(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 751 408**

(51) Int. CI.:

C12N 9/24 (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)
C12P 7/08 (2006.01)
C12P 7/40 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01)
C12P 7/54 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2014 PCT/EP2014/059293**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014 WO14187668**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2014 E 14726092 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2997144**

(54) Título: **Composiciones de enzimas para la mejora de los procesos y subproductos de fermentación**

(30) Prioridad:

18.05.2013 EP 13168397

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2020

(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

(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

Composiciones de enzimas para la mejora de los procesos y subproductos de fermentación

Campo de la descripción

La presente descripción se refiere a nuevas composiciones de enzimas para el uso en procesos de producción de un producto de fermentación, en particular etanol. El uso de la composición de enzimas descrita da como resultado la mejora de la calidad de los subproductos en el proceso de producción fermentativo ya que son capaces de degradar de forma óptima componentes en el mosto fermentado en el proceso de fermentación.

Antecedentes de la descripción

Los productos de fermentación, tales como el etanol, se producen degradando en primer lugar el material que contiene almidón en azúcares fermentables por licuefacción y sacarificación y convirtiendo después los azúcares directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado usando un organismo fermentativo. Los productos de fermentación líquidos tales como el etanol se recuperan del mosto fermentado (a menudo referido como "cerveza" o "mosto de cerveza"), p. ej., por destilación, que separa el producto de fermentación deseado de otros líquidos y/o sólidos. La facción restante, denominada "residuo total de la destilación", se deshidrata y se separa en una fase sólida y una líquida, p. ej., por centrifugación. La fase sólida se conoce como "torta húmeda" (o "granos húmedos" o "WDG") y la fase líquida (sobrenadante) se denomina "residuo ligero de la destilación". La torta húmeda deshidratada se seca para proporcionar "Granos Secos de Destilería" (DDG) usados como nutriente en la alimentación animal. El residuo ligero de la destilación se evapora típicamente para proporcionar condensado y jarabe (o "residuo pesado de la destilación") o, alternativamente, puede reciclarse directamente al tanque de suspensión de sólidos como "contracorriente". El condensado puede bien dirigirse a un metanizador antes de descargarse o puede reciclarse al tanque de suspensión de sólidos. El jarabe que consiste principalmente en dextrinas límite y azúcares no fermentables se puede mezclar en DDG o añadirse a la torta húmeda antes del secado para producir DDGS (Grano Seco de Destilería con Solubles).

Se conoce el uso comercial de los diversos subproductos y residuos derivados de los procesos de fermentación, como el proceso de producción de etanol. Se sabe que los residuos o subproductos de las destilerías, así como los subproductos de cereales y otras manufacturas de la industria alimentaria, tienen cierto valor como fuentes de proteínas y energía para la alimentación animal. Además, el aceite de los subproductos como DDGS puede recuperarse como un subproducto separado para su uso en la producción de biodiésel o se consideran otros productos biorrenovables.

Los subproductos como DDG, DDGS o WDG comprenden proteínas, fibras, grasas y almidón no convertido. Por ejemplo, los DDGS contienen típicamente aproximadamente un 30 % de proteínas. Si bien el contenido de proteína es alto, la composición de aminoácidos no es adecuada para animales monogástricos si se usa como alimentación animal. En general, el procesamiento de DDGS, especialmente el tiempo y la temperatura de secado, están afectando la disponibilidad y digestibilidad de los aminoácidos, especialmente la lisina.

Además, los subproductos son principalmente subproductos fibrosos que comprenden Fibras Crudas (CF), que son carbohidratos estructurales que consisten en celulosa, hemicelulosa y materiales no digeribles como la lignina. Los carbohidratos estructurales no son digeribles en el intestino delgado de los animales. Las fibras se caracterizan y analizan por diferentes métodos y se pueden dividir en fibras crudas (CF), fibras detergentes neutras (NDF) y fibras detergentes ácidas (ADF). La proporción de celulosa y lignina en la fracción de fibras crudas también determina la digestibilidad de las fibras crudas o su solubilidad en el intestino. Las altas concentraciones de celulosa y lignina significan una digestibilidad reducida y viceversa. Las hemicelulosas son capaces de unirse al agua. La parte soluble de las fibras, los polisacáridos distintos del almidón solubles (NSP) no pueden ser digeridos por animales monogástricos como los cerdos y las aves de corral, pero aumentan la viscosidad, debido a su capacidad de unirse al agua, y son una restricción nutricional, ya que pueden causar humedad, excrementos pegajosos y basura húmeda. El efecto antinutricional de los NSP solubles se relaciona principalmente con el aumento de la viscosidad de la digesta. El aumento de la viscosidad está ralentizando la velocidad de paso del alimento y dificulta la captación intestinal de nutrientes y puede dar lugar a una disminución de la captación de alimento. El aumento de la viscosidad a) dificulta la absorción intestinal de nutrientes y puede dar lugar a un efecto negativo en la consistencia de las heces e incluso síntomas de diarrea, b) ralentizando la velocidad de paso del alimento y posiblemente disminuyendo el consumo de alimento. Otro efecto de los NSP es la llamada "Encapsulación de Nutrientes". Los NSP en la pared celular vegetal encapsulan el almidón, proteína, aceite y otros nutrientes dentro de la célula vegetal, que es una barrera impermeable que impide la plena utilización de los nutrientes dentro de la célula.

Además, los NSP solubles son responsables de las 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 proceso de producción. El agua unida o encapsulada en el producto es difícil de eliminar y provoca el uso de temperaturas de secado más altas y también un tiempo de secado más prolongado, lo que afecta adversamente la calidad de los productos sensibles a la temperatura como los aminoácidos. La disponibilidad y digestibilidad de los aminoácidos esenciales en los subproductos se reducen por las altas temperaturas y el largo tiempo de secado durante la

producción. Los ejemplos de NSP son arabinoxilanos, beta-glucanos, galactomananos y alfa-galactósidos.

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

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

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

Por ejemplo, el documento WO 2007/056321 A1 describe un método de deshidratación del residuo total de la destilación que comprende la adición de enzimas al residuo total de la destilación en la producción de etanol para mejorar la separación sólido-líquido en el proceso.

El documento WO 02/38786 describe un proceso de producción de etanol, mediante el cual las enzimas se usan para diluir el mosto de grano entero licuado y el residuo ligero de la destilación. Las enzimas se aplican al mosto licuado antes de que comience la fermentación, así como al residuo ligero de la destilación después de la centrifugación del residuo total de la destilación.

El documento US 2006/0275882 A1 describe un proceso para producir un producto de fermentación en donde la viscosidad del mosto se reduce mediante la 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 proceso de fabricación de alimentos, en donde los subproductos fibrosos como los DDGS se inoculan con un hongo filamentoso para mejorar la calidad del subproducto.

Algunas plantas de etanol usan sorgo, trigo o cebada en el proceso de fermentación, dependiendo de la ubicación 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, los aminoácidos, grasas, minerales y vitaminas restantes aumentan aproximadamente tres veces su concentración en comparación con los niveles encontrados en el maíz. A pesar del aumento significativo en la proteína cruda, el pobre equilibrio de aminoácidos de los DDGS debe abordarse al formular dietas para cerdos y aves de corral.

Por lo tanto, es un objeto de la presente descripción proporcionar composiciones de enzimas mejoradas y métodos para mejorar la calidad de los subproductos de los procesos de fermentación. Existe además una necesidad de composiciones de enzimas y métodos para mejorar aún más la capacidad del proceso mediante la deshidratación del residuo de la destilación y proporcionar métodos mejorados para aumentar la cantidad de aceite recuperable.

Resumen de la descripción

La presente descripción se refiere a nuevas composiciones de enzimas y a sus usos para la mejora de la calidad de los subproductos o residuos derivados del mosto fermentado. La presente invención solo se define por las reivindicaciones. Los términos "realizaciones" y "aspectos de la invención", etc., que se enumeran a continuación, son solo para propósitos ilustrativos.

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a composiciones de enzimas que comprenden una xilanasa, una beta 1,3 glucanasa y un polipéptido que tiene actividad de celobiohidrolasa II que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 por ciento idéntica a un CBHII de Trichoderma reesei (SEQ ID NO: 1), en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende al menos una variación en comparación con la SEQ ID NO: 1, y en donde la variación ocurre en la posición correspondiente al residuo de aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, y en donde dicha variación puede comprender una sustitución, deleción o inserción.

En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para mejorar la calidad de subproductos o residuos derivados de material que contiene almidón en un proceso para producir productos de fermentación que comprende las etapas de: i) someter el mosto fermentado durante y/o después de la fermentación a una composición de enzimas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, ii) separar el producto de fermentación deseado.

En un tercer aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para producir un producto de fermentación 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 mosto fermentado

iii) Someter el mosto fermentado después del proceso de fermentación a una composición de enzimas según la presente descripción

iv) Separación del producto de fermentación

En un tercer aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para recuperar aceite de un subproducto derivado de material que contiene almidón en un proceso para producir productos de fermentación, que comprende las etapas de:

i) Convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables

ii) Fermentación de los azúcares fermentables en un medio de fermentación en un producto de fermentación con un microorganismo fermentador

iii) Someter el mosto fermentado después de la fermentación y/o el medio de fermentación durante la fermentación a una composición de enzimas según la presente descripción

iv) Separación del producto de fermentación

v) Separación del subproducto

vi) Recuperación del aceite del subproducto

En un cuarto aspecto, la presente descripción se refiere al uso de una composición de enzimas según la presente descripción para la mejora de la calidad nutricional de los subproductos o residuos derivados de mosto fermentado en un proceso de producción fermentativo.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 2 muestra la secuencia de tipo salvaje de la proteína CBHII de *Trichoderma reesei*. La secuencia contiene una secuencia señal N-terminal para la secreción (subrayada con una línea continua; aminoácido 1-24) seguida de un dominio de unión a celulosa de tipo fúngico (= "Pequeño dominio de unión de cuatro cisteínas de hongos"; subrayado con línea discontinua; aminoácido 31-62).

La Figura 3 muestra las ubicaciones de una realización con mutaciones beneficiosas en las posiciones Q37, N38, Y53, S54, A65, A66 y H438 de CBHII de *Trichoderma reesei* (resaltado).

Descripción de la divulgación

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevas composiciones de enzimas útiles para mejorar los procesos de producción fermentativa debido a una mejor capacidad del proceso y proporcionar subproductos del proceso de fermentación con una calidad mejorada.

En una realización ventajosa, las composiciones de enzimas comprenden una xilanasa, una beta-1,3-glucanasa y un CBHII. En otra realización, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa, una 1,6-beta-glucanasa, una xilanasa y un CBHII.

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

Se han descrito varios genes de beta-1,3-glucanasa y usos de los mismos en la técnica anterior. Un ejemplo es 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 beta-1,3-glucanasa citolasa de la pared celular para eliminar las paredes celulares de la levadura. El gen se deriva de Arthrobacter y se transforma en bacterias del grupo Escherichia. El documento EP 440.304 se refiere a plantas provistas de una resistencia mejorada frente a hongos patógenos transformadas con al menos un gen que codifica una quitinasa intracelular, o una beta-1,3-glucanasa intracelular o extracelular. También se describen los polinucleótidos recombinantes coincidentes. El documento WO 87/01388 (The Trustees of Columbia University) describe un método para preparar enzimas líticas celulares, tales como las beta-1,3-glucanasas, que pueden ser producidas por Oerksovia. El documento WO 92/03557 (Majesty (Her) in Right of Canada) describe un vector de expresión de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN de 2,7 kb, derivada de Oerskovia xanthin-eolytica, que codifica una beta-1,3-glucanasa. A partir del documento WO 92/16632, se conoce una secuencia de ADN recombinante que codifica una proteína nueva con actividad beta-1,3-glucanasa.

Los ejemplos de beta-1,3-glucanasa disponibles comercialmente son Rohalasa BX de AB Enzymes y Rapidasa

Glucalees de DSM.

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 se deriva de un hongo filamentoso, preferiblemente se deriva de una cepa de Aspergillus, tal como Aspergillus aculeatus; o de una cepa de Humicola, preferiblemente Humicola lanuginosa. Los ejemplos de xilanasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitados 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 están limitados a, beta-xilosidasa de Trichoderma reesei (número de acceso de UniProtKB/TrEMBL Q92458), Talaromyces emersonii (número de acceso de Swiss-Prot Q8X212) y Neurospora crassa (número de acceso de SwissProt Q7SOW4).

Según la invención, la cerveza puede someterse en la etapa i) a una cantidad efectiva de cualquier xilanasa (EC 3.2.1.8), tal como cualquiera de las xilanasas mencionadas a continuación. La actividad xilanasa puede derivarse de cualquier organismo adecuado, incluidos organismos fúngicos y bacterianos. Las xilanasas fúngicas pueden derivarse de cepas de géneros que incluyen Aspergillus, Dispo-rotrichum, Penicillium, Neurospora, Fusarium y Trichoderma. Los ejemplos de xilanasas bacterianas adecuadas incluyen las xilanasas derivadas de una cepa de Bacillus, tal como Bacillus subtilis, tal como la descrita en la patente de EE. UU. 5.306.633.

La exo-celobiohidrolasa II (celobiohidrolasa II o CBH II) se refiere a las celobiohidrolasas que degradan la celulosa hidrolizando la celobiosa del extremo reductor de las cadenas de polímero de celulosa. El grupo celobiohidrolasa II pertenece al mismo grupo EC que es EC 3.2. 1.91, que el grupo de la celobiohidrolasa I, siendo la diferencia que la celobiohidrolasa I degrada la celulosa hidrolizando la celobiosa del extremo no reductor de las cadenas de polímero de celulosa.

En realizaciones ventajosas, las composiciones de enzimas según la presente descripción comprenden una CBH II descrita en el documento WO 2010/066411, en particular un polipéptido que tiene actividad de celobiohidrolasa II que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 por ciento idéntica a una CBHII de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 1), en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende al menos una variación en comparación con la SEQ ID NO: 1, y en donde la variación ocurre en la posición correspondiente al residuo de aminoácido 438 de SEQ ID NO: 1, y en donde dicha variación puede comprender una sustitución, deleción o inserción. Con respecto a la proteína CBHII de tipo salvaje de Trichoderma reesei (SEQ. NO: 1) Otras variaciones beneficiosas, en particular las sustituciones se pueden ubicar en siete posiciones (Q37, N38, Y53, S54, A65, A66 y H438) correspondientes a CBHII de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 1).

Las mutaciones o variaciones se describen mediante el uso de la siguiente nomenclatura: posición; residuo o residuos de aminoácidos sustituidos. Según esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un residuo de alanina por un residuo de glicina en la posición 20 se indica como 20G. Cuando un residuo de aminoácido en una posición dada se sustituye con dos o más residuos de aminoácidos alternativos, estos residuos están separados por una coma o una barra inclinada. Por ejemplo, la sustitución de alanina en la posición 20 bien con glicina o ácido glutámico se indica como 20G/E, o 20G, 20E.

Además, también se podría usar la siguiente nomenclatura: residuo de aminoácido en la estructura de la proteína; posición; residuo o residuos de aminoácidos sustituidos. Según esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un residuo de alanina por un residuo de glicina en la posición 20 se indica como Ala20Gly o A20G, o 20G. La eliminación de alanina en la misma posición se muestra como Ala20* o A20*. La inserción de un residuo de aminoácido adicional (p. ej., una glicina) se indica como Ala20AlaGly o A20AG. La deleción de una cadena consecutiva de residuos de aminoácidos (p. ej., entre alanina en la posición 20 y glicina en la posición 21) se indica como Δ(Ala20-Gly21) o Δ(A20-G21). Cuando una secuencia contiene una deleción en comparación con la proteína parental utilizada para la numeración, una inserción en dicha posición (p. ej., una alanina en la posición delecionada 20) se indica como *20Ala o *20A. Las mutaciones múltiples están separadas por un signo más o una barra inclinada. Por ejemplo, dos mutaciones en las posiciones 20 y 21 sustituyendo alanina y ácido glutámico por glicina y serina, respectivamente, se indican como A20G+E21S o A20G/E21S. Cuando un residuo de aminoácido en una posición dada se sustituye con dos o más residuos de aminoácidos alternativos, estos residuos están separados por una coma o una barra inclinada. Por ejemplo, la sustitución de alanina en la posición 30 bien con glicina o ácido glutámico se indica como A20G,E o A20G/E, o A20G, A20E. Cuando se identifica una posición adecuada para la modificación en la presente memoria sin que se sugiera ninguna modificación específica, debe entenderse que cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de aminoácido presente en la posición. Así, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 20 pero no se especifica, debe entenderse que la alanina puede delecionarse o sustituirse por cualquier otro residuo de aminoácido (es decir, uno cualquiera de R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V)

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 un proceso para producir productos de fermentación que comprende las etapas de: i) someter el mosto fermentado durante y/o preferiblemente después de la fermentación a una composición de enzimas según la presente descripción capaz de degradar uno o más componentes del mosto fermentado, ii) separar el producto de fermentación deseado.

Los subproductos o residuos del proceso de fermentación incluyen aceite, granos de destilería, granos de cervecería, granos secos de destilería, solubles de destilería secos, granos secos de destilería con solubles, WDG y/o residuos de la industria de procesamiento de cereales, o mezclas de los mismos. Por ejemplo, los DDGS son el residuo seco que queda después de que la fracción de almidón del maíz se fermenta con levaduras y enzimas seleccionadas para producir etanol y dióxido de carbono. Después de la fermentación completa, el alcohol se elimina por destilación y los residuos de fermentación restantes se secan.

El residuo de la destilación es el producto que queda después de que el mosto se ha convertido en azúcar, fermentado y destilado en etanol. El residuo de la destilación puede separarse en dos fracciones, tal como por centrifugación o cribado: (1) torta húmeda (fase sólida) y (2) el residuo ligero de la destilación (sobrenadante). La fracción sólida o grano húmedo de destilería (DWG) se puede prensar para eliminar el exceso de humedad y luego secar para producir los granos secos de destilería (DDG). Una vez que se ha eliminado el etanol de la fracción líquida, el líquido restante se puede evaporar para concentrar el material soluble en solubles de destilería condensados (DS) o secar y moler para crear solubles secos de destilería (DDS). El DDS a menudo se mezcla con DDG para formar 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, la composición de enzimas según la presente descripción se añadió durante y/o preferiblemente después de la fermentación en el proceso de producción al mosto fermentado y antes de la etapa de separación como destilación, donde el producto principal de fermentación deseado se separa del resto del mosto fermentado. Las enzimas según la presente descripción fueron capaces de degradar componentes en el mosto fermentado (cerveza o mosto de cerveza) lo que mejora la calidad de los subproductos o residuos como granos de cervecería, 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 mezclas de los mismos. 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 al añadir la composición de enzimas según la presente descripción, en particular usando la beta 1,3 glucanasa y/o la beta 1,6 glucanasa en combinación con una xilanasa y la CBH II como se describe en la presente memoria, da como resultado un aumento del contenido nutricional en el mosto de cerveza que da como resultado una mejora de la calidad nutricional como el contenido de proteínas de los subproductos, así como la reducción de NSP resultantes de la pared celular del organismo fermentador como la pared celular de levaduras.

Por lo tanto, en realizaciones ventajosas, las composiciones de enzimas utilizadas en los métodos según 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 la cerveza.

En un aspecto de la presente descripción, la calidad de los subproductos de un proceso de producción fermentativo como DDG, DDGS o WDG puede mejorarse debido al uso de la composición de enzimas y los métodos según la presente descripción al reducir el contenido de fibra de los subproductos

Otro aspecto de la presente descripción es una mejor deshidratación del residuo total de la destilación del proceso de producción fermentativo para mejorar las condiciones de secado de los subproductos.

Otro aspecto más de la presente descripción es la evaporación mejorada del agua del residuo ligero de la destilación para mejorar la producción y composición del residuo pesado de la destilación o jarabe.

En otro aspecto de la presente descripción, se incrementa la cantidad de aceite recuperable. Los DDGS que siguen a un proceso de producción de etanol a partir de maíz típicamente contienen aproximadamente un 13 % de aceite, un 31 % de proteínas y un 56 % de carbohidratos y otros componentes. La eliminación de parte del aceite de los DDGS mejorará la calidad de los DDGS para el mercado de alimentos, ya que muchos productores de alimentos prefieren menos aceite y grasa en los DDGS para obtener alimentos de alta calidad.

El método y la composición de enzimas de la presente descripción pueden usarse en cerveza derivada de la producción de cualquier producto de fermentación adecuado. La materia prima para producir el producto de fermentación puede ser cualquier material que contenga almidón y/o azúcar, preferiblemente material vegetal que contenga almidón y/o azúcar, incluyendo: caña de azúcar, tubérculos, raíces, grano entero; y cualquier combinación de los mismos.

El material que contiene almidón puede obtenerse a partir de cereales. El material que contiene almidón adecuado incluye maíz (mazorca de maíz), trigo, cebada, yuca, sorgo, centeno, triticale, patata o cualquier combinación de los mismos.

El maíz es la materia prima preferida, especialmente cuando el producto de fermentación es etanol. El material que contiene almidón también puede consistir en o comprender, p. ej., una corriente secundaria del procesamiento de almidón, p. ej., corrientes de proceso que contienen carbohidratos que pueden no ser adecuadas para la producción de jarabes. Los componentes de la cerveza incluyen componentes de fibra, cáscara, germen, aceite y proteínas de la materia prima que contiene almidón, así como almidón no fermentado, levaduras, paredes celulares de levadura y residuos. La producción de un producto de fermentación se divide típicamente en las siguientes etapas principales del proceso: a) Reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, p. ej., mediante molienda en seco o en húmedo; b) Cocinar el material que contiene almidón en una suspensión de sólidos acuosa para gelatinizar el almidón, c) Licuar el material que contiene almidón gelatinizado para degradar el almidón (por hidrólisis) en maltodextrinas (dextrinas); d) Sacarificación de 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) Recuperación del producto de fermentación, p. ej., por destilación para separar el producto de fermentación del mosto de fermentación.

Como se mencionó anteriormente, la cerveza (o mosto fermentado) es el producto de fermentación que consiste en etanol, otros líquidos y sólidos de un producto de fermentación deseado. Según la invención, el producto de fermentación puede ser cualquier producto de fermentación, incluidos 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, incluidos, por ejemplo, antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, betacaroteno); y hormonas. La fermentación también se usa comúnmente en la producción de alcohol consumible (p. ej., licores, cerveza y vino), en las industrias de lácteos (p. ej., en la producción de yogur y queso), cuero y tabaco. En una realización preferida, el producto de fermentación es un líquido, preferiblemente un alcohol, especialmente etanol. La cerveza contemplada según la invención puede ser el producto resultante de un proceso de producción de producto de fermentación que incluye las etapas a) a f) mencionadas anteriormente. Sin embargo, la cerveza también puede ser el producto resultante de otros procesos 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 la levadura, o bacterias. Las bacterias adecuadas pueden ser, p. ej., especies de *Zymomonas*, tal como *Zymomonas mobilis* y *E. coli.* Los ejemplos de hongos filamentosos incluyen cepas de especies de *Penicillium*. Los organismos preferidos para la producción de etanol son las levaduras, tales como, p. ej., *Pichia* o *Saccharomyces.* Las levaduras preferidas según la descripción son especies de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería.

En una realización adicional, los sólidos de la etapa de fermentación pueden fraccionarse. Después de la fermentación, se pueden eliminar grandes trozos de fibras antes o después de la destilación. La eliminación se puede realizar con un separador de superficie antes de la destilación de cerveza. El material se puede separar de la mezcla de etanol/agua, p. ej., por centrifugación. Alternativamente, las fibras y los gérmenes se pueden eliminar mediante el cribado del residuo total de la destilación después de la destilación o los granos molidos antes de la fermentación. Después de que se eliminan los gérmenes y los trozos grandes de fibras, la cerveza restante o el residuo total de la destilación se tratan con enzimas o combinaciones de enzimas para mejorar aún más la calidad nutricional del subproducto final como DDGS que se utilizará.

Sobre la base del residuo total de la destilación o WDG en una realización de la presente descripción, se puede introducir un fermentador adicional para una producción de enzimas en el sitio, produciendo una mezcla de enzimas específica de planta y proceso con hongos filamentosos. El sobrenadante de esta fermentación que comprende enzimas se transfiere directamente al fermentador principal o pozo de cerveza para reducir el contenido de fibra y mejorar la calidad y los factores nutricionales de los DDGS, WDG y/u otros subproductos.

Además, el uso de las composiciones de enzimas según la presente descripción en el mosto de cerveza después de la fermentación y antes del proceso de destilación puede reducir la viscosidad del mosto de cerveza a través de la degradación de las fibras y/o los microorganismos fermentadores en la cerveza. La reducción de las fibras en la cerveza da como resultado una reducción del contenido de fibra 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 DDGS en el proceso de producción. La menor viscosidad da como resultado temperaturas de secado más bajas y también un tiempo de secado más corto que da como resultado una calidad mejorada de los subproductos. Por ejemplo, no se destruyen los productos sensibles a la temperatura como las proteínas y los aminoácidos.

Además, la adición de las enzimas según la presente descripción al mosto fermentado antes de la etapa de destilación, es una ventaja ya que las enzimas en las composiciones de enzimas se inactivan durante la destilación.

Debido a la calidad mejorada, los subproductos y residuos pueden usarse como alimento para animales de alta calidad con un bajo contenido de fibra y aceite y alto contenido de proteínas.

En una realización, la descripción se refiere a métodos para formular aditivos alimenticios nutricionalmente útiles como coproductos de los métodos mencionados anteriormente para mejorar las características nutricionales de un producto

alimenticio fibroso.

Los procesos para producir productos de fermentación incluyen la producción de una gran cantidad de productos de fermentación que comprenden, pero no están limitados a, alcoholes (en particular etanol); ácidos, tales como ácido cítrico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, lisina; cetonas; aminoácidos, tales como el ácido glutámico, pero también compuestos más complejos tales como antibióticos, tales como la penicilina, la tetraciclina; enzimas; vitaminas, tales como riboflavina, B12, betacaroteno; hormonas, tales como la insulina. Se prefiere el etanol potable, así como el etanol industrial y de combustible.

Los procesos 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 el maíz para su utilización en dichos procesos de fermentación comienza típicamente con la molienda del maíz en un proceso de molienda en seco o molienda húmeda. Los procesos de molienda húmeda implican fraccionar el maíz en diferentes componentes donde solo la fracción de almidón entra en el proceso de fermentación. Los procesos de molienda en seco implican moler los granos de maíz en harina y mezclar la harina con agua y enzimas. Generalmente, se utilizan dos tipos diferentes de procesos de molienda en seco. El proceso más comúnmente utilizado, a menudo denominado "proceso convencional", incluye moler el material que contiene almidón y luego licuar el almidón gelatinizado a una temperatura alta usando típicamente una alfa-amilasa bacteriana, seguido de sacarificación simultánea y fermentación (SSF) que se lleva a cabo en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación. Otro proceso bien conocido, a menudo denominado proceso de "hidrólisis de almidón bruto" (proceso RSH), incluye moler el material que contiene almidón y luego sacarificar y fermentar simultáneamente el almidón granulado por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, típicamente en presencia de una alfa-amilasa ácida y una glucoamilasa fúngicas.

En un proceso para producir etanol a partir de maíz, siguiendo el proceso SSF o RSH, el etanol se destila de todo el mosto después de la fermentación. La suspensión de sólidos sin etanol resultante, generalmente conocida como residuo total de la destilación, se separa en fracciones sólidas y líquidas (es decir, torta húmeda y residuo ligero de la destilación que contienen aproximadamente un 35 y 7 % de sólidos, respectivamente). El residuo ligero de la destilación a menudo se condensa por evaporación en un residuo pesado de la destilación o jarabe y se recombina con la torta húmeda y se seca adicionalmente en granos secos de destilería con solubles, granos secos de destilería con solubles (DDGS) para su uso en alimentación animal.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a métodos para producir 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 para producir mosto fermentado

iii) Someter el mosto fermentado después del proceso de fermentación a una composición de enzimas según la presente descripción

iv) Separación del etanol en el mosto fermentado por destilación

La conversión del material que contiene almidón en azúcares fermentables se puede hacer (a) licuando un material que contiene almidón y (b) sacarificando el 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 ácida fúngica. En una realización, se añade una pululanasa, isoamilasa y/o fitasa durante la licuefacción.

Los organismos preferidos para la producción de etanol son las levaduras, tales como, p. ej., Pichia o Saccharomyces. La levadura preferida según la descripción es la especie de 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}, especialmente $5x10^7$ recuento de levaduras viables por ml de caldo de fermentación. Durante la fase de producción de etanol, el recuento de células de levadura debe estar preferiblemente en el intervalo de 10^7 a 10^{10}, especialmente alrededor de 2×10^8. Se puede encontrar más orientación sobre el uso de levadura para la fermentación, p. ej., en "The alcohol Textbook" (Editores K. Jacques, T. P. Lyons y D. R. Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999).

El microorganismo utilizado para la fermentación se añade al mosto y la fermentación continúa hasta que se produce la cantidad deseada de producto de fermentación; en una realización preferida en donde el producto de fermentación es etanol pare ser recuperado, esto puede ser, p. ej., durante 24-96 horas, tal como 35-60 horas. La temperatura y el pH durante la fermentación están a una temperatura y un 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 es etanol para la recuperación, la temperatura preferida está en el intervalo de aproximadamente 26-34 ºC, p. ej., aproximadamente 32 ºC, 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 cerveza, la temperatura del mosto la temperatura preferida es de alrededor de 12-16 C, tal como alrededor de 14 C.

Como se mencionó anteriormente, el organismo fermentador es preferiblemente 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) ya que su actividad exo-amilasa puede dividir el almidón líquido y también dextrina, maltosa y melibiosa.

En la etapa de licuefacción, el almidón gelatinizado (mosto aguas abajo) se degrada (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 proceso de suspensión de sólidos en caliente de tres etapas. La suspensión de sólidos se calienta a entre 60-95 °C, preferiblemente 80-85 °C, y se puede añadir una alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (fluidificación). Después, la suspensión de sólidos se puede cocer a chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125 °C, durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos. La suspensión de sólidos se enfría hasta 60-95 °C y se puede añadir más alfa-amilasa para completar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción generalmente 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 pueden realizarse como etapas de proceso separadas o como una etapa simultánea de sacarificación y fermentación (SSF). La sacarificación se lleva a cabo en presencia de una enzima sacarificante, p. ej., una glucoamilasa, una beta-amilasa o una amilasa maltogénica. Opcionalmente, se añade una fitasa y/o una proteasa.

La sacarificación se puede llevar a cabo utilizando condiciones bien conocidas en la técnica con una enzima sacarificante, p. ej., beta-amilasa, glucoamilasa o amilasa maltogénica, y opcionalmente una enzima desrramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar hasta aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, sin embargo, es común hacer una pre-sacarificación durante típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65 °C, típicamente aproximadamente 60 °C, seguido de la sacarificación completa durante la fermentación en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (proceso SSF). La sacarificación se lleva a cabo típicamente a una temperatura de 20-75 °C, preferiblemente de 40-70 °C, típicamente alrededor de 60 °C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4,5.

El proceso más ampliamente usado para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, es el proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF), en el que no hay una etapa de retención para la sacarificación, lo que significa que un organismo fermentador, tal como una levadura, y enzima(s), incluyendo la o las hemicelulasas y/o endoglucanasas específicas, pueden añadirse conjuntamente. 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 continúa durante 6 a 120 horas, en particular 24 a 96 horas.

Después o durante, pero preferiblemente después de la fermentación, el mosto fermentado se somete a una composición de enzimas según la presente descripción. En una realización, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa, una xilanasa y la CBH II mutado descrita en la presente descripción. En otra realización, la composición de enzimas comprende además una 1,6-beta-glucanasa. En una realización adicional, la composición de enzimas comprende una beta-1,3-glucanasa, una xilanasa, una CBH II mutada y una proteasa.

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

- reducir el tamaño de las partículas del material que contiene almidón, preferiblemente mediante molienda; y
- formar una suspensión de sólidos que comprende el material que contiene almidón y agua.

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

En una realización preferida, el material que contiene almidón es 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 engloba métodos, en donde el material que contiene almidón se puede obtener mediante un proceso que comprende la molienda de cereales, preferiblemente molienda en seco, p. ej., molinos de martillos o rodillos. La molienda también se entiende como molturación, como lo es cualquier proceso adecuado para abrir los granos individuales y exponer el endospermo para su procesamiento adicional. Normalmente, se utilizan dos procesos de molienda en la producción de alcohol: molienda húmeda y en seco. El término "molienda en seco" denota la molienda del grano completo. En la molienda en seco, todo el grano se muele y se usa en la parte restante del proceso de

formación de mosto. El mosto puede proporcionarse formando una suspensión de sólidos que comprende el material que contiene almidón molido y agua de elaboración. El agua de elaboración puede calentarse a una temperatura adecuada antes de combinarse con el material que contiene almidón molido para lograr una temperatura de mosto de 45 a 70 °C, preferiblemente de 53 a 66°C, más preferiblemente de 55 a 60 °C . El mosto se forma típicamente en un tanque conocido como tanque de suspensión de sólidos.

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

Después de la compleción del proceso de fermentación, el material restante se considera el residuo total de la destilación. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "residuo total de la destilación" incluye el material que queda al final del proceso de fermentación tanto antes como después de la recuperación del producto de fermentación, p. ej., etanol. El producto de fermentación puede recuperarse opcionalmente por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, el residuo total de la destilación se separa o se divide en una fase sólida y líquida mediante uno o más métodos para separar el residuo ligero de la destilación de la torta húmeda. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, centrifugación y decantación. El producto de fermentación se puede recuperar opcionalmente antes o después de que el residuo total de la destilación se separe en una fase sólida y líquida.

Por lo tanto, en una realización, los métodos de la descripción comprenden además la destilación para obtener el producto de fermentación, p. ej., etanol. La fermentación y la destilación pueden llevarse a cabo simultáneamente y/o separadamente/secuencialmente; opcionalmente, seguido por una o más etapas del proceso para un mayor refinamiento del producto de fermentación.

En una realización, el subproducto acuoso (residuo total de la destilación) del proceso de destilación se separa en dos fracciones, p. ej., por centrifugación: grano húmedo (fase sólida) y residuo ligero de la destilación (sobrenadante). En otra realización, los métodos de la descripción comprenden además separar el residuo total de la destilación producido por destilación en grano húmedo y residuo ligero de la destilación; y reciclar el residuo ligero de la destilación al material que contiene almidón antes de la licuefacción. En una realización, el residuo ligero de la destilación se recicla a la suspensión de sólidos grano completo molido. La fracción de grano húmedo puede secarse, típicamente en un secador de tambor. El producto seco se conoce como granos secos de destilería, y puede usarse como se mencionó anteriormente como alimento para animales de alta calidad. La fracción de residuo ligero de la destilación se puede evaporar proporcionando dos fracciones (véanse la Fig. 1 y Fig.2), (i) una fracción de condensado de 4-6 % de DS (principalmente de componentes de almidón, proteínas, aceite y 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 del residuo total de la destilación) para proporcionar un producto conocido como granos secos de destilería con solubles, que también se puede usar como alimento para animales. Residuo ligero de la destilación es el término usado para el sobrenadante de la centrifugación del residuo total de la destilación. Típicamente, el residuo ligero de la destilación contiene un 4-6 % de DS (principalmente almidón y proteínas) y tiene una temperatura de aproximadamente 60-90 °C. En otra realización, el residuo ligero de la destilación no se recicla, sino que la corriente de condensado del residuo ligero de la destilación evaporado se recicla a la suspensión de sólidos que contiene el grano completo molido para ser cocido a chorro. El experto en la técnica conoce bien más detalles sobre cómo llevar a cabo la licuefacción, sacarificación, fermentación, destilación y recuperación de etanol.

En la técnica se conocen métodos para deshidratar el residuo de la destilación y para extraer aceite de un producto de fermentación. Estos métodos incluyen decantar o separar de otra manera el residuo total de la destilación en una torta húmeda y residuo ligero de la destilación. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. Nos. 6.433.146, 7.601.858 y 7.608.729, y la Publicación de Solicitud de EE. UU. No. 2010/0058649. Además, el residuo ligero de la destilación se puede evaporar o condensar en jarabe o residuo pesado de la destilación del que se puede extraer el aceite mediante centrifugación, filtración, calor, alta temperatura, aumento de presión o una combinación de los mismos. Otra forma de extraer aceite es reducir el pH del residuo ligero de la destilación o jarabe. El uso de tensioactivos para romper las emulsiones también mejora la extracción de aceite. También se pueden usar prensas para deshidratar. 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 el residuo ligero de la destilación y más el jarabe o residuo pesado de la destilación.

El o los productos de fermentación pueden recuperarse opcionalmente del medio de fermentación usando cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material celulósico fermentado y se purifica por métodos convencionales de destilación como se mencionó anteriormente. Se puede obtener etanol con una pureza de hasta aproximadamente el 96 % vol., que se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol para beber, es decir, bebidas alcohólicas neutras potables o etanol industrial.

Una realización adicional se refiere a un método para recuperar aceite de un subproducto derivado de material que contiene almidón en un proceso para producir productos de fermentación, que comprende las etapas de:

i) Convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables

ii) Fermentación de los azúcares fermentables en un medio de fermentación en un producto de fermentación con un microorganismo fermentador

iii) Someter el mosto fermentado después de la fermentación y/o el medio de fermentación durante la fermentación a una composición de enzimas según la presente descripción

iv) Separación del producto de fermentación

v) Separación del subproducto

vi) Recuperación del aceite del subproducto

En la técnica se conocen métodos para deshidratar el residuo de la destilación y para recuperar el aceite que surge de un proceso de fermentación. Estos métodos incluyen decantar o separar de otra manera el residuo total de la destilación en una torta húmeda y residuo ligero de la destilación. Véanse, p. ej., las Pat. de EE. UU. Nos. 6.433.146, 7.601.858 y 7.608.729, y la Publicación de Solicitud de EE. UU. No. 2010/0058649. Además, el residuo ligero de la destilación se puede evaporar o condensar en jarabe o residuo pesado de la destilación del que se puede extraer el aceite utilizando centrifugación, filtración, calor, alta temperatura, aumento de presión o una combinación de los mismos. Otra forma de extraer el aceite es reducir el pH del residuo ligero de la destilación o jarabe. El uso de tensioactivos para romper las emulsiones también mejora la extracción de aceite. Otros métodos para extraer aceite de maíz crudo de DDGS de maíz se discuten en Sing et. al., "Extraction of Oil From Corn Distillers Dried Grains with Solubles", Transactions of the ASAE 41 (6), 1775-1777 (1998).

Después de la eliminación del aceite de los subproductos, los carotenoides de los materiales que contienen almidón están comprendidos principalmente en el aceite. El aceite se puede recuperar mediante el uso de materiales de adsorción sólidos como la bentonita o la sílice, el carotenoide se puede extraer fácilmente del aceite, en particular directamente en la planta de producción de etanol y luego se extrae del material de adsorción para su posterior procesamiento o uso del material de adsorción que comprende carotenoides, en particular, p-caroteno y/o luteína unidos al material de adsorción, en particular a la bentonita que puede usarse directamente como ingrediente de alimentación para animales.

Las invenciones descritas y reivindicadas en la presente memoria no están limitadas en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, ya que estas realizaciones pretenden ser ilustraciones de varios aspectos de la invención. Se pretende que cualquier realización equivalente esté dentro del alcance de esta invención. De hecho, diversas 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. Se pretende que dichas modificaciones también se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En el caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción, incluidas las definiciones.

Ejemplos

1. Identificación de la actividad CBH2 como una actividad limitante clave durante la hidrólisis de biomasa.

Las celobiohidrolisas juegan un papel crítico durante la despolimerización de los polímeros de celulosa presentes en una variedad de material vegetal o microbiano. Estos procesos requieren la acción complementaria de celobiohidrolasas, endoglucanasas y beta-glucosidasas.

Para determinar la actividad enzimática más limitante durante la hidrólisis de una biomasa dada (p. ej., paja de trigo pretratada), las concentraciones de enzimas individuales se variaron en mezclas sintéticas. El aumento de las concentraciones de CBH2 condujo a rendimientos globales aumentados de las mezclas de hidrólisis completa. La Tabla 1 resume estos resultados:

Tabla 1

Aumento de la concentración de CBH2 en mezclas de hidrólisis artificiales	**Aumento de la liberación de glucosa de la paja de trigo pretratada**
3 x	27 %
7 x	46 %
11 x	73 %

Las reacciones se iniciaron con paja de trigo pretratada al 20 % y se operaron durante 18 h a 45 °C. Las mezclas de hidrólisis artificiales contenían 1 mg/gramo de sustancia seca de la preparación de enzimas comercial Econasa CE (AB Enzymes) y 20 U/gramo de sustancia seca de la Beta-Glucosidasa Novo 188. Se añadieron preparaciones de CBH2 purificadas en las cantidades indicadas.

2. Mejora de la actividad específica de las variantes de CBH2

Se evaluaron los rendimientos del CBHII de tipo salvaje (de T. reseei) y las proteínas variantes durante la hidrólisis de avicelulosa, paja de trigo o glucano de cebada pretratados y se identificaron variantes que mostraban hasta un 100 % de actividad específica mejorada. Los factores de mejora generados a partir de la medición de la concentración de proteínas a través de Bradford o ELISA fueron muy similares y mostraron una buena correlación. Los genotipos de las variantes mejoradas se determinaron como se describe en el ejemplo 5. Las posiciones de las posiciones de aminoácidos de CBH II identificadas se determinaron a partir de la secuencia de CBH II de tipo salvaje (véase la figura 2). Las siguientes tablas resumen los datos.

Tabla 2: Factores de mejora y genotipos de variantes seleccionadas de CBHII durante la hidrólisis de avicelulosa

Variante	**Factor de mejora (Bradford)**	**Factor de mejora (ELISA)**	**Genotipo**
Tipo salvaje	1,00	1,00	-
1-A	1,17	1,00	Y53Q, S54V
1-B	1,21	1,10	A65P, A66Y
1-C	1,12	1,12	Y53A, S54V
1-D	1,16	1,27	Q37I, N38K
1-E	1,43	1,24	H438N
1-F	1,2	1,29	H438S
2-A	1,56	1,43	Y53Q, S54V, H438S
2-B	1,70	1,49	Y53A, S54V, H438N
2-C	1,56	1,56	Q37I, N38K, A65P, A66Y, H438S
2-D	1,65	1,87	Q37I, N38K, Y53A, S54V, A65P, A66Y, H438S

Tabla 3: Factores de mejora de variantes seleccionadas de CBHII durante la hidrólisis de la paja de trigo

	Factor de mejora
Variante 1-E	1,25
Variante 2-B	1,40
Variante 2-D	2,00

3. Identificación de variantes de CBH II con actividad específica mejorada en avicelulosa

Se añadieron muestras de proteínas puras (un volumen) con concentraciones de 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5,0 o 10,0 µg/ml y dos volúmenes de 5 mU/ml de beta-glucosidasa (Megazyme) en NaAc 200 mM pH 5,00 + Tritón X100 al 0,125 % a tres volúmenes de suspensión de avicelulosa en agua destilada (sustancia seca al 5 %/partículas de 38 µm/Fluka). La mezcla se incubó a 50 °C durante al menos 2,5 h. Después de esta incubación, se evaluó el contenido de glucosa añadiendo un volumen de la mezcla de reacción a un ensayo de seis volúmenes que contenía todos los componentes para la detección enzimática de las concentraciones de glucosa (Kit de Megazyme). Después del desarrollo del color de Resazurina a Resorufina (em535nm/ex595nm) durante una hora a 37 °C, las muestras se evaluaron mediante espectroscopía de fluorescencia confocal. El rendimiento de las variantes 1-E y 2-D resultó mejorar significativamente. Como se muestra en la figura 6, las proteínas variantes 1-E mostraron aproximadamente un 35 % (a 10 g/ml) de actividad específica mejorada en comparación con el tipo salvaje. A la misma concentración de proteína, la actividad específica de la variante 2-D mejoró aproximadamente un 100 %.

4. Identificación de variantes de CBH II con actividad específica mejorada en paja de trigo

Se añadieron muestras de proteínas puras (un volumen) con concentraciones de 1,56, 3,13, 6,25, 12,5, 25, 50 o 100 µg/ml y dos volúmenes de 200 mU/ml de beta-glucosidasa (Megazyme) en NaAc 200 mM pH 5,00 + Tritón X100 al 0,125 % a tres volúmenes de suspensión de paja de trigo en agua destilada (sustancia seca al 2 %). La mezcla se incubó a 50 °C durante al menos 2,5 h. Después de la incubación, se evaluó el contenido de glucosa añadiendo un volumen de la mezcla de reacción a un ensayo de seis volúmenes que contenía todos los componentes para la detección enzimática de las concentraciones de glucosa (Kit de Megazyme). Después del desarrollo del color de Resazurina a Resorufina (em535nm/ex595nm) durante una hora a 37 °C, las muestras se evaluaron mediante espectroscopía de fluorescencia confocal. Como se muestra en la Figura 8, las proteínas variantes 1-E mostraron aproximadamente un 23 % (a 50 g/ml) de actividad específica mejorada en comparación con el tipo salvaje. A la misma concentración de proteína, la actividad específica de la variante 2-D mejoró aproximadamente un 112 %.

5. Identificación de variantes de CBH II con actividad específica mejorada en glucano de cebada

Se añadieron muestras de proteínas puras (un volumen) con concentraciones de 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5,0 o 10,0 µg/ml y dos volúmenes de 50 mU/ml de beta-glucosidasa (Megazyme) en NaAc 200 mM pH 5,00 + Tritón X100 al 0,125% a tres volúmenes de disolución de glucano de cebada en agua destilada (1 % p/v; Megazyme). La mezcla se incubó a 50 °C durante al menos 2 h. Después de la incubación, se evaluó el contenido de glucosa añadiendo un volumen de la mezcla de reacción a un ensayo de seis volúmenes que contenía todos los componentes para la detección enzimática de las concentraciones de glucosa (Kit de Megazyme). Después del desarrollo del color de Resazurina a Resorufina (em535nm/ex595nm) durante una hora a 37 °C, las muestras se evaluaron mediante espectroscopía de fluorescencia confocal. Como se muestra en la Figura 9, las proteínas variantes 1-E tienen una actividad específica mejorada en comparación con el tipo salvaje. A la misma concentración de proteína, también se mejoró la actividad específica de la variante 2-D.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de enzimas que comprende una xilanasa, una beta 1,3 glucanasa y un polipéptido que tiene actividad de celobiohidrolasa II que comprende una secuencia de aminoácidos de CBHII de *Trichoderma reesei, en* donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende al menos una variación en comparación con la SEQ ID NO: 1, en donde la variación se produce en la posición correspondiente al residuo de aminoácido 438 de la SEC ID NO: 1, en donde dicha variación puede comprender una sustitución, deleción o inserción y en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 por ciento idéntica a la CBHII de *Trichoderma reesei* mostrada en la SEQ ID NO: 1.

2. La composición de enzimas según la reivindicación 1, en donde la variación en el polipéptido que tiene actividad de celobiohidrolasa II es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en H438S y H438N.

3. La composición de enzimas según la reivindicación 1 o 2, en donde el polipéptido que tiene actividad de celobiohidrolasa II comprende una variación adicional en una posición seleccionada del grupo que consiste en: Q37, N38, Y53, S54, A65 y A66.

4. La composición de enzimas según la reivindicación 3, en donde la variación adicional es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en Q37I, N38K, Y53A, S54V, A65P y A66Y.

5. La composición de enzimas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido que tiene actividad de celobiohidrolasa II comprende las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

a) Y53A, S54V, H438N

b) Y53Q, S54V, H438S

c) Q37I, N38K, A65P, A66Y, H438S

d) Q37I, N38K, Y53A, S54V, A65P, A66Y, H438S.

6. La composición de enzimas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido que tiene actividad de celobiohidrolasa II tiene al menos un 85, 90, 93 por ciento, 95 por ciento, 96 por ciento, 97 por ciento, 98 por ciento o 99 por ciento de identidad con la SEQ ID NO: 1.

7. La composición de enzimas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende además una beta 1,6 glucanasa.

8. Un método para recuperar aceite de un subproducto derivado de material que contiene almidón en un proceso para producir productos de fermentación, que comprende las etapas de:

i) Convertir el material que contiene almidón en azúcares fermentables

ii) Fermentación de los azúcares fermentables en un medio de fermentación en un producto de fermentación con un microorganismo fermentador

iii) Someter el mosto fermentado después de la fermentación y/o el medio de fermentación durante la fermentación a una composición de enzimas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7

iv) Separación del producto de fermentación

v) Separación del subproducto

vi) Recuperación del aceite del subproducto

9. El método según la reivindicación 8, en donde el producto de fermentación se selecciona del grupo que consiste en un ácido, un alcohol e hidrógeno.

10. El método según la reivindicación 9, en donde el alcohol se selecciona del grupo que consiste en etanol, butanol, propanol, metanol, propanodiol y butanodiol.

11. El método según la reivindicación 9, en donde el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, ácido málico, ácido butírico y ácido fórmico.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el subproducto o residuo es un subproducto fibroso seleccionado del grupo que consiste en granos de cerveza utilizados, granos secos de destilería, soluble seco de destilería, granos secos de destilería con solubles, granos húmedos y mezclas de los mismos.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde el mosto fermentado se deriva de un proceso de producción de un producto de fermentación que utiliza granos completos obtenidos de cereales como

materia prima, el producto de fermentación es etanol, el etanol se separa por destilación y el subproducto mejorado es Granos Secos de Destilería con Solubles (DDGS).

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde el material que contiene almidón se selecciona de los grupos que consisten en maíz, trigo, cebada, centeno, mijo, sorgo y milo.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en donde el microorganismo es una bacteria, levadura u hongo.

FIGURA 1

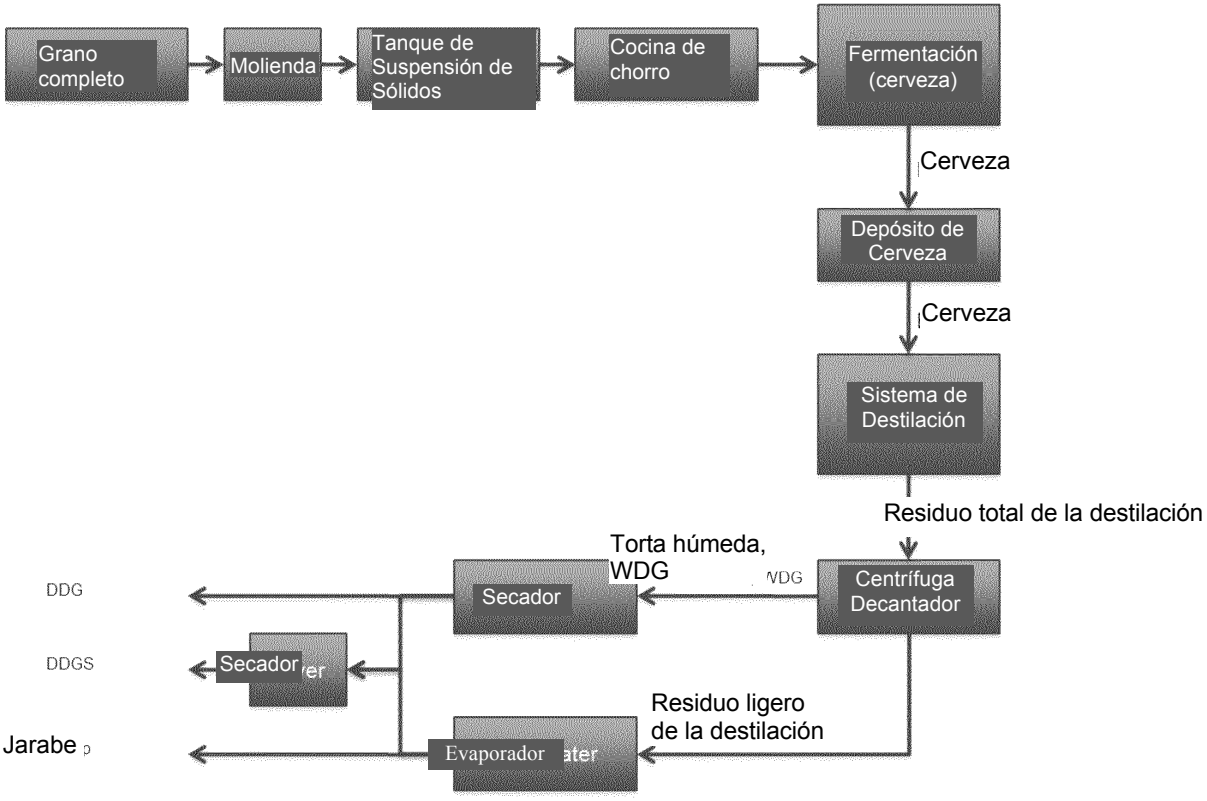
Grano completo
Molienda
Tanque de Suspensión de Sólidos
Cocina de chorro
Fermentación (cerveza)
Cerveza
Depósito de Cerveza
Cerveza
Sistema de Destilación
Residuo total de la destilación
Torta húmeda, WDG
Centrífuga Decantador
Secador
DDG
DDGS
Residuo ligero de la destilación
Evaporador

FIGURA 2

Secuencia de aminoácidos de la proteína CBH II de tipo salvaje de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 1)

```
  1    MIVGILTTLA TLATLAASVP LEERQACSSV WGQCGGQNWS GPTCCASGST   50
 51    CVYSNDYYSQ CLPGAASSSS STRAASTTSR VSPTTSRSSS ATPPPGSTTT  100
101    RVPPVGSGTA TYSGNPFVGV TPWANAYYAS EVSSLAIPSL TGAMATAAAA  150
151    VAKVPSFMWL DTLDKTPLME QTLADIRTAN KNGGNYAGQF VVYDLPDRDC  200
201    AALASNGEYS IADGGVAKYK NYIDTIRQIV VEYSDIRTLL VIEPDSLANL  250
251    VTNLGTPKCA NAQSAYLECI NYAVTQLNLP NVAMYLDAGH AGWLGWPANQ  300
301    DPAAQLFANV YKNASSPRAL RGLATNVANY NGWNITSPPS YTQGNAVYNE  350
351    KLYIHAIGPL LANHGWSNAF FITDQGRSGK QPTGQQQWGD WCNVIGTGFG  400
401    IRPSANTGDS LLDSFVWVKP GGECDGTSDS SAPRFDSHCA LPDALQPAPQ  450
451    AGAWFQAYFV QLLTNANPSF L                                 471
```

FIGURA 3

Secuencia de aminoácidos de la proteína CBH2 de tipo salvaje de Trichoderma reesei que muestra las ubicaciones de las mutaciones beneficiosas en las posiciones Q37, N38, Y53, S54, A65, A66 y H438 (resaltado). (SEQ ID NO: 2)

```
  1    MIVGILTTLA TLATLAASVP LEERQACSSV WGQCGGQNWS GPTCCASGST   50
 51    CVYSNDYYSQ CLPGAASSSS STRAASTTSR VSPTTSRSSS ATPPPGSTTT  100
101    RVPPVGSGTA TYSGNPFVGV TPWANAYYAS EVSSLAIPSL TGAMATAAAA  150
151    VAKVPSFMWL DTLDKTPLME QTLADIRTAN KNGGNYAGQF VVYDLPDRDC  200
201    AALASNGEYS IADGGVAKYK NYIDTIRQIV VEYSDIRTLL VIEPDSLANL  250
251    VTNLGTPKCA NAQSAYLECI NYAVTQLNLP NVAMYLDAGH AGWLGWPANQ  300
301    DPAAQLFANV YKNASSPRAL RGLATNVANY NGWNITSPPS YTQGNAVYNE  350
351    KLYIHAIGPL LANHGWSNAF FITDQGRSGK QPTGQQQWGD WCNVIGTGFG  400
401    IRPSANTGDS LLDSFVWVKP GGECDGTSDS SAPRFDSHCA LPDALQPAPQ  450
451    AGAWFQAYFV QLLTNANPSF L                                 471
```