

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 760**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

A23J 1/12 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2009 PCT/US2009/040687**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009 WO09129320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2009 E 09732865 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2276352**

54 Título: **Concentrado de proteínas de granos que contienen almidón: composición, método de fabricación y usos del mismo**

30 Prioridad:

15.04.2008 US 45277

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

07.09.2020

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF
AGRICULTURE (33.3%)**

**1400 Independence Avenue SW
Washington, DC 20250-0302, US;
MONTANA MICROBIAL PRODUCTS, INC. (33.3%) y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF IDAHO
(33.3%)**

72 Inventor/es:

BARROWS, FREDERIC, T.;
BRADLEY, CLIFFORD, A.;
KEARNS, ROBERT, D.;
WASICEK, BRIAN, D. y
HARDY, RONALD, W.

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 781 760 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Concentrado de proteínas de granos que contienen almidón: composición, método de fabricación y usos del mismo

5 Campo de la invención

Las modalidades de la invención se refieren a procesos para producir un concentrado de proteínas a partir de un grano o una semilla oleaginosa que contiene almidón y los usos del mismo. En una modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas producido mediante el uso de los procesos descritos comprende proteína de alta calidad, altamente digestible que es adecuada para su uso como pienso para acuicultura.

Antecedentes de la invención

La proteína es un componente esencial de la dieta de todos los animales domésticos y es necesaria para el crecimiento, el mantