aumentar su eficacia y rentabilidad, son un procedimiento de producción mejorado y la mejora de la calidad de los subproductos.

En la técnica anterior, se describen muchos procedimientos específicos o métodos de tratamiento para mejorar procedimientos de producción fermentativos.

Por ejemplo, el documento WO 2007/056321 A1 describe un método de deshidratación de la vinaza entera que comprende añadir enzimas a la vinaza entera en la producción de etanol para mejorar la separación de sólido-líquido en el procedimiento.

El documento WO 02/38786 describe un procedimiento de producción de etanol, por el cual se usan enzimas para adelgazar el mosto de granos enteros licuado y la vinaza fina. Las enzimas se aplican al mosto licuado antes de empezar la fermentación, así como a la vinaza fina después de centrifugación de la vinaza entera.

El documento US 2006/0275882 A1 describe un procedimiento para producir un producto de fermentación en donde la viscosidad del mosto se reduce por aplicación de enzimas antes o durante la fermentación.

El documento US 2006/0233864 A1 describe un método para mejorar la calidad nutricional de los subproductos fibrosos para un procedimiento de fabricación de alimento, en donde se inocula en los subproductos fibrosos como los DDGS un hongo filamentoso para mejorar la calidad del subproducto.

Algunas plantas de etanol usan milo, trigo o cebada en el procedimiento de fermentación, dependiendo de la localización geográfica y la época del año. Como resultado, la composición de nutrientes puede variar entre las fuentes de DDGS. Debido a la fermentación casi completa del almidón, el resto de los aminoácidos, grasa, minerales y vitaminas aumentan aproximadamente tres veces en concentración en comparación con los niveles encontrados en el maíz. A pesar del aumento significativo en proteína bruta, se debe abordar el mal equilibrio de aminoácidos de los DDGS cuando se formulan dietas para cerdos y aves de corral.

Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es proporcionar métodos mejorados para mejorar la calidad de los subproductos de los procedimientos de fermentación. Se necesitan además métodos para mejorar más la eficacia del procedimiento por deshidratación de la vinaza y proporcionar métodos mejorados para aumentar la cantidad de aceite recuperable.

Resumen de la descripción

La presente descripción se refiere a métodos para la mejora de la calidad de los subproductos o residuos derivados de material que contiene almidón en un procedimiento para producir etanol, que comprenden las etapas de: i) someter el mosto fermentado después de la fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa y una xilanasa, ii) separar el producto de fermentación deseado por destilación. La presente invención está definida solo por las reivindicaciones. Las expresiones "realizaciones" y "aspectos de la invención", etc. como se mencionan más adelante, tienen solo fines ilustrativos.

La presente descripción se refiere también a métodos de producción de etanol a partir de material que contiene almidón, comprendiendo dicho método las etapas de:

i) Convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables

ii) Fermentar los azúcares fermentables con un microorganismo al mosto fermentado

iii) Someter el mosto fermentado después del procedimiento de fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa y una xilanasa, o una beta-1,3-glucanasa, una xilanasa y una 1,6-beta-glucanasa

iv) Separación del etanol en el mosto fermentado por destilación

La presente descripción también se refiere a usos de una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa y/o una xilanasa, para mejorar la calidad nutricional de los subproductos o residuos derivados del mosto fermentado en un procedimiento de producción fermentativo.

La presente descripción se refiere a un procedimiento de fermentación de un material que contiene almidón en un producto de fermentación, que comprende una etapa de fermentación sin la presencia de una beta-1,3-glucanasa y/o una xilanasa. Después de la fermentación, se añade una composición de enzimas al mosto fermentado para mejorar los subproductos como subproductos fibrosos tales como granos gastados de destilería, granos secos de

destilería, soluble seco de destilería, granos secos de destilería con solubles, granos húmedos, y sus mezclas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra de forma esquemática un procedimiento de producción de etanol.

La figura 2 muestra de forma esquemática un procedimiento de etanol que incluye tanque de fermentación en el sitio para la producción de enzimas basada en WDG.

La figura 3 muestra de forma esquemática un procedimiento de etanol que incluye tanque de fermentación en el sitio para la producción de enzimas basada en vinaza entera.

La figura 4 es un diagrama que muestra la reducción de ADF y NDF en los DDGS usando 1,3-β-glucanasa.

La figura 5 es un diagrama que muestra la reducción de ADF y NDF en los DDGS usando xilanasa.

La figura 6 es un diagrama que muestra la reducción de ADF y NDF en los DDGS usando una composición de enzimas que comprende 1,3-β-glucanasa y xilanasa.

La figura 7 es un diagrama que muestra la reducción de ADF y NDF en los DDGS usando una composición de enzimas que comprende 1,3-β-glucanasa y xilanasa y una pectinasa o una proteasa.

La figura 8 muestra una imagen de vinaza fina de macerado no tratado con enzimas, de modo que no se puede mostrar separación de aceite.

La figura 9 muestra una imagen de vinaza fina de macerado tratado con enzimas, de modo que se muestra una clara separación del aceite que se forma en una capa de aceite espesa.

La figura 10 es un diagrama que muestra la ganancia de peso de codornices alimentadas con diferente pienso.

La figura 11 es un diagrama que muestra la eficacia de deshidratación de un procedimiento basado en enzimas de acuerdo con la presente descripción, usando una composición de enzimas que comprende 1,3-β-glucanasa y xilanasa.

La figura 12 es un diagrama que muestra un ensayo de digestibilidad in vitro de DDGS producidos usando una composición de enzimas que comprende 1,3-β-glucanasa y xilanasa en un procedimiento de acuerdo con la presente descripción.

La figura 13 es un diagrama que muestra la mejor disponibilidad de proteínas de los DDGS producidos usando una composición de enzimas que comprende 1,3-β-glucanasa y xilanasa en un procedimiento de acuerdo con la presente descripción.

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos de producción fermentativos mejorados debido a una mejor eficacia del procedimiento y a proporcionar subproductos del procedimiento de fermentación con una calidad mejorada.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a métodos para mejorar la calidad de subproductos o residuos derivados de material que contiene almidón en procedimientos para la producción de productos de fermentación, que comprenden las etapas de: i) someter el mosto fermentado después de la fermentación a una composición de enzimas que comprende una enzima o una mezcla de enzimas capaz de degradar uno o más componentes del mosto fermentado, ii) separar el producto de fermentación deseado.

Los subproductos o residuos del procedimiento de fermentación incluyen grano de destilería, granos de cocción, granos secos de destilería, solubles secos de destilería, granos secos de destilería con solubles, WDG y/o residuos de la industria de procesamiento de cereales, o sus mezclas. Por ejemplo, los DDGS son el residuo seco que queda después de que la fracción de almidón del maíz sea fermentada con levaduras y enzimas seleccionadas para producir etanol y dióxido de carbono. Después de completarse la fermentación, el alcohol se separa por destilación y los residuos de fermentación que quedan se secan.

La vinaza es el producto que queda después de que el mosto se haya convertido en azúcar, fermentado y destilado el etanol. La vinaza se puede separar en dos fracciones, tal como por centrifugación o cribado: (1) torta húmeda (fase sólida), y (2) la vinaza fina (líquido sobrenadante). La fracción sólida o grano húmedo de destilería (DWG) se puede prensar para separar el exceso de humedad y después secar para producir los granos secos de destilería (DDG). Después de separar el etanol de la fracción líquida, el líquido que queda se puede evaporar para concentrar el material soluble en los solubles de destilería (DS) condensados o secar y triturar para crear los solubles secos de destilería (DDS). Los DDS a menudo se mezclan con los DDG para formar los granos secos de destilería con solubles (DDGS). Los DDG, DDGS y DWG se denominan colectivamente grano(s) de destilería.

En una realización de la presente descripción, las enzimas se añadieron durante y/o preferiblemente después de la fermentación en el procedimiento de producción al mosto fermentado y antes de la etapa de separación como destilación, donde se separa el principal producto de fermentación deseado del resto del mosto fermentado. Las enzimas de acuerdo con la presente descripción eran capaces de degradar componentes en el mosto fermentado (macerado o mosto macerado) lo que mejora la calidad de los subproductos o residuos como granos de cocción, granos secos de destilería, solubles secos de destilería, granos secos de destilería con solubles, WDG y/o residuos de la industria de procesamiento de cereales, o sus mezclas. Los componentes del mosto fermentado pueden ser paredes celulares, paredes celulares de microorganismos fermentadores, microorganismos, fibras, etc.

Sorprendentemente, la degradación de los propios microorganismos fermentadores por adición de la composición de enzimas de acuerdo con la presente descripción, en particular usando la beta-1,3-glucanasa y/o la beta-1,6-glucanasa, en particular en combinación con una xilanasa y/o una mananasa, da como resultado un aumento del contenido nutricional en el mosto macerado lo cual produce una mejora de la calidad nutricional como el contenido de proteínas de los subproductos, así como la reducción de NPS que resultan de la pared celular del organismo fermentador tal como la pared celular de levaduras.

Por lo tanto, en realizaciones ventajosas, las composiciones de enzimas usadas en los métodos de acuerdo con la presente descripción son capaces de degradar los componentes de la pared celular de los organismos fermentadores después de la etapa de fermentación, así como las fibras en el macerado.

En un aspecto de la presente descripción, la calidad de los subproductos de un procedimiento de producción fermentativo como DDG, DDGS o WDG, se puede mejorar con los métodos de acuerdo con la presente descripción, reduciendo el contenido de fibra de los subproductos.

Otro aspecto de la presente descripción es una mejor deshidratación de la vinaza entera del procedimiento de producción fermentativo para mejorar las condiciones de secado de los subproductos.

Otro aspecto más de la presente descripción es la evaporación de agua mejorada de la vinaza fina para mejorar la producción y composición de la vinaza densa o jarabe.

En otro aspecto de la presente descripción, aumenta la cantidad de aceite recuperable. Los DDGS después de un procedimiento de producción de etanol a partir de maíz, contienen típicamente aproximadamente 13% de aceite, 31% de proteínas y 56% de hidratos de carbono y otros componentes. La eliminación de parte del aceite de los DDGS mejorará la calidad de los DDGS para el mercado del pienso, ya que muchos productores de pienso prefieren menos aceite y grasa en los DDGS para hacer pienso de mejor calidad.

El método de la invención se puede usar en macerado derivado de la producción de cualquier producto de fermentación adecuado. La materia prima para producir el producto de fermentación puede ser cualquier material que contiene almidón y/o azúcar, preferiblemente material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, que incluyen: azúcar de caña, tubérculos, raíces, grano entero; y cualquier combinación de los mismos.

El material que contiene almidón se puede obtener de cereales. El material que contiene almidón adecuado incluye grano de maíz (maíz), trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, triticale, patata o cualquier combinación. El maíz es la materia prima preferida, en especial cuando el producto de fermentación es etanol. El material que contiene almidón también puede consistir o comprender, p. ej., una corriente lateral del procesamiento de almidón, p. ej., corrientes de procedimiento que contienen hidratos de carbono C6 que pueden no ser adecuados para la producción de jarabes. Los componentes del macerado incluyen fibra, cáscara, germen, aceite y componentes proteicos de la materia prima que contiene almidón, así como almidón no fermentado, levaduras, paredes celulares de levaduras y residuos. La producción de un producto de fermentación se divide típicamente en las siguientes etapas del procedimiento principales: a) reducir el tamaño de partículas del material que contiene almidón, p. ej., por molienda seca o húmeda; b) cocer el material que contiene almidón en una suspensión acuosa para gelatinizar el almidón, c) licuar el material que contiene almidón gelatinizado con el fin de romper el almidón (por hidrólisis) en maltodextrinas (dextrinas); c) sacarificar las maltodextrinas (dextrinas) para producir azúcares de bajo peso molecular (p. ej., DP1-2) que pueden ser metabolizados por un organismo fermentador; e) fermentar el material sacarificado usando un organismo fermentador adecuado convirtiendo directa o indirectamente los azúcares de bajo peso molecular en el producto de fermentación deseado; f) recuperar el producto de fermentación, p. ej., por destilación con el fin de separar el producto de fermentación del mosto de fermentación.

Como se ha mencionado antes, el macerado (o mosto fermentado) es el producto de fermentación que consiste en etanol, otros líquidos y sólidos de un producto de fermentación deseado. De acuerdo con la invención el producto de fermentación puede ser cualquier producto de fermentación, incluyendo alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H_2 y CO_2), y compuestos más complejos, que incluyen, por ejemplo, antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. La fermentación también se usa habitualmente en la producción de alcohol consumible (p. ej., licores, cerveza y vino), productos lácteos (p. ej., en la producción de yogur y queso), cuero e industrias del tabaco. En una realización preferida, el

producto de fermentación es un líquido, preferiblemente un alcohol, en especial etanol. El macerado contemplado de acuerdo con la invención puede ser el producto resultante de un procedimiento de producción del producto de fermentación que incluye las etapas mencionadas antes a) a f). Sin embargo, el macerado también puede ser el producto resultante de otros procedimientos de producción de productos de fermentación basados en material de partida que contiene almidón y/o lignocelulosa.

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

En una realización adicional, los sólidos de la etapa de fermentación se pueden fraccionar. Después de la fermentación se podrían separar trozos grandes de fibras antes o después de la destilación. La separación se puede realizar con una espumadera de superficie antes de la destilación del macerado. El material se puede separar de la mezcla de etanol/agua, p. ej., por centrifugación. Alternativamente, las fibras y gérmenes se pueden separar por cribado de la vinaza entera después de destilación o los granos triturados antes de fermentación. Después de separar los gérmenes y trozos grandes de fibras, el macerado que queda o vinaza entera se tratan con enzimas o combinaciones de enzimas para mejorar más la calidad nutricional del subproducto final como los DDGS que se van a usar.

Basándose en la vinaza entera o WDG en una realización de la presente descripción se puede introducir un fermentador adicional para una producción de enzimas en el sitio, que produce una mezcla de enzimas específica de la planta y procedimiento con hongos filamentosos. El líquido sobrenadante de esta fermentación que comprende enzimas, se transfiere directamente al fermentador principal o tanque pulmón para reducir el contenido de fibra y mejorar la calidad y factores nutricionales de los DDGS, WDG y/u otros subproductos.

Además, el uso de las composiciones de enzimas de acuerdo con la presente descripción en el mosto macerado después de la fermentación y antes del procedimiento de destilación puede reducir la viscosidad del mosto macerado por la degradación de fibras y/o los microorganismos fermentativos en el macerado. La reducción de las fibras en el macerado da como resultado una reducción del contenido de fibras en los subproductos. La degradación temprana de los NSP tiene una influencia directa en la separación y las condiciones de secado de los subproductos como los DDGS en el procedimiento de producción. La menor viscosidad da como resultado temperaturas de secado menores y también un tiempo de secado más corto, dando una mejor calidad de los subproductos. Por ejemplo, los productos sensibles a la temperatura como proteínas y aminoácidos no se destruyen.

Además, la adición de enzimas de acuerdo con la presente descripción al mosto fermentado antes de la etapa de destilación, es una ventaja puesto que las enzimas en las composiciones de enzimas son inactivadas durante la destilación.

Debido a la calidad mejorada, los subproductos y residuos se pueden usar como pienso animal de alta calidad con bajo contenido en fibra y aceite y alto contenido en proteína.

En una realización, la descripción se refiere a métodos para formular aditivos de piensos nutricionalmente útiles como coproductos de los métodos mencionados antes para mejorar las características nutriciones de un producto alimenticio fibroso.

Los procedimientos para producir productos de fermentación incluyen la producción de un gran número de productos de fermentación que comprenden, pero no se limitan a alcoholes (en particular etanol); ácidos, tales como ácido cítrico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, lisina; cetonas; aminoácidos, tales como ácido glutámico, pero también compuestos más complejos tales como antibióticos tales como penicilina, tetraciclina; enzimas; vitaminas tales como riboflavina, B12, beta-caroteno; hormonas, tales como inulina. Se prefiere el etanol bebible, así como etanol industrial y combustible.

Los procedimientos para producir productos de fermentación, tales como etanol, a partir de un material que contiene almidón o lignocelulosa, son bien conocidos en la técnica. La preparación del material que contiene almidón tal como maíz para usar en dichos procedimientos de fermentación, típicamente empieza con la trituración del maíz en un procedimiento de trituración seca o molienda húmeda. Los procedimientos de molienda húmeda implican fraccionamiento del maíz en diferentes componentes, donde solo la fracción de almidón entra en el procedimiento de fermentación. Los procedimientos de trituración seca implican la trituración de los granos de maíz en harina y mezclamiento de la harina con agua y enzimas. En general se usan dos tipos diferentes de procedimientos de trituración húmeda. El procedimiento usado más habitualmente, denominado con frecuencia un "procedimiento convencional", incluye trituración del material que contiene almidón y después licuefacción del almidón gelatinizado a una temperatura alta usando típicamente una alfa-amilasa bacteriana, seguido de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) llevadas a cabo en presencia de una glucoamilasa y un organismo fermentador. Otro procedimiento bien conocido, denominado a menudo un procedimiento de "hidrólisis de almidón bruto" (procedimiento RSH), incluye la trituración del material que contiene almidón y después la sacarificación y

fermentación simultáneas del almidón granular por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, típicamente en presencia de una alfa-amilasa ácida fúngica y una glucoamilasa.

En un procedimiento para producir etanol a partir de maíz, siguiendo el procedimiento SSF o el RSH, el etanol se destila del mosto entero después de fermentación. La suspensión sin etanol resultante, normalmente denominada vinaza entera, se separa en fracciones sólida y líquida (es decir, torta húmeda y vinaza fina que contienen aproximadamente 35 y 7% de sólidos, respectivamente). La vinaza fina a menudo se condensa por evaporación en una vinaza densa o jarabe y se recombina con la torta húmeda y se seca más a los granos secos de destilería con solubles, grano seco de destilería con solubles (DDGS) para usar en el pienso animal.

Las enzimas usadas para degradar los componentes del macerado incluyen carbohidrasas tales como alfa-amilasa, glucoamilasa, celulasa y/o hemicelulasas, tales como mananasas, xilanasas y beta-glucanasas, pectinasas y proteasas, o una mezcla de las mismas.

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 fermentativos la composición de enzimas se añade después de la etapa de fermentación. Como se usa en la presente memoria, "después de fermentación" o "después de la etapa de fermentación" significa que una gran parte o todos los azúcares fermentables tales como 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 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 realizaciones adicionales, 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 una realización adicional, la composición de enzimas comprende una mananasa. En una realización ventajosa, la composición de enzimas comprende a mananasa y una beta-1,3-glucanasa.

Las paredes celulares de la mayoría de los microorganismos fúngicos verdaderos y levaduras contienen una red de glucanos, que da resistencia a la pared celular. Constituyentes de las paredes celulares fúngicas principales adicionales son la manoproteína y quitina. Para la degradación de los componentes del mosto fermentado, en particular para la degradación de las fibras y microorganismos fermentadores, se pueden usar las siguientes enzimas.

Las beta-1,3-glucanasas, como se usan en la presente memoria, son enzimas capaces de degradar glucanos. Los glucanos 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 tipo hongos. El glucano tiene predominantemente enlaces beta-1,3 con alguna ramificación por enlaces 1,6 (Manners et al., *Biotechnol. Bioeng*, 38, pág. 977, 1973), y se sabe que puede ser degradado por algunos sistemas de beta-1,3-glucanasa. La beta-1,3-glucanasa incluye el grupo de endo-beta-1,3-glucanasas llamadas también laminarinasas (E.C. 3.2.1.39 y E.C. 3.2.1.6, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, Inc. 1992).

En la técnica anterior se ha descrito una serie de genes de beta-1,3-glucanasa y sus usos. Un ejemplo es el documento DD 226012 (Akad. Wissenshaft, 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 beta-1,3-glucanasa de pared celular para eliminar las paredes celulares de levaduras. El gen procede de Arthrobacter y se transforma en bacterias del grupo Escherichia. El documento EP 440.304 se refiere a plantas provistas de resistencia mejorada contra hongos patógenos transformadas con al menos un gen que codifica una quitinasa intracelular o beta-1,3-glucanasa intra o extracelular. También se describen los polinucleótidos recombinantes de emparejamiento. 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. 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, procedente de Oerskovia xanthineolytica, que codifica una beta-1,3-glucanasa. Del documento WO 92/16632 se conoce una secuencia de ADN recombinante que codifica una nueva proteína con actividad de beta-1,3-glucanasa.

Ejemplos de beta-1,3-glucanasa disponibles en el mercado son Rohalase BX de AB Enzymes y Rapidase Glucalees de DSM.

Las hemicelulasas como se usan en la presente memoria, son enzimas capaces de romper la hemicelulosa. Cualquier hemicelulasa adecuada para usar en la hidrólisis de hemicelulosa, puede ser acetilxilano esterasas, endo-arabinasas, exo-arabinasas, arabinofuranosidasas, feruloil esterasa, endo-galactanasas, exo-galactanasas, glucuronidasas, manasas, xilanasas, y mezclas de dos o más de las mismas. Preferiblemente, la hemicelulasa para

usar en la presente invención es una hemicelulasa que actúa en endo, y más preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa que actúa en exo, que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa en condiciones ácidas inferiores a pH 7, preferiblemente pH 3-7.

En un aspecto, la(s) hemicelulasa(s) comprende(n) una preparación de enzimas hemicelulolíticas comerciales. Ejemplos de preparaciones de enzimas hemicelulolíticas comerciales adecuadas para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, SHEARZYME(TM) (Novozymes A/S), CELLIC(TM) HTec (Novozymes A/S), CELLIC(TM) HTec2 (Novozymes A/S), VISCOZYME(R) (Novozymes A/S), ULTRAFLO(R) (Novozymes A/S), PULPZYME(R) HC (Novozymes A/S), Xilanasa MULTIFECT(R) (Genencor), ACCELLERASE(R) XY (Genencor), ACCELLERASE(R) XC (Genencor), ECOPULP(R) TX-200A (AB Enzymes), Xilanasa HSP 6000 (DSM), DEPOL(TM) 333P (Biocatalysts Limit, Wales, Reino Unido), DEPOL(TM) 740L. (Biocatalysts Limit, Wales, Reino Unido), y DEPOL(TM) 762P (Biocatalysts Limit, Wales, Reino Unido).

Preferiblemente, la hemicelulasa para usar en la presente descripción es una hemicelulasa que actúa en endo, que tiene la capacidad de hidrolizar hemicelulosa en condiciones ácidas inferiores a pH 7. Un ejemplo de hemicelulasa adecuada para usar en la presente invención incluye VISCOZYME L(TM) (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca), Rohament GMP™ (disponible en AB Enzymes).

En una realización, la hemicelulasa es una xilanasa. En una realización, la xilanasa puede ser preferiblemente de origen microbiano, tal como de origen fúngico (p. ej., Aspergillus, Fusarium, Humicola, Meripilus, Trichoderma) o de una bacteria (p. ej., Bacillus). En una realización preferida, la xilanasa procede de un hongo filamentoso, preferiblemente procede 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 no se limitan a xilanasa de Aspergillus aculeatus (GeneSeqP:AAR63790; WO 94/21785), xilanasas de Aspergillus fumigatus (WO 2006/078256), y xilanasas de Thielavia terrestris NRRL 8126 (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(TM), BIOFEED WHEAT(TM), HTec y HTec2 de Novozymes A/S, Dinamarca.

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

De acuerdo con la invención, el macerado en la etapa i) se puede someter a una cantidad eficaz de cualquier xilanasa (EC 3.2.1.8), tal como cualquiera de las xilanasas mencionadas más adelante. La actividad de xilanasa puede proceder de cualquier organismo adecuado, incluyendo organismos fúngicos y bacterianos. Las xilanasas fúngicas pueden proceder de cepas de géneros que incluyen Aspergillus, Disporotrichum, Penicillium, Neurospora, Fusarium y Trichoderma.

Los ejemplos de xilanasas bacterianas adecuadas incluyen xilanasas procedentes de una cepa de Bacillus, las xilanasas disponibles en el mercado contempladas incluyen SHEARZYM E (TM), BIOFEED WHEAT(TM), (de Novozymes AJS), Econase CE™ (de AB Enzymes), Depol 676™ (de Biocatalysts Ltd.) y SPEZYME(TM) CP (de Genencor Int.).).

La xilanasa se puede añadir en una cantidad eficaz en el intervalo de $0{,}16x10^6$ - $460x10^6$ Unidades por tonelada de mosto macerado.

Las mananasas son hemicelulasas clasificadas como EC 3.2.1.78, y llamadas endo-1,4-beta-manosidasa. La mananasa incluye beta-mananasa, endo-1,4-mananasa, y galacto-mananasa. La mananasa preferiblemente es capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-manosídicos en mananos, que incluyen glucomananos, galactomananos y galactoglucomananos. Los mananos son polisacáridos compuestos principal o enteramente de unidades de D-manosa. La mananasa puede ser de cualquier origen tal como un organismo bacteriano o fúngico, En una realización específica la mananasa procede de una cepa del género de hongos filamentosos Trichoderma, preferiblemente Trichoderma reseei. En una realización, la mananasa es una de las mananasas descritas en el documento WO2008/009673.

Las mananasas se han identificado en varios organismos Bacillus. Por ejemplo, Talbot et al., *Appl. Environ. Microbio*l., Vol.56, No. 11, pág. 3505-3510 (1990) describe una beta-mananasa derivada de Bacillus stearothermophilus. Mendoza et al., *World J. Microbiol. Biotech*., Vol. 10, No. 5, pág. 551-555 (1994) describe una beta-mananasa derivada de Bacillus subtilis. El documento JP-A-03047076 describe una beta-mananasa derivada de Bacillus sp. El documento JP-A-63056289 describe la producción de una beta-mananasa termoestable, alcalina. El documento JP-A-63036775 se refiere al microorganismo Bacillus FERM P-8856 que produce beta-mananasa y beta-manosidasa. El documento JP-A-08051975 describe beta-mananasas alcalinas de Bacillus sp. alcalófilos AM-001. Se describe una mananasa purificada de Bacillus amyloliquefaciens en el documento WO 97/11164. 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.

La mananasa se puede añadir en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,3x10^6$ - $1,6x10^6$ Unidades por tonelada de mosto macerado.

Una celulasa, usada de acuerdo con la descripción, puede ser cualquier celulasa, en particular de origen microbiano, en particular de origen fúngico o bacteriano tal como una celulasa que se puede obtener de una cepa de un hongo filamentoso (p. ej., Aspergillus, Trichoderma, Humicola, Fusarium). Preferiblemente, la celulasa actúa tanto en material celulósico como lignocelulósico. Las celulasas preferidas para usar en la presente invención incluyen celulasas que actúan en endo, celulasas que actúan en exo y celobiasas, y sus combinaciones. Los ejemplos de celulasas disponibles en el mercado adecuadas de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLULCLAST(TM) (disponible en Novozymes A/S), , LAMINEX(TM) y SPEZYME(TM) CP (Genencor Int.) y Econase CE™ (de AB Enzymes GmbH), Rohalase BX™ (de Ab Enzymes GmbH), Celulasa 13P™ (de Biocatalysts Ltd.). La celulasa se puede añadir en cantidades eficaces en el intervalo de $0,03x10^6$ - $16x10^6$ Unidades por tonelada de sustrato (en mosto macerado)

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, tal 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 disponibles en el mercado contempladas incluyen Pectinex Ultra-SPL™ (de Novozymes), Pectinex Ultra Color (de Novozymes), Rohapect Classic (de AB Enzymes), Rohapect 10L (de AB Enzymes).

La pectinasa se puede añadir en una cantidad eficaz en el intervalo de $1,4x10^9$ - $23.500x10^9$ Unidades por tonelada de mosto macerado.

Las proteasas como se usan en la presente descripción, son enzimas que catalizan la escisión de enlaces peptídicos. Las proteasas adecuadas incluyen proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas en condiciones ácidas inferiores a pH 7.

Las proteasas fúngicas ácidas adecuadas incluyen proteasas fúngicas derivadas de Aspergillus, Mucor, Rhizopus, Candida, Coriolus, Endothia, Enthomophtra, Irpex, Penicillium, Sclerotium y Toru-lopsis. Las proteasas comerciales incluyen GC 106(TM) y SPEZYME(TM) FAN (disponible en Genencor, EE.UU.). Las proteasas bacterianas adecuadas, aunque no son proteasas ácidas, incluyen los productos disponibles en el mercado ALCALASE(TM) y NEUTRASE(TM) (disponibles en Novozymes A/S).

La proteasa se puede añadir en una cantidad eficaz en el intervalo de $0,002x10^6$-$314x10^6$ Unidades por tonelada de mosto macerado.

Se puede usar cualquier fitasa en los métodos de la presente descripción. Las fitasas son enzimas que degradan fitatos y/o ácido fítico por hidrólisis específica del enlace éster entre inositol y fósforo. La actividad de fitasa se muestra con la disponibilidad de fósforo e iones en muchos ingredientes. En algunas realizaciones, la fitasa puede liberar al menos un fosfato inorgánico de un hexafosfato de inositol (p. ej., ácido fítico). Las fitasas se pueden agrupar de acuerdo con su preferencia por una posición específica del grupo éster fosfato en la molécula de fitato en la que se inicia la hidrólisis (p. ej., 3-fitasa (EC 3.1.3.8) o 6-fitasa (EC 3.1.3.26)). Un ejemplo de fitasa es la mio-inositolhexakisfosfato-3-fosfohidrolasa. Las fitasas se pueden obtener de microorganismos tales como organismos fúngicos y bacterianos. Por ejemplo, la fitasa se puede obtener de hongos filamentosos tales como Aspergillus (p. ej., A. ficuum, A. fumigatus, A. niger y A. terreus), Cladospirum, Mucor (p. ej., Mucor piriformis), Myceliop t ora (p. ej., M. t ermop ila), Penicillium (p. ej., P. ordei (ATCC Nº 22053)), P. piceum (ATCC Nº 10519), o P. brevi-compactum (ATCC Nº 48944), Talaromyces (p. ej., T. thermophilus), Thermomyces (WO 99/49740), y Trichoderma spp. (p. ej., T. reesei). En una realización, la fitasa deriva de Buttiauxiella spp. tal como B. agrestis, B. brennerae, B. ferragutiase, B. gaviniae, B. izardii, B. noackiae, y B. warmboldiae. En algunas realizaciones, la fitasa es una fitasa descrita en el documento WO 2006/043178.

El ejemplo 1 muestra la deshidratación enzimática de la vinaza entera después de tratar el mosto macerado con enzimas capaces de degradar al menos un componente del mosto macerado. Por lo tanto, un aspecto de la descripción se refiere a un método para mejorar la calidad de los WDG, DDG y/o DDGS, que comprende las etapas de: i) someter el macerado a una o más enzimas capaces de degradar uno o más componentes del macerado, ii) destilación, iii) separar el material en una fracción sólida y una fracción líquida. La fracción sólida se denomina a menudo "torta húmeda" y la fracción líquida se denomina a menudo "vinaza fina".

De acuerdo con el propósito de la presente invención como se describe en la presente memoria, en un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para mejorar la calidad nutricional de un subproducto o residuo de un procedimiento de producción fermentativo, que comprende inocular en el subproducto o residuo al menos un hongo filamentosos, fermentar el subproducto o residuo y separar al menos una enzima del subproducto o residuo fermentado; y proporcionar la enzima al mosto fermentado (mosto macerado) de un procedimiento de producción fermentativo, preferiblemente un procedimiento de producción de etanol. El hongo filamentoso se puede seleccionar

del grupo que consiste en Rhizopus, Aspergillus, Trichoderma, y cualquiera de sus combinaciones. El subproducto o residuo preferiblemente es un subproducto fibroso y se puede seleccionar del grupo que consiste en granos gastados de cocción, granos secos de destilería, solubles secos de destilería, granos secos de destilería con solubles y WDG, y sus mezclas.

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

v) Convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables

vi) Fermentación de los azúcares fermentables con un microorganismo en mosto fermentado

vii) Someter el mosto fermentado después del procedimiento de fermentación a una composición de enzimas que comprende una enzima o una mezcla de enzimas

viii) Separación del etanol en el mosto fermentado por destilación

La conversión del material que contiene almidón en azúcares fermentables se puede hacer por (a) licuefacción de un material que contiene almidón y (b) sacarificación del material licuado obtenido en la etapa (a).

La licuefacción se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana o alfa-amilasa fúngica ácida. En una realización, se añade una pululanasa, isoamilasa y y/o fitasa durante la licuefacción.

Los organismos preferidos para la producción de etanol son levaduras, tales como, p. ej., Pichia o Saccharomyces. La levadura preferida de acuerdo con la descripción es del género Saccharomyces, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería. Las células de levadura se pueden añadir en cantidades de 10^5 a 10^{12}, preferiblemente de 10^7 a 10^{10}, en especial $5x10^7$ de levaduras viables contadas por ml de caldo de fermentación. Durante la fase de producción de etanol, el recuento de células de levadura debería estar preferiblemente en el intervalo de 10^7 a 10^{10}, en especial aproximadamente 2 x 10^8. Se puede encontrar orientación adicional con respecto al uso de levaduras para la fermentación, p. ej., en "The alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T. P. Lyons y D. R. Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999), que se incorpora en la presente memoria por referencia

El microorganismo usado para la fermentación se añade al mosto y la fermentación procede hasta que se produce la cantidad deseada de producto de fermentación; en una realización preferida en donde el producto de fermentación que se va a recuperar es etanol, esta puede ser, p. ej., durante 24-96 horas, tal como 35-60 horas. La temperatura y el pH durante la fermentación es una temperatura y pH adecuados para el microorganismo en cuestión y con respecto al uso previsto del producto de fermentación, tal como, p. ej., en una realización en donde el organismo fermentador es levadura y el producto para recuperar es etanol, la temperatura preferida está en el intervalo de aproximadamente 26-34ºC, p. ej., aproximadamente 32ºC, y a un pH p. ej. en el intervalo de aproximadamente pH 3-6, p. ej., aproximadamente pH 4-5.

En otra realización en donde el organismo fermentador es levadura, y el mosto fermentado se va a usar como un macerado, la temperatura del mosto, la temperatura preferida es aproximadamente 12-16ºC, tal como aproximadamente 14ºC.

Como se ha mencionado antes, el organismo fermentador preferiblemente es levadura, p. ej. una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces diastaticus.* En una realización ventajosa, se usa una cepa de levadura de *Saccharomyces diastaticus* (SIHA Amyloferm®, E. Begerow GmbH&Co, Langenlonsheim, Alemania) puesto que su actividad de exo-amilasa puede dividir el almidón líquido y también la dextrina, maltosa y melibiosa.

En la etapa de licuefacción, el almidón gelatinizado (mosto corriente abajo) se rompe (hidroliza) en maltodextrinas (dextrinas). Para lograr la hidrólisis del almidón se añade una enzima adecuada, preferiblemente una alfa-amilasa. La licuefacción se puede llevar a cabo como un procedimiento de suspensión en caliente de tres etapas. La suspensión se calienta entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se puede añadir una alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (adelgazamiento). Después la suspensión se puede cocer con vapor a presión (*jet-cokked*) a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, en especial alrededor de aproximadamente 5 minutos. La suspensión se enfría a 60-95°C y se puede añadir más alfa-amilasa para completar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El procedimiento de licuefacción normalmente se lleva a cabo a un pH de 4,0 a 6,5, en particular a un pH de 4,5 a 6.

La etapa de sacarificación y la etapa de fermentación se pueden llevar a cabo como etapas del procedimiento separadas o como una etapa de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La sacarificación se lleva a cabo en presencia de una enzima de sacarificación, p. ej., una glucoamilasa, una beta-amilasa o amilasa maltogénica. Opcionalmente se añade una fitasa y/o una proteasa.

La sacarificación se puede llevar a cabo usando condiciones bien conocidas en la técnica con una enzima de sacarificación, p. ej., beta-amilasa, glucoamilasa o amilasa maltogénica, y opcionalmente una enzima

desramificadora, tal como una isoamilasa o una pululanasa. Por ejemplo, un procedimiento de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 72 horas, sin embargo, es común hacer una pre-sacarificación durante típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65ºC, típicamente aproximadamente 60ºC, seguido de la sacarificación completa durante la fermentación en un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneas (procedimiento SSF). La sacarificación se lleva a cabo típicamente a una temperatura de 20-75°C, preferiblemente de 40-70°C, típicamente aproximadamente 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4,5.

El procedimiento más ampliamente usado para producir un producto de fermentación, en especial etanol, es el procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), en el que no hay etapa de mantenimiento para la sacarificación, lo que significa que se puede añadir todo junto un organismo fermentador, tal como una levadura, y enzima(s), que incluye(n) la(s) hemicelulasa(s) y/o endoglucanasa(s) específica(s). El SSF se lleva a cabo típicamente a una temperatura de 25°C a 40°C, tal como de 28°C a 35°C, de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 32°C. En una realización, la fermentación procede durante 6 a 120 horas, en particular de 24 a 96 horas.

Después de la fermentación, el mosto fermentado se somete a una composición de enzimas de acuerdo con la presente descripción. En una realización, 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 realizaciones adicionales, 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 una realización adicional, la composición de enzimas comprende una mananasa. En una realización ventajosa, la composición de enzimas comprende una mananasa y una beta-1,3-glucanasa.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende además, antes de la licuefacción del material que contiene almidón, las etapas de:

- reducción del tamaño de partículas del material que contiene almidón, preferiblemente por molienda; y

- formación de una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua.

La suspensión acuosa puede contener 10-55% en p/p de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45% en p/p de sólidos secos (DS), más preferiblemente 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 se puede añadir una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana y/o fúngica ácida, para iniciar la licuefacción (adelgazamiento). La suspensión se puede cocer con vapor a presión para gelatinizar 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 molienda de los cereales antes de la etapa (a). En otras palabras, la descripción también abarca métodos, en donde el material que contiene almidón se puede obtener por un procedimiento que comprende la molienda de cereales, preferiblemente molienda seca, p. ej., por molinos de martillos o de rodillos. La trituración también se entiende como molienda, como lo es cualquier procedimiento adecuado para abrir los granos individuales y exponer el endospermo al procesamiento adicional. Normalmente se usan dos procedimientos de molienda en la producción de alcohol: molienda húmeda y seca. La expresión "molienda seca" indica molienda del grano entero. En la molienda seca se muele el grano entero y se usa en la parte restante del procedimiento de formación de mosto. El mosto se puede proporcionar formando una suspensión que comprende el material que contiene almidón molido y agua de cocción. El agua de cocción se puede calentar a una temperatura adecuada antes de combinarla con el material que contiene almidón molido con el fin de lograr una temperatura del mosto de 45 a 70°C, preferiblemente de 53 a 66°C, más preferiblemente de 55 a 60°C. El mosto típicamente se forma en un tanque conocido como tanque de suspensión.

Después de la fermentación se puede separar el producto de fermentación del medio de fermentación. La suspensión se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado del medio de fermentación mediante técnicas filtración o microfiltración por membrana. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por separación de los componentes volátiles. Los métodos para recuperar los productos de fermentación son bien conocidos en la técnica. Típicamente, el producto de fermentación, p. ej. etanol, se obtiene con una pureza de hasta, p. ej. aproximadamente 96% en vol de etanol.

Después de completarse el procedimiento de fermentación, el material que queda se considera la vinaza entera. Como se usa en la presente memoria, la expresión "vinaza entera" incluye el material que queda al final del procedimiento de fermentación tanto antes como después de recuperar el producto de fermentación, p. ej., etanol. El producto de fermentación se puede recuperar opcionalmente por cualquier método conocido en la técnica. En una

realización, la vinaza entera se separa o divide en una fase sólida y líquida por uno o más métodos para separar la vinaza fina de la torta húmeda. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, centrifugación y decantación. El producto de fermentación se pude recuperar opcionalmente antes o después de que la vinaza entera se separe en una fase sólida y líquida.

Por lo tanto, en una realización, los métodos de la descripción comprenden además destilación para obtener el producto de fermentación, p. ej., etanol. La fermentación y la destilación se pueden llevar a cabo simultáneamente y/o por separado/secuencialmente; opcionalmente seguido por una o más etapas de procedimiento para el refinado adicional del producto de fermentación.

En una realización, el subproducto acuoso (vinaza entera) procedente del procedimiento de destilación se separa en dos fracciones, p. ej., por centrifugación: grano húmedo (fase sólida) y vinaza fina (líquido sobrenadante). En otra realización los métodos de la descripción comprenden además la separación de la vinaza entera producida por destilación, en grano húmedo y vinaza fina; y la recirculación de la vinaza fina al material que contiene almidón antes de licuefacción. En una realización, la vinaza fina se recircula a la suspensión de granos enteros molidos. La fracción de granos húmedos se puede secar, típicamente en un secador de tambor. El producto seco se denomina granos secos de destilería, y se pueden usar como se ha mencionado antes como pienso animal de alta calidad. La fracción de vinaza fina se puede evaporar proporcionando dos fracciones (véase la fig. 1 y fig. 2), (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 se pueden introducir en un secador junto con los granos húmedos (de la etapa de separación de la vinaza entera) para proporcionar un producto denominado grano seco de destilería con solubles, que también se puede usar como pienso animal. La vinaza fina es el término usado para el líquido 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 aproximadamente 60-90ºC. En otra realización, la vinaza fina no se recircula, pero se recircula la corriente de condensado de la vinaza fina evaporada a la suspensión que contiene el grano entero molido para ser cocida con vapor a presión.

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

Los métodos para deshidratar la vinaza y para extraer aceite de un producto de fermentación se conocen en la técnica. Estos métodos incluyen la decantación u separación de otra forma de la vinaza entera en torta húmeda y vinaza fina. Véase, p. ej., las patentes de EE.UU. 6.433.146, 7.601.858 y 7.608.729, y publicación de solicitud de EE.UU. Nº 2010/0058649. Además, la vinaza fina se puede evaporar o condensar en un jarabe o vinaza densa de la cual se puede extraer el aceite usando centrifugación, filtración, calor, temperatura alta, presión mayor, o una combinación de los mismos. Otra forma de extraer aceite es disminuir el pH de la vinaza fina o jarabe. El uso de tensioactivos para romper emulsiones también mejora la extracción de aceite. También se pueden usar prensas para la deshidratación. En una realización de la descripción, la presencia de beta-1,3-glucanasa y/o xilanasa en el mosto fermentado después de la fermentación aumenta la cantidad de aceite en la vinaza fina y además en el jarabe o vinaza espesa.

El(los) producto(s) de fermentación se puede(n) recuperar opcionalmente del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material celulósico fermentado y se purifica por métodos convencionales de destilación como se ha mencionado antes. Se puede obtener etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96% en vol, que se puede usar, por ejemplo, como etanol combustible, etanol bebible, es decir, alcoholes neutros potables o etanol industrial.

Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria no están limitadas en el alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, puesto que se pretende que estas realizaciones sean ilustraciones de varios aspectos de la invención. Se pretende que cualquier realización equivalente esté dentro del alcance de esta invención. De hecho, diferentes modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. También se pretende que dichas modificaciones estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En el caso de conflicto, controlará la presente descripción incluyendo las definiciones. Se citan varias referencias en la presente memoria, cuyas descripciones se incorporan por referencia en su totalidad. La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

A) Procedimientos para producir productos de fermentación

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

a) reducción del tamaño de partículas del material que contiene almidón mediante molienda:

- el maíz se molió a < 2 mm de tamaño de partículas

b) formación de una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua

- se mezclaron 10 kg de maíz con agua corriente a 35ºC para obtener una disolución de ~31,25% de sólidos, volumen total de 30 litros

- el intervalo de pH era 5,6 - 6,0

c) licuefacción del material que contiene almidón

- la temperatura se aumentó a 90ºC

- se añadieron 7 ml de alfa-amilasa (Novozymes Liquozyme SC)

- se añadió 1‰ de antiespumante (30 ml)

- incubación durante 90 min a 90ºC y agitación a 150 rpm

d) sacarificación del material licuado obtenido

- la suspensión se enfrió a 30°C, el pH se ajustó ~4 con (NH4)2SO4 1 M - se añadieron 12 ml de glucoamilasa (Novozymes Spirizyme Ultra)

e) fermentación

- Propagación de levaduras: se incubaron 200 ml de medio YNB-almidón durante la noche (30°C, 150 rpm) y se inocularon 2 g de levaduras (SIHA Amyloferm), el precultivo completo se añadió a la fermentación

- adición de 10 g de $((NH_4)_2SO_4)$ como fuente de nitrógeno

- adición de levaduras

- se valoró el pH a 4,0 con solución de amoniaco (25%), - incubación durante máx. 48 h a 30°C y 100 rpm

- se tomaron muestras de 2 ml cada 12 h para seguir el progreso de la fermentación (azúcar-, concentración de etanol)

B) Enzimas:

Se usaron las siguientes enzimas citadas en la tabla 1, solas o en diferentes combinaciones.

Tabla 1

Tipo	Actividad	*Abreviatura*
Celulasa	565,84 U/g	*Cel2*
endo-1,4 beta-Mananasa	6538,01 U/g	*Man3*
Pectinasa	90349,55 U/ml	*Pec3*
□ 1-3 Glucanasa	10016,97 U/g	*Glu1*
Xilanasa	34094,02 U/g	*Xyl4*
Xilanasa	35094,00 U/g	*Xyl7*

C) Determinación de la actividad del producto enzimático con DNSA:

Sustratos: -endo Glucanasa: β-Glucano de cebada, baja viscosidad (Megazyme)

Xilanasa: Xilano de Birchwood (Sigma)

Mananasa: Galactomanano, carob

Pectinasa: Poli(ácido galacturónico) (Sigma)

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

Tampón: NaAcetat 50 mM, pH 4,5

Las enzimas se diluyeron en tampón, se debe determinar para cada enzima la concentración enzimática correcta. Se mezclaron 90 µl de sustrato y 10 µl de solución enzimática. Se midió un blanco sustituyendo la solución enzimática por agua. Incubación durante 30 min a 37ºC (Los azúcares reductores se midieron después de mezclar 50 µl de la mezcla de sustrato-enzima incubada con 50 µl de reactivo DNSA.

La actividad se calcula como Unidades por µl o mg de producto de enzima. 1 unidad se define como la cantidad de extremos reductores formados en µmol por minuto.

D) Ensayo en endo-beta-1,3-glucanasa

El sustrato usado es azurina-pachyman reticulado (AZCL-Pachyman). El sustrato se prepara por teñido y reticulación de pachyman altamente purificado para producir un material que se hidrata en agua, pero es insoluble en agua. La hidrólisis por endo-beta-1,3-glucanasa produce fragmentos teñidos solubles en agua, y la tasa de liberación de estos (aumento de absorbancia a 590 nm) se puede relacionar directamente con la actividad enzimática. El sustrato se suministra comercialmente en una forma de comprimido listo para usar como comprimidos de 1,3-Beta-Glucazima (Megazyme International Ireland Ltd, 1,3-BETA-GLUCAZYME TABLETS)

E) Ensayo de proteasa

La actividad de proteasa de los productos de enzimas se determinó con el ensayo de TNBS como se describe en el ejemplo 6.

Una unidad de proteasa se define como la formación de equivalentes de glicina por minuto. Las actividades enzimáticas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Abreviatura	Actividad principal	Unidades
Cel1	79,64	U/ml
Cel2	565,84	U/g
Cel3	1061,00	U/ml
Man1	6205,96	U/g
Man2	7988,38	U/g
Man3	6538,01	U/g
Pec1	28242,70	U/ml
Pec2	37473,18	U/ml
Pec3	90349,55	U/ml
Pec4	117283,35	U/ml
Pec5	44082,56	U/ml
Glu1	10016,97	U/g
Glu2	10594,57	U/g
Glu3	3583,18	U/g
Glu5	763,00	U/ml
Xyl1	2264,56	U/ml
Xyl2	4434,68	U/g
Xyl3	314,83	U/g
Xyl4	34094,02	U/g
Xyl5	4,28	U/g

Xyl7	35094,00	U/g
Xyl8	14108,00	U/g
Xyl9	75000,00	U/g
Xyl10	790,00	U/g
xyl 11	1178,00	U/g
Xyl12	16603,50	U/g

Ejemplo 1

Deshidratación de la vinaza entera

Se usó como sustrato macerado (8,7% en peso de sólidos secos, pH=4,0 de la fermentación de etanol con molienda seca convencional.

Se puso una parte alícuota (50 ml) de la vinaza entera en un tubo de centrífuga y se calentó a 37ºC. La concentración total de enzima añadida era 200 ppm, la mezcla se agitó suavemente durante la noche en un agitador rotatorio.

El tubo se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. El líquido sobrenadante se decantó y la torta húmeda resultante se pesó y se comparó con el control sin la adición de ninguna enzima. Los resultados, junto con varias enzimas y combinaciones de enzimas ensayadas, se muestran en la tabla 2 y tabla 3.

Tabla 2

Enzima	torta húmeda	Des. Estándar
Cell	91,9%	1,15
Cel2	90,8%	1,06
Man1	87,8%	4,01
Man2	86,7%	2,53
Man3		
Men1	99,6%	0,4
Pec1	97,8%	2,48
Pec2	87,1%	8,16
Pec3	80,8%	0,71
Pec4	82,0%	0,57
Pec5	94,6%	3,65
Pro1	87,8%	1,12
Pro2	96,2%	0,89
Pro3	93,7%	1,34
Pro4	91,5%	1,97
Pro5	93,3%	4,77
Glu1	85,8%	1,33
Glu2	79,6%	0,81
Glu3	90,3%	0,65

Xyl1	79,4%	1,29
Xyl2	91,3%	1,17
Xyl3	86,1%	1,16
Xyl4	77,0%	0,92
Xyl5	90,1%	0,41
Xyl6	89,6%	2,05

Tabla 3

Combinaciones de enzimas	Torta húmeda	Des. Estándar
Xyl4	87,4%	0,23
Xyl4 + Glu1	83,1%	0,26
Xyl4 + Pec3	86,7%	0,63
Xyl4 + Man3	82,7%	0,30
Xyl4 + Cel2	88,3%	0,05
Xyl4 + Pro1	87,4%	0,58
Xyl4 +Glu1 + Prot1	78,5%	0,07
Xyl4+ Pec3 + Prot1	82,6%	0,20
Xyl4+ Man3 + Prot 1	82,5%	0,13
Xyl4 + Cel2 + Prot1	82,7%	0,19
Xyl4 + Pec3 +Man3	82,7%	0,19
Xyl4 + Cel2 + Man3	83,2%	0,11
Xyl4 + Cel2 + Pec3	82,6%	0,13
Xyl4 + Pec3 + Glu1	81,4%	0,04

Ejemplo 2

Reducción de fibras en los DDGS después de tratamiento enzimático medida por determinación de ADF y NDF

Las fibras detergente ácido (ADF) y fibras detergente neutro (NDF) son fibras dietéticas y pueden ser solubles e insolubles. Las ADF contienen lignina y celulosa, las NDF contienen ADF y hemicelulosas. Las fibras solubles son responsables de los efectos de viscosidad en el procedimiento de digestión y responsables de la menor energía y absorción de proteínas (efecto jaula). Los valores reducidos de ADF/NDF conducen a una mejor digestión dentro del intestino debido a la menor viscosidad coincidente con mejor liberación de proteína y energía.

Se usó como sustrato macerado (10% en peso de sólidos secos, pH=4,0) de la fermentación de etanol con molienda seca convencional.

Se puso una parte alícuota (50 ml) de macerado en un tubo de centrífuga y se calentó a 37ºC. La cantidad total de enzima añadida estaba en el intervalo de 100 ppm a 400 ppm, la mezcla se agitó suavemente durante 6 horas en un agitador rotatorio. Después de inactivación enzimática térmica (1 hora a 80ºC) la vinaza entera se secó y molió. Se analizó en la vinaza seca la ADF/NDF de acuerdo con los protocolos de VDLUFA Bd. III, 6.5.2. (Method book III "The chemical analysis of feedstuff' de VDLUFA 1ª-7ª entregas de suplementos)

Los resultados se muestran en la figura 4 a 7. La figura 4 muestra el resultado de añadir una composición de enzimas que comprende beta-1,3-glucanasa como la actividad principal (Rohalase BX, AB Enzymes). Los

parámetros medidos son las fibras detergente neutro (NDF) y las fibras detergente ácido (ADF). La dosis de enzima era 200 g/t de macerado. Estos resultados muestran claramente que la enzima beta-1,3-glucanasa reduce los valores de ADF y NDF en 9% y 10,6%.

La figura 5 muestra el efecto de una composición de enzimas que comprende una xilanasa como la actividad principal (Xilanasa 2 XP Conc, Dyadic) aplicada en dos concentraciones de 100 y 200 g/t de macerado. La xilanasa reduce el contenido de fibra de los DDGS lo cual puede verse en la clara reducción de las ADF y NDF. Con una dosis de enzimas de 100 g/t la concentración de NDF se reduce solo en 1,2% mientras que la reducción era de 17,3% para una dosis de 200 g/t.

La figura 6 muestra el efecto de una composición de enzimas que comprende como actividades principales actividad de xilanasa y 1,3-beta-glucanasa, añadida en concentraciones de 200 g/t de macerado cada una.

En comparación con la fig. 5 donde la xilanasa usada en una concentración de solo 100 g/t mostró solo un efecto mínimo en la reducción de fibras, la combinación de xilanasa y 1,3-beta-glucanasa tiene un efecto mayor. El valor de ADF se reduce en 2,8% y el valor de NDF en 8,2%.

La figura 7 muestra la reducción de ADF/NDF de la combinación de xilanasa y 1,3-beta-glucanasa en dos combinaciones, cada una con enzimas adicionales. Una composición de enzimas que comprende además actividad de pectinasa (Rohapect Classic, AB Enzymes) muestra una reducción adicional de NDF (5,8%) pero la enzima anula el efecto para las ADF. La aplicación adicional de proteasas (Protease A, Amano Japón) afecta a la reducción positiva de ADF y NDF. El valor de NDF se reduce de nuevo en 3,2%.

Ejemplo 3

Mejora del desaceitado

El contenido de aceite de los DDGS a veces es mayor de lo deseado y se buscan métodos para recuperar más aceite como un subproducto separado para usar en la producción de biodiesel y otros productos biorrenovables. La mayor parte del trabajo en la recuperación de aceite de procedimientos de fermentación se ha centrado en mejorar la capacidad de extracción del aceite de la vinaza entera. Como se ha mencionado en la memoria descriptiva, un mejor desaceitado conduce a una mejor separación del aceite dentro del procedimiento de ETOH. La producción de aceite de maíz es un subproducto con alto valor para la industria alimentaria y de piensos, también para la producción de biodiésel.

Después de la reacción de una composición de enzimas que comprende como actividades principales actividad de xilanasa (200 ppm, Xylanase 2 XP Conc, Dyadic) y 1,3-beta-glucanasa (200 ppm, Rohalase BX, AB Enzymes), seguido de centrifugación (condiciones: 3000 rpm durante 10 min) de la vinaza entera, se observó una separación del aceite mejorada en la vinaza fina. Las figuras 8 y 9 muestran los resultados de las vinazas finas después de centrifugación. La vinaza fina donde el macerado se trató con la composición de enzimas que comprende como actividades principales actividad de xilanasa y 1,3-glucanasa (fig. 9) muestra una capa de aceite mucho mayor en el líquido sobrenadante en comparación con la vinaza fina donde el macerado no se trató con enzimas (fig. 8). La fig. 8 muestra que no se ha ajustado separación de aceite. La fig. 9 muestra que se puede observar una clara separación de aceite que forma una capa de aceite espesa.

Ejemplo 4

Ensayos de alimentación

Con el siguiente ensayo en animales se mostró que se pueden cambiar los ingredientes de piensos caros, como la harina de soja, maíz o trigo, por DDGS, en especial DDGS que es modificado durante los procedimientos de producción y métodos de acuerdo con la presente descripción, y no produce ganancias de peso inferiores. El objetivo era mostrar que los DDGS tratados pueden sustituir la harina de soja y trigo sin efectos negativos en el crecimiento animal.

- Codornices como animales de ensayo alimentadas desde el día 1 - día 23

- Repeticiones de 10 jaulas con 2 animales para cada tratamiento

- Inclusión de DDGS en el pienso 20%

- El control positivo era dieta con trigo y harina de soja estándar sin DDGS

- Todas las relaciones de piensos se equilibraron para ser isonitrogenadas (cada pienso contiene la misma cantidad de CP) e isocalóricas (cada pienso contiene la misma cantidad de energía metabolizada)

- Grupos de 3 animales con pienso normal, DDGS no tratados y DDGS optimizados enzimáticamente

- Parámetros de rendimiento: ganancia de peso, relación de conversión de pienso

Para los ensayos, se produjeron dos tipos diferentes de DDGS:

a) DDGS que resultan de un tratamiento del mosto fermentado en la producción de etanol de A) de la presente descripción con una composición de enzimas que comprende una xilanasa (200 ppm, Xylanase 2 XP Conc, Dyadic) y una 1,3-glucanasa (200 ppm, Rohalase BX, AB Enzymes) (DDGS-tratados)

b) DDGS producidos sin un tratamiento enzimático del mosto fermentado (DDGS-blanco).

Como un control positivo se usó pienso para codornices estándar. La figura 10 muestra los resultados y la ganancia de peso de las codornices alimentadas con diferentes piensos. En la fase inicial (día 0-14) el pienso normal conduce a la mayor ganancia de peso. En la fase de crecimiento, el pienso con 20% de DDGS-tratados, condujo a la mayor ganancia de peso y superó a los otros dos piensos. Basándose en los datos del ensayo con animales, el pienso que contiene DDGS-tratados muestra que es claramente superior. Los DDGS-tratados se pueden incluir en el pienso de codornices en una concentración de 20% sin efectos negativos en el rendimiento del crecimiento.

Ejemplo 5

Deshidratación de la vinaza entera

Como se ha mencionado antes en la memoria descriptiva, una mejor deshidratación de la vinaza entera da como resultado una torta húmeda con una masa seca mayor. La ventaja aquí es el menor consumo de energía durante el secado.

Para este ejemplo, se ensayó y determinó la capacidad de deshidratación de la vinaza entera durante la centrifugación. Se ensayaron dos configuraciones diferentes. En el primer ensayo el macerado después de fermentación no se trató con enzimas (DDGS blanco), en el segundo ensayo el macerado se trató con la composición de enzimas que comprendía una xilanasa (200 ppm) y una 1,3-glucanasa (200 ppm) después de la fermentación (DDGS tratados).

Los ensayos se llevaron a cabo en una escala 301. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado. La concentración de enzimas total añadida era 400 g/t de macerado. Después de la destilación el fermentador se drenó y la vinaza entera se centrifugó para obtener la vinaza fina y la torta húmeda.

Fermentación de maíz a etanol 301 con aplicación de enzima y producción de DDGS:

- maíz premolido < 2 mm de tamaño de partículas

- se mezclaron 10 kg de maíz con agua corriente a 35ºC para alcanzar una concentración de ~32% (p/p)

- el intervalo de pH era 5,6-6,0

- la temperatura se aumentó a 90ºC

- se añadieron 7 ml de alfa-amilasa (Liquozyme de Novozymes)

- se añadió 1‰ de antiespumante (30 ml)

- incubación durante 90 min a 90ºC y 150 rpm

- se añadieron 12 ml de glucoamilasa (Novozymes Spirizyme Ultra)

- adición de 300 ppm de ((NH4)2SO4) como fuente de nitrógeno

- inoculación directa de levaduras secas

- ajuste del pH a 5,5

- fermentación durante 62 h a 33ºC y 150 rpm para obtener el macerado

- después el macerado se trata con enzimas durante 6 horas a 37ºC

- después de 68 horas se separa el etanol por destilación obteniéndose un residuo llamado vinaza entera

- después la vinaza entera se centrifuga a 3000 rpm dando la vinaza densa y vinaza fina

- concentración de la vinaza fina a 50% de DM por evaporación - La torta húmeda se mezcla con la vinaza fina y se seca en un secador de tambor a aproximadamente 120ºC hasta 90% de materia seca.

La figura 11 muestra la cantidad de vinaza fina (líquido sobrenadante) en % de la vinaza entera, separada después de centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Aquí se mostró que un tratamiento con la composición de enzimas que comprende una xilanasa y una 1,3-glucanasa aumenta la capacidad de deshidratación en 18,7%.

Ejemplo 6

Digestibilidad de DDGS in vitro

Los ensayos de digestibilidad in vitro (simulando la digestión en animales) son bien aceptados para predecir la digestibilidad de piensos.

Se ensayaron dos configuraciones diferentes. En el primer ensayo el macerado después de fermentación no se trató con enzimas (DDGS blanco), para el segundo ensayo el macerado se trató con la composición de enzimas que comprendía una xilanasa (200 ppm) y una 1,3-glucanasa (200 ppm) después de la fermentación (DDGS tratados).

A continuación se describe el ensayo de digestibilidad de proteínas in vitro:

Se digieren muestras de DDGS con una solución de pepsina/HCl: HCl 0,1 M con pepsina 20 mg/ml. (Pepsina de mucosa gástrica porcina, en polvo, 400-800 unidades/mg de proteína, Sigma: P7125). El líquido sobrenadante se usa para la determinación de los grupos amino libres por el ensayo de TNBS.

Digestión de proteínas:

- Se mezclan 0,5 g de DDGS con 8 ml de HCl 0,1 M con pepsina 20 mg/ml.

- Después de mezclar con un Vortexer las muestras se incuban durante 60 min a 40ºC

- Después de 60 min, la muestra se centrifuga durante 20 min a 4000 rpm.

- Después de la centrifugación se mide la proteína en el líquido sobrenadante

Determinación de proteínas con ensayo de TNBS:

El ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBSA o TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico) es un reactivo de ensayo rápido y sensible para la determinación de grupos amino libres. Las aminas primarias, tras la reacción con el TNBSA, forman un derivado muy cromogénico, que se puede medir a 335 nm (véase la figura). También se han obtenido mediciones cualitativas de aminas, sulfhidrilos o hidrazidas, 3 y mediciones cuantitativas de grupos amino libres de la L-lisina usando TNBSA.

Preparación de tampones

Nº	Componente
1	SDS al 1%
2	HCl 0,1 M
3	TNBS al 0,025% en Fosfato-Na 87,5 mM pH 8,2
4	solución madre de glicina 100 en SDS al 1%

Muestreo (en placa de 96 pocillos):

1. Para la curva de referencia

Glicina inicial 2500 μM, diluida 2x en SDS al 1%

Fila de glicina
2500
1250
625
312,5
156,25
78,125
39,0625
0

2. Muestras, (diluidas 1000x) con SDS al 1%

Reacción (placa de PCR de 96 pocillos):

1. 15 µl de la fila de glicina o muestras + 90 µl del tampón nº 3 (véase la lista de tampones)

2. La placa de PCR se incuba en un ciclador de PCR, programa:

- 50ºC durante 30 min

- 4ºC durante 10 min

3. Se saca del ciclador de PCR, se mezcla adecuadamente

Medición:

Se mezclan 50 µl de la etapa 3 anterior con 50 µl del tampón nº 2 (véase la lista de tampones), se mide la absorción a 340 nm

Se ensayaron dos configuraciones diferentes. En el primer ensayo el macerado después de fermentación no se trató con enzimas (DDGS blanco), para el segundo ensayo el macerado se trató con la composición de enzimas que comprendía una xilanasa y una 1,3-glucanasa como actividades principales después de la fermentación (DDGS tratados).

Los DDGS tratados con enzima se produjeron con una composición de enzimas que comprendía una xilanasa y una 1,3-glucanasa como actividades principales con una concentración total de 400 g/t de macerado. La figura 12 muestra los resultados.

La figura 12 muestra la liberación de los grupos amino libres con diferentes sustratos. Los DDGS-tratados muestran una mayor concentración de grupos amino libre en 20,4%, determinado por el ensayo de TNBS

Por lo tanto, se puede mostrar claramente que comparado con los DDGS-blanco la digestibilidad de proteínas con pepsina/HCl aumenta para los DDGS-tratados. Esto da como resultado una mejora de la calidad nutricional de los DDGS como subproducto del procedimiento de fermentación y por lo tanto es un pienso animal de alta calidad.

Ejemplo 7

Solubilización de proteínas en agua

Se ensayaron dos configuraciones diferentes. En el primer ensayo el macerado después de fermentación no se trató con enzimas (DDGS blanco), para el segundo ensayo el macerado se trató con la composición de enzimas que comprendía una xilanasa (200 ppm) y una 1,3-glucanasa (200 ppm) después de la fermentación (DDGS tratados).

Para este ensayo se mezclaron 0,5 g de DDGS con 8 ml de agua destilada y se agitaron con un Vortexer. La solución se incubó durante 60 min a 40ºC. Después de una etapa de centrifugación (20 min, 4000 rpm, 4ºC) se analizó la concentración de proteínas en el líquido sobrenadante con el ensayo de TNBS (véase el ejemplo 6).

En la figura 13 se muestra la liberación de grupos amino libre de DDGS en agua. Los DDGS-tratados muestran un aumento de los grupos amino libres de 31,4%. La estructura de fibras del DDGS cambia y también son alteradas las paredes celulares de levaduras produciendo una mayor disponibilidad de proteínas que pueden ser digeridas fácilmente en el animal.

Este da como resultado una mejora de la calidad nutricional de los DDGS como subproducto de un procedimiento de fermentación y por lo tanto un pienso animal de alta calidad.

Algunas realizaciones de la presente descripción se refieren a:

A) Métodos para mejorar la calidad de los subproductos o residuos derivados de mosto fermentado que comprenden las etapas de: i) someter el mosto fermentado durante o después de la fermentación a una composición que comprende una enzima o una mezcla de enzimas capaces de degradar uno o más componentes del mosto fermentado, ii) separar el producto de fermentación deseado, en donde

- el mosto fermentado puede derivar de un procedimiento de producción de un producto de fermentación líquido.

- el mosto fermentado puede derivar de un procedimiento de producción de un producto de fermentación que usa material que contiene azúcar como materia prima.

- el mosto fermentado puede derivar de un procedimiento de producción de un producto de fermentación que usa

material que contiene almidón como materia prima.

- la materia prima puede ser un cereal.

- la materia prima se puede seleccionar del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, triticale, mandioca, sorgo, centeno, patata o cualquier combinación de los mismos.

- el producto de fermentación líquido puede ser un alcohol, preferiblemente etanol.

- la composición puede comprender una enzima seleccionada del grupo que consiste en amilasa, tal como alfa-amilasa, glucoamilasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa, tal como xilanasa, pectinasa, mananasa y proteasa, o una mezcla de las mismas.

- la composición puede comprender una mananasa.

- la composición puede comprender una mananasa y una beta-glucanasa.

- el producto de fermentación deseado se puede separar por destilación.

B) Métodos para mejorar la calidad nutricional de un subproducto o residuo de un procedimiento de producción de etanol fermentativo, que comprende las siguientes etapas:

i) Fermentación de azúcares fermentables con un microorganismo

ii) Someter el mosto fermentado a una composición que comprende una enzima o una mezcla de enzimas después del procedimiento de fermentación

iii) Separación del etanol

iv) Separación del subproducto o residuo, en donde

- el subproducto o residuo se puede seleccionar del grupo que consiste en granos gastados de cocción, granos secos de destilería, solubles secos de destilería, granos secos de destilería con solubles, residuos de la industria de procesamiento de cereales, salvado de trigo, cáscaras de soja, pulpa de cítricos, pulpa de remolacha, cáscaras o vainas de arroz, bagazo, orujo de manzana, y mezclas de los mismos.

- la etapa iii) y etapa iv) se pueden llevar a cabo simultánea o secuencialmente.

- la composición puede comprender una enzima seleccionada del grupo que consiste en amilasa, tal como alfa-amilasa, glucoamilasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa, tal como xilanasa, pectinasa, mananasa y proteasa, o una mezcla de las mismas.

- la composición puede comprender una mananasa.

- la composición puede comprender una mananasa y una beta-glucanasa.

C) Métodos de deshidratación de la vinaza entera que comprenden las etapas de i) someter el mosto macerado a una o más enzimas capaces de degradar uno o más componentes del mosto macerado, ii) separar el etanol del mosto macerado, iii) separar la vinaza entera en una fracción sólida y una fracción líquida.

D) Métodos de producción de etanol, comprendiendo dicho método las etapas de:

i) Fermentación de azúcares fermentables con un microorganismo para producir etanol

ii) Someter el mosto fermentado a una composición que comprende una enzima o una mezcla de enzimas después del procedimiento de fermentación

iii) Separación del etanol, en donde

- el mosto fermentado se puede someter a la composición de enzimas después de la etapa de fermentación y antes de la etapa de separación.

- la etapa de separación puede ser destilación.

- la composición puede comprender una enzima seleccionada del grupo que consiste en amilasa, tal como alfa-amilasa, glucoamilasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa, tal como xilanasa, pectinasa, mananasa y proteasa, o una mezcla de las mismas.

- la composición pude comprender una mananasa.

- la composición puede comprender una mananasa y una beta-glucanasa.

E) Métodos para mejorar la calidad y composición nutricional de los subproductos o residuos derivados de azúcares fermentables en un procedimiento de producción de etanol, que comprenden las etapas de: i) someter el mosto fermentado a una composición que comprende una enzima o una mezcla de enzimas capaces de degradar uno o más componentes del mosto fermentado, ii) separar el etanol y los subproductos o residuos, en donde

- el mosto fermentado se puede someter a la composición de enzimas después de la etapa de fermentación y antes de la etapa de separación.

- la etapa de separación puede ser destilación.

- la composición puede comprender una enzima seleccionada del grupo que consiste en amilasa, tal como alfa-amilasa, glucoamilasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa, tal como xilanasa, pectinasa, mananasa y proteasa, o una mezcla de las mismas.

- la composición pude comprender una mananasa.

- la composición puede comprender una mananasa y una beta-glucanasa.

- la fermentación se puede llevar a cabo usando un microorganismo, tales como bacterias, levaduras u hongos.

F) Métodos de deshidratación de la vinaza entera que comprenden uno de los métodos mencionados antes y las etapas de i) someter la vinaza entera a una o más enzimas capaces de degradar uno o más componentes de la vinaza entera, ii) separar el material en una fracción sólida y una fracción líquida.

G) Uso de una hemicelulasa para la degradación de los componentes del mosto fermentado en un procedimiento de producción fermentativo.

H) Uso de xilanasa, amilasa, glucoamilasa, celulasa, hemicelulasa, pectinasa o proteasa, o una mezcla de las mismas, para la degradación de los componentes del mosto fermentado en un procedimiento de producción fermentativo.

I) Métodos para la fabricación de una composición de enzimas usada para tratar el mosto fermentado en un procedimiento de producción fermentativo para mejorar la calidad nutricional de un subproducto o residuo y/o la eficacia de procedimiento, del procedimiento de producción, que comprenden:

a) inocular en el subproducto o residuo al menos un hongo filamentoso;

b) fermentar el subproducto o residuo; y

c) separar al menos una enzima del subproducto o residuo fermentado, en donde

- el hongo filamentoso se puede seleccionar del grupo que consiste en Rhizopus, Aspergillus, Trichoderma, y cualquier combinación de los mismos.

- el subproducto o residuo puede ser un subproducto fibroso seleccionado del grupo que consiste en granos gastados de cocción, granos secos de destilería, soluble seco de destilería, granos secos de destilería con solubles, granos húmedos, y mezclas de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la calidad nutricional de subproductos o residuos derivados de material que contiene almidón en un procedimiento para producir etanol, que comprende las etapas de: i) someter el mosto fermentado después de la fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa y una xilanasa, ii) separar el producto de fermentación deseado por destilación.

2. El método según la reivindicación 1, en donde la composición de enzimas comprende además una 1,6-beta-glucanasa.

3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el subproducto o residuo es un subproducto fibroso seleccionado del grupo que consiste en granos gastados de cocción, granos secos de destilería, soluble seco de destilería, granos secos de destilería con solubles, granos húmedos y mezclas de los mismos.

4. El método según la reivindicación 1, en donde el mosto fermentado deriva de un procedimiento de producción de un producto de fermentación que usa grano entero obtenido de cereales como materia prima, el producto de fermentación es etanol, el etanol se separa por destilación y el subproducto mejorado son granos secos de destilería con solubles (DDGS).

5. Un método de producción de etanol a partir de material que contiene almidón, comprendiendo dicho método las etapas de:

i) Convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables

ii) Fermentación de los azúcares fermentables con un microorganismo en un mosto fermentado

iii) Someter el mosto fermentado después del procedimiento de fermentación a una composición de enzimas que comprende una beta-1,3-glucanasa y una xilanasa, o una beta-1,3-glucanasa, una xilanasa y una 1,6-beta-glucanasa

iv) Separación del etanol en el mosto fermentado por destilación

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el material que contiene almidón se obtiene de cereales y/o tubérculos.

FIGURA 1

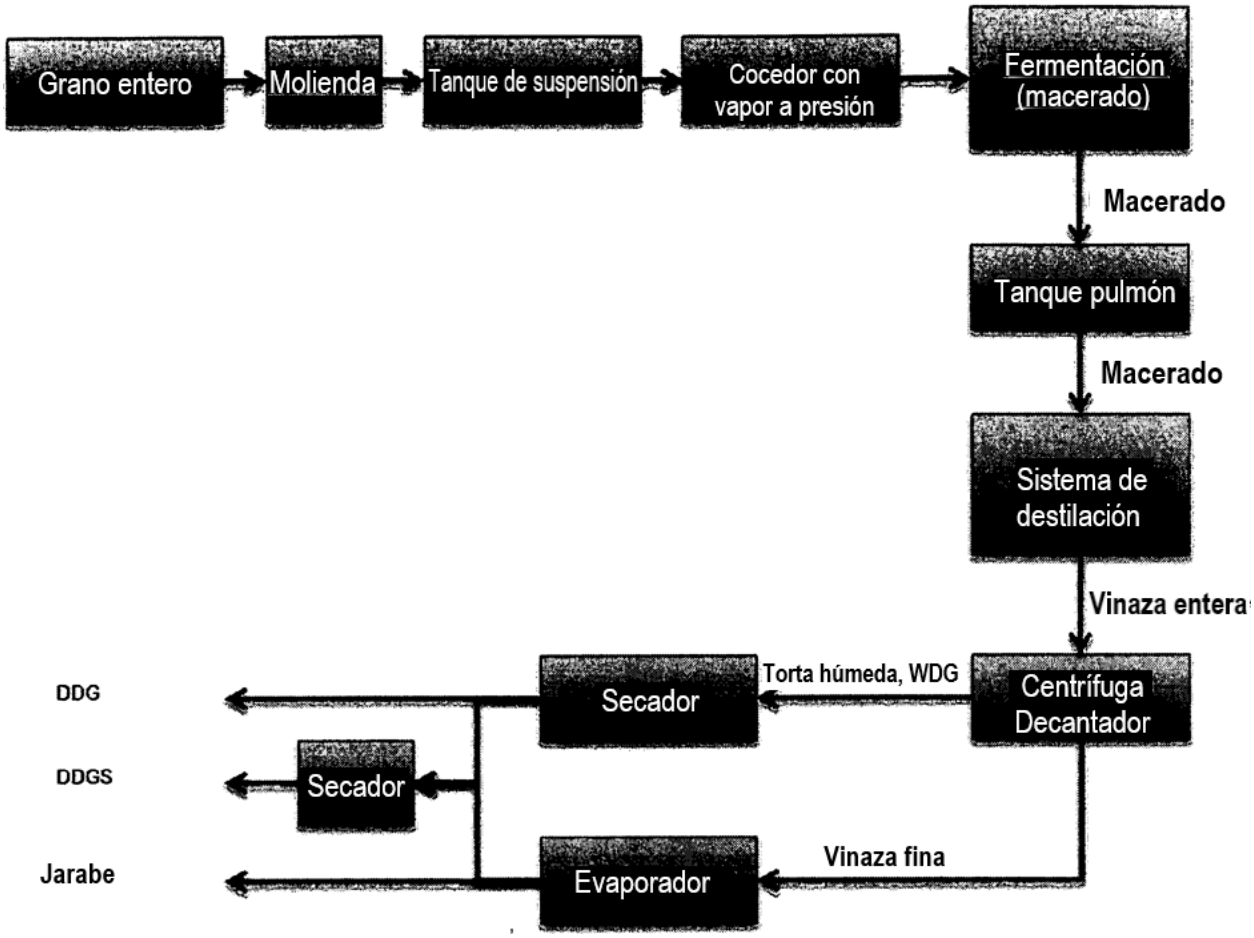

Grano entero
Molienda
Tanque de suspensión
Cocedor con vapor a presión
Fermentación (macerado)
Macerado
Tanque pulmón
Macerado
Sistema de destilación
Vinaza entera
Centrífuga Decantador
Torta húmeda, WDG
Secador
DDG
DDGS
Secador
Jarabe
Evaporador
Vinaza fina

FIGURA 2

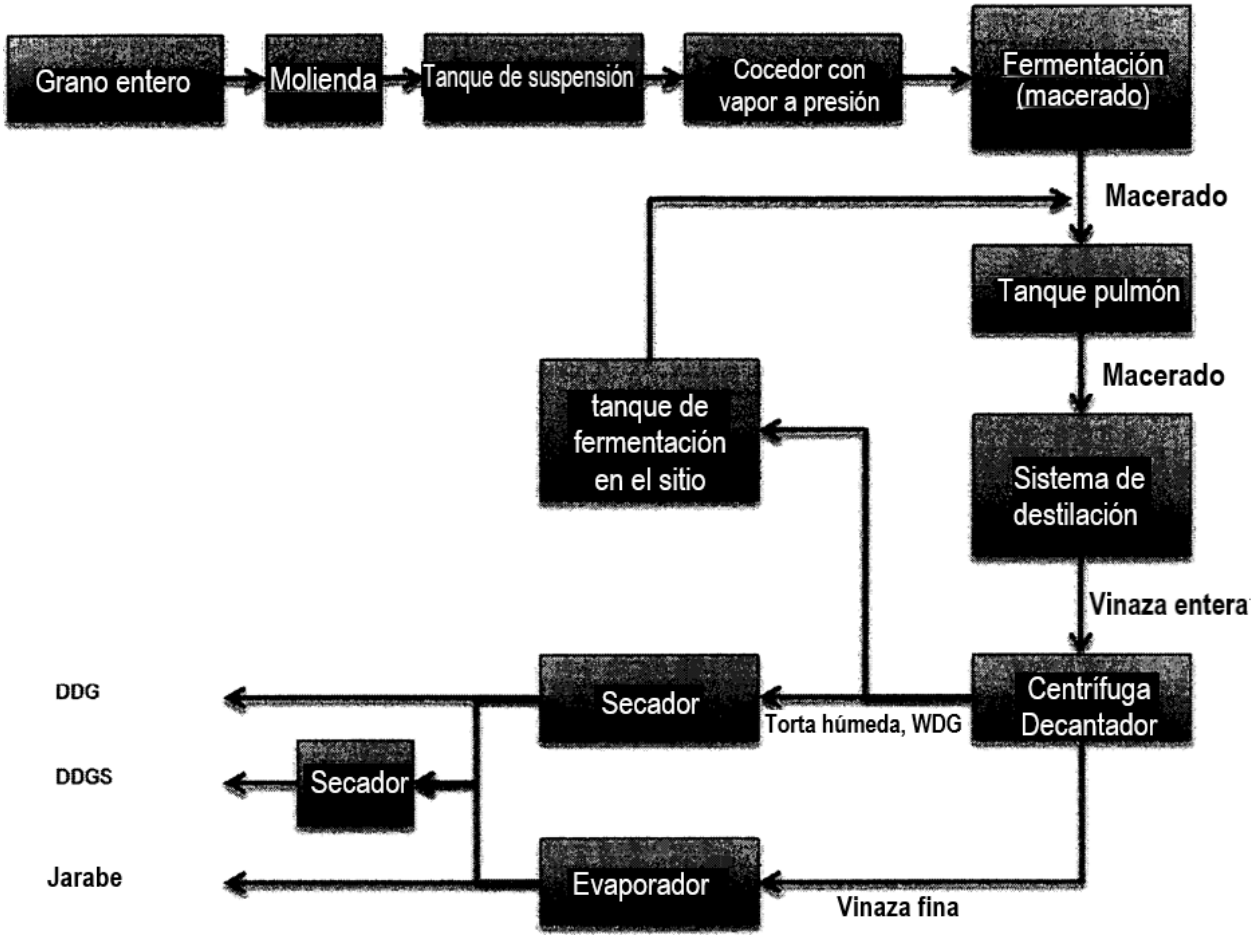

Grano entero
Molienda
Tanque de suspensión
Cocedor con vapor a presión
Fermentación (macerado)
Macerado
Tanque pulmón
Macerado
tanque de fermentación en el sitio
Sistema de destilación
Vinaza entera
DDG
Secador
Torta húmeda, WDG
Centrífuga Decantador
DDGS
Secador
Jarabe
Evaporador
Vinaza fina

FIGURA 3

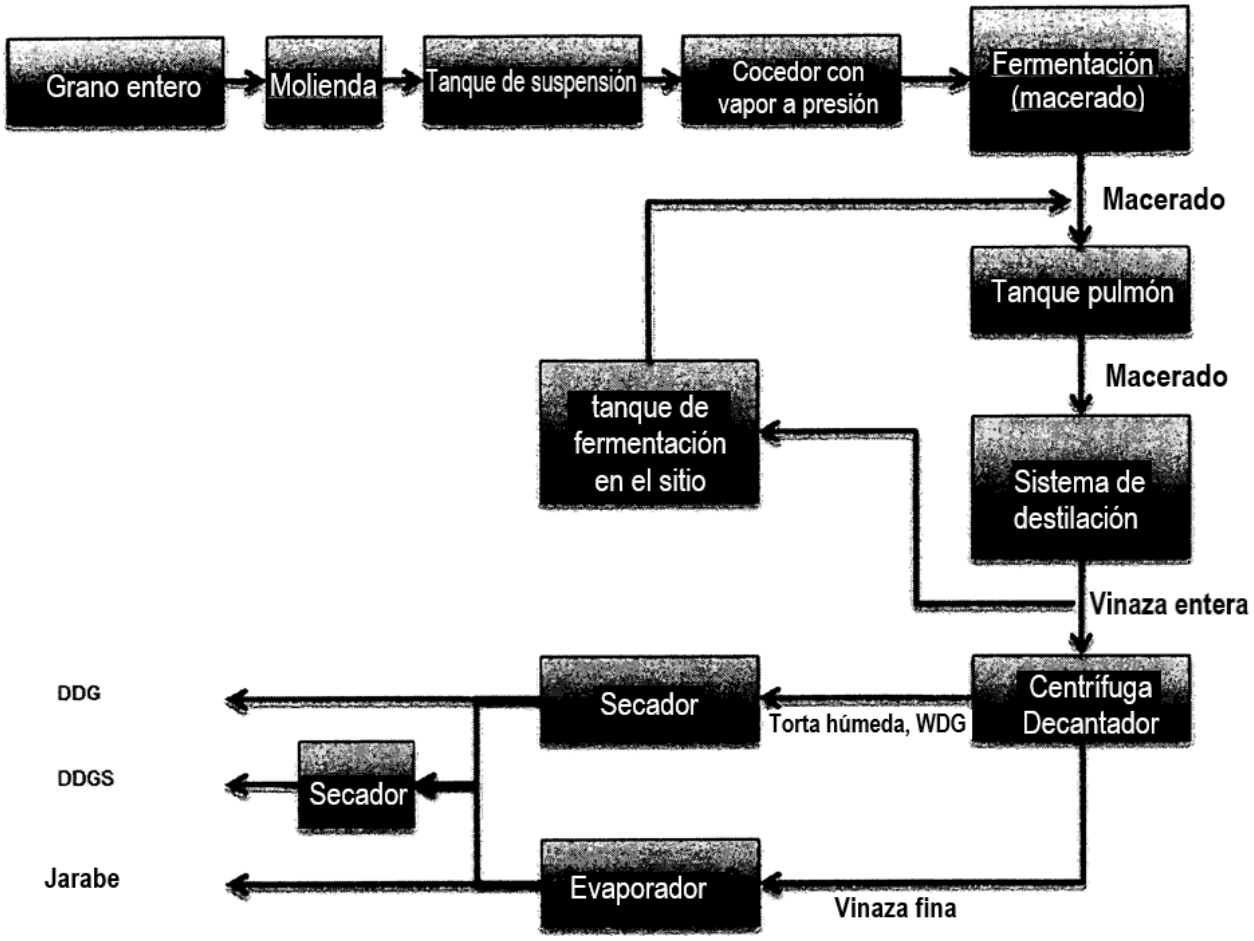

Grano entero
Molienda
Tanque de suspensión
Cocedor con vapor a presión
Fermentación (macerado)
Macerado
Tanque pulmón
Macerado
tanque de fermentación en el sitio
Sistema de destilación
Vinaza entera
DDG
Secador
Torta húmeda, WDG
Centrífuga Decantador
DDGS
Secador
Jarabe
Evaporador
Vinaza fina

FIGURA 4

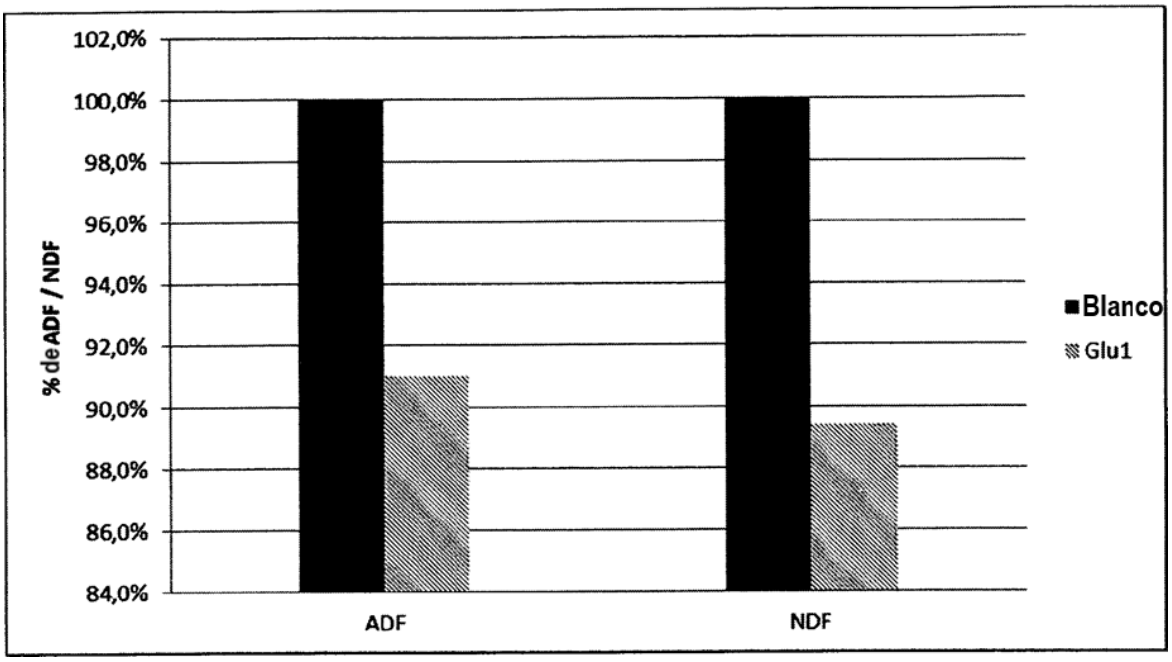

102,0%
100,0%
98,0%
96,0%
94,0%
92,0%
90,0%
88,0%
86,0%
84,0%
% de ADF / NDF
ADF
NDF
Blanco
Glu1

FIGURA 5

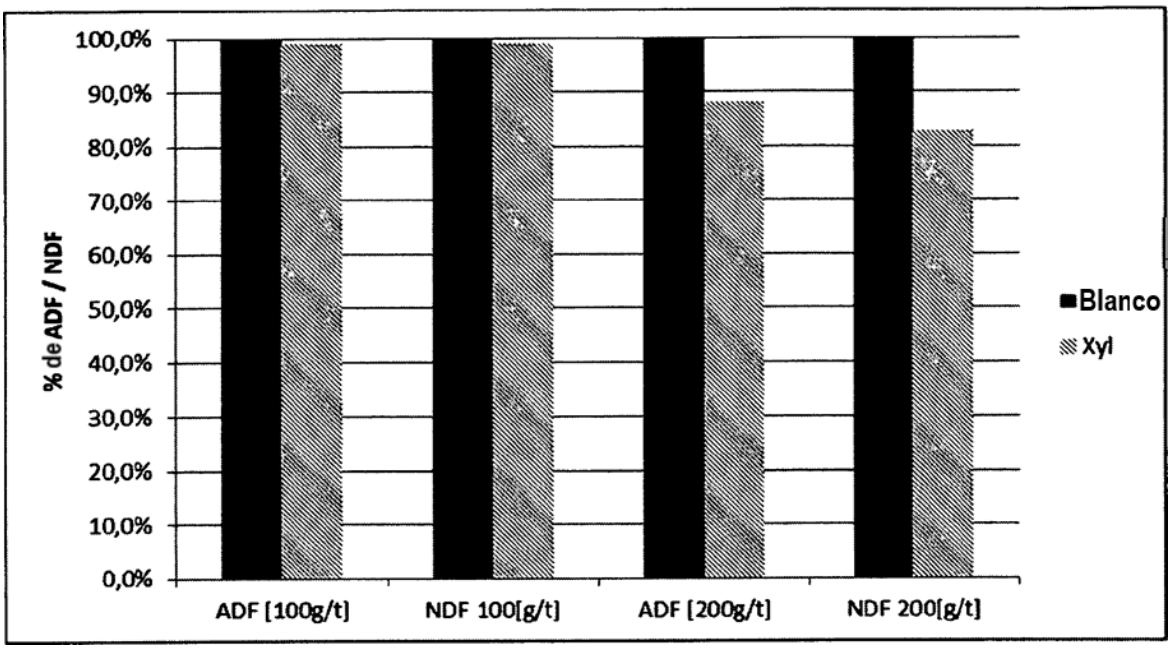

100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
% de ADF / NDF
ADF [100g/t]
NDF 100[g/t]
ADF [200g/t]
NDF 200[g/t]
Blanco
Xyl

FIGURA 6

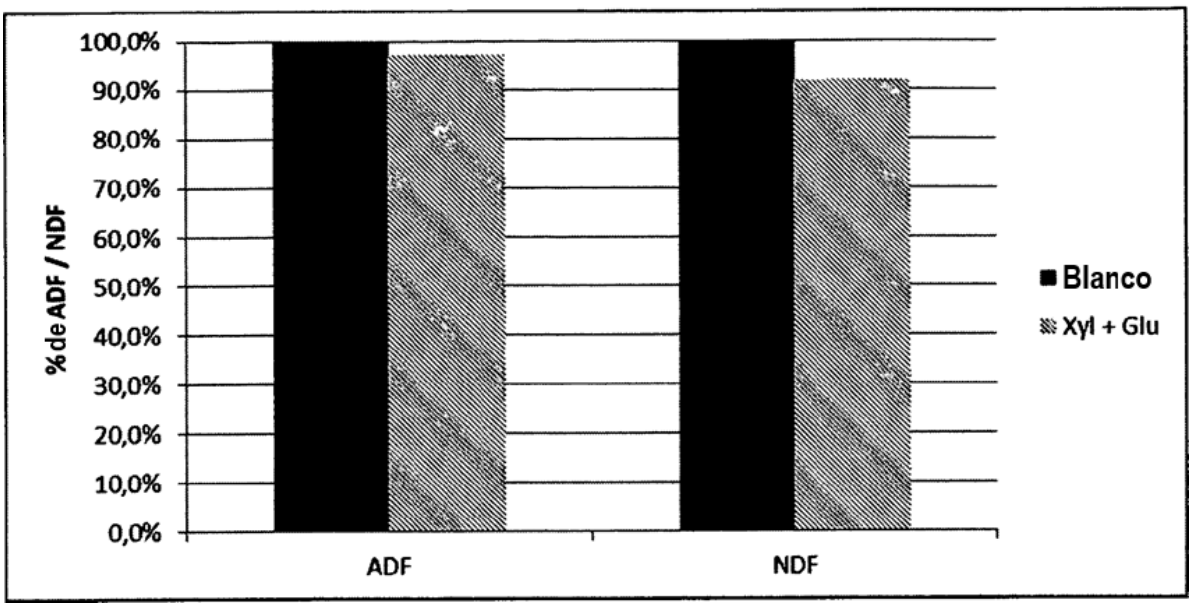

100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
% de ADF / NDF
ADF
NDF
Blanco
Xyl + Glu

FIGURA 7

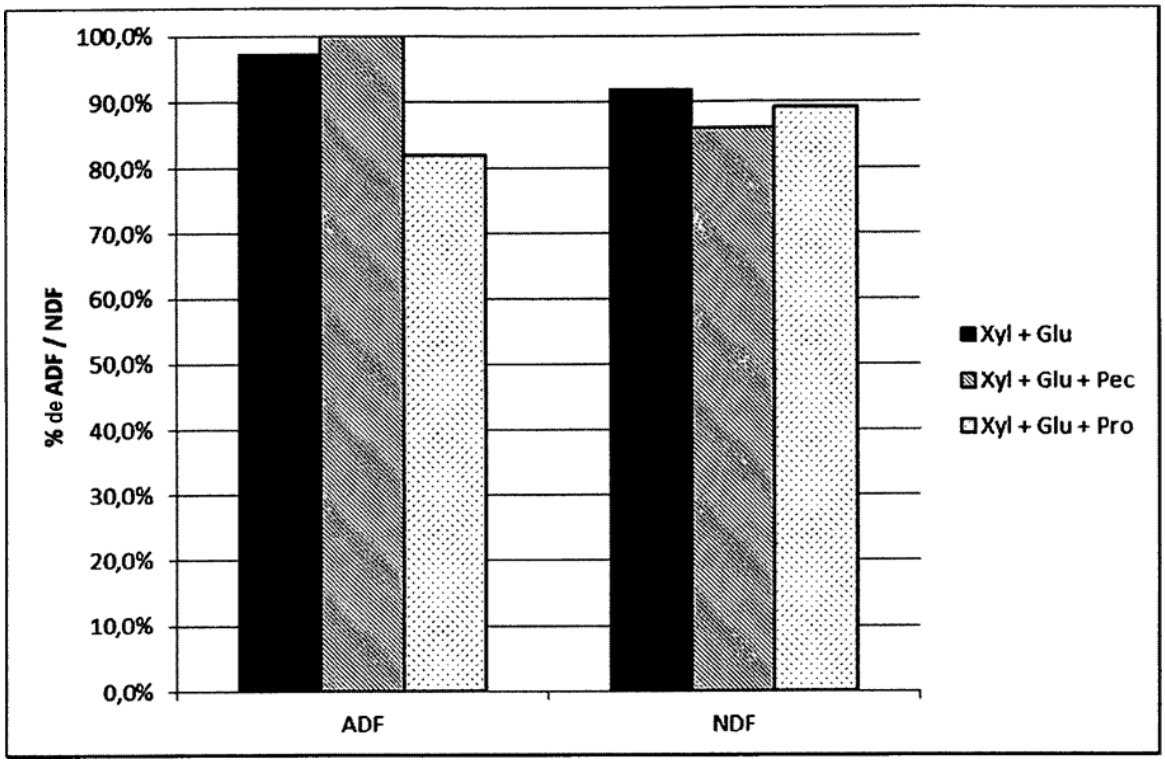

100,0%
90,0%
80,0%
70,0%
60,0%
50,0%
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
% de ADF / NDF
ADF
NDF
Xyl + Glu
Xyl + Glu + Pec
Xyl + Glu + Pro

FIGURA 8

FIGURA 9

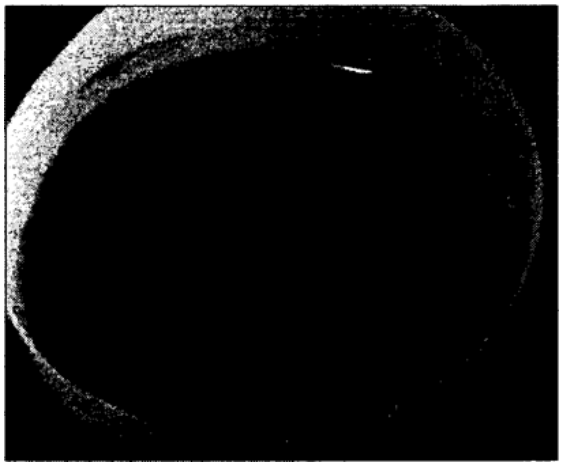


FIGURA 10

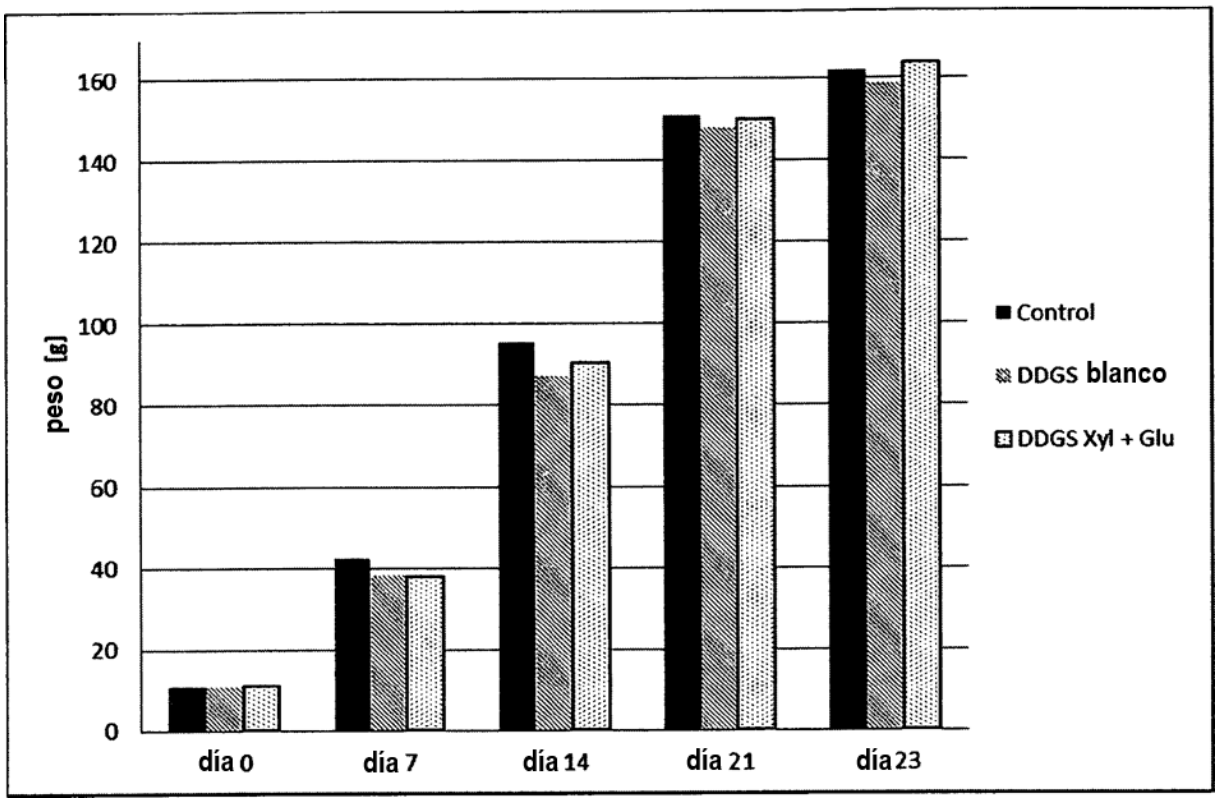

peso [g]
160
140
120
100
80
60
40
20
0
día 0
día 7
día 14
día 21
día 23
Control
DDGS blanco
DDGS Xyl + Glu

FIGURA 11

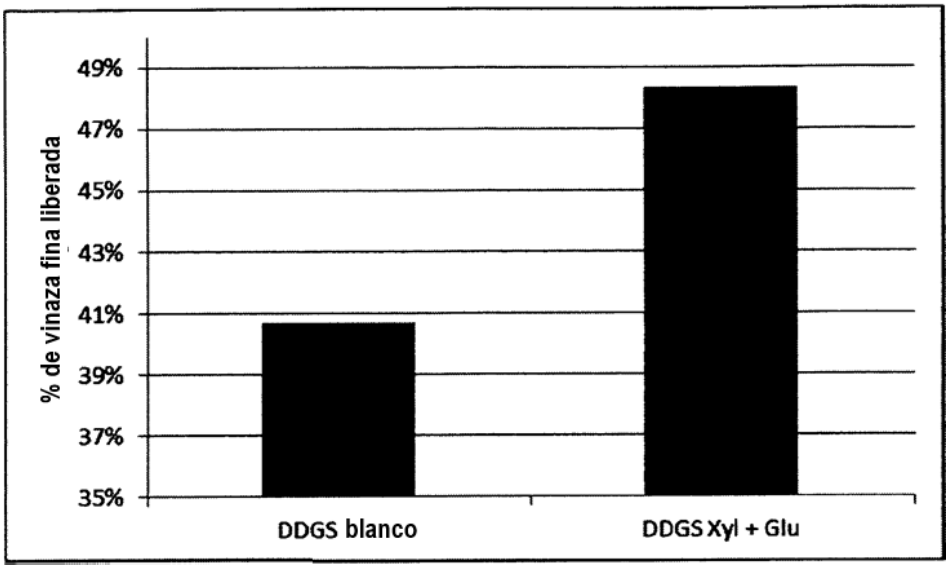

% de vinaza fina liberada
49%
47%
45%
43%
41%
39%
37%
35%
DDGS blanco
DDGS Xyl + Glu

FIGURA 12

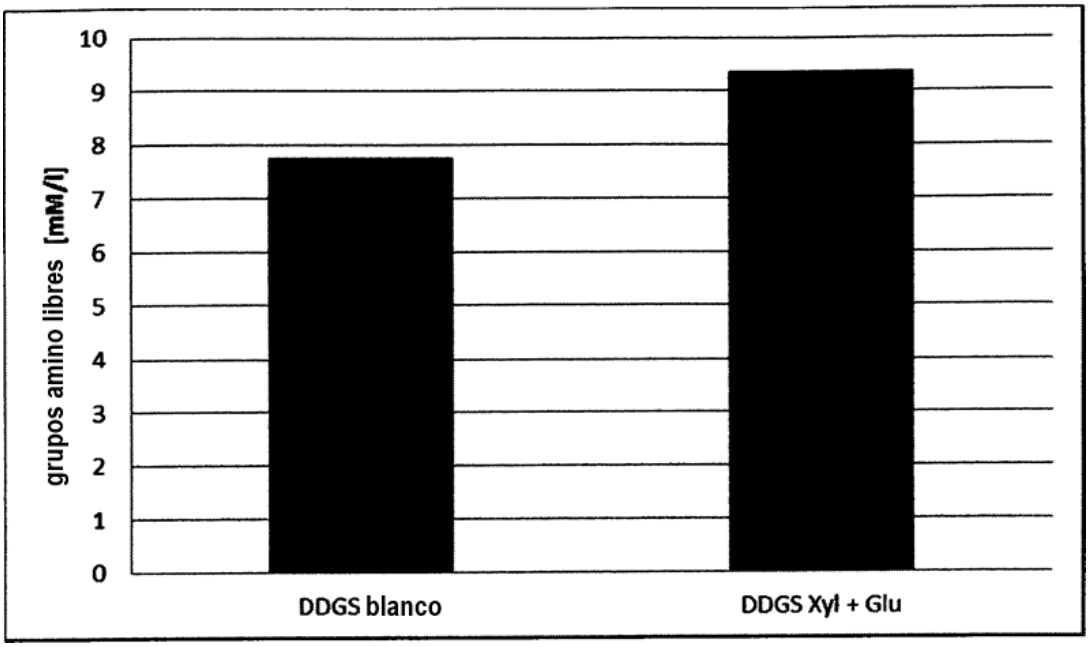
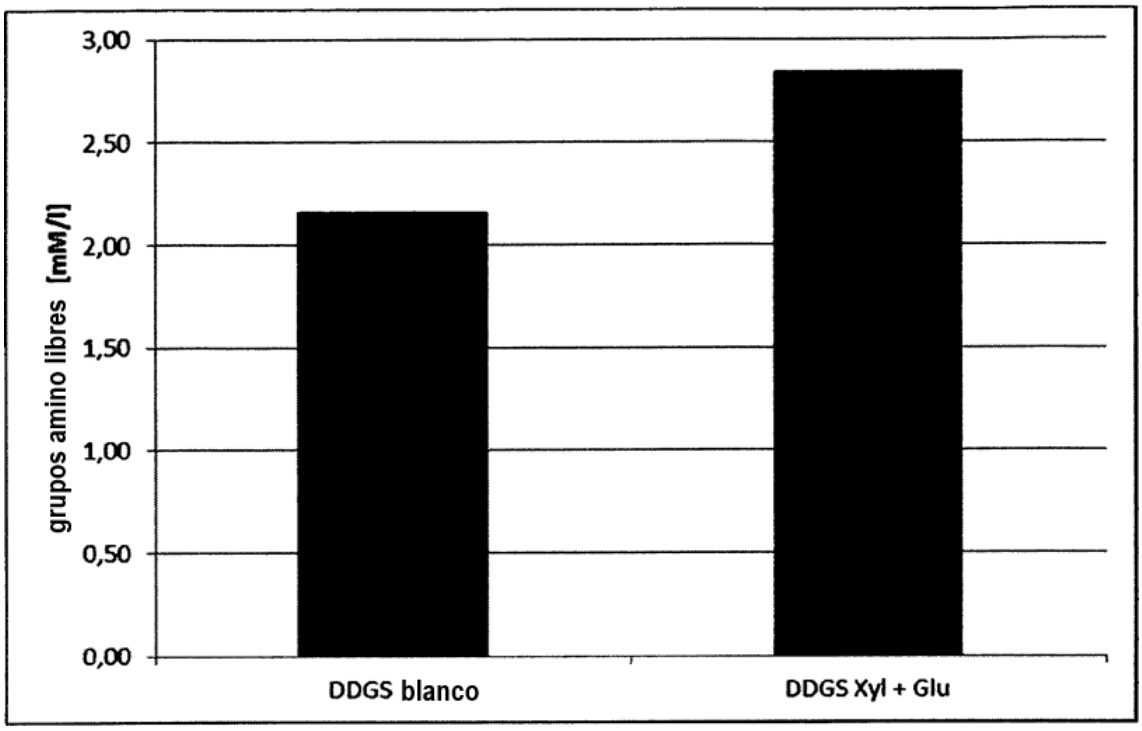

grupos amino libres [mM/l]
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
DDGS blanco
DDGS Xyl + Glu

FIGURA 13


3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
grupos amino libres [mM/l]
DDGS blanco
DDGS Xyl + Glu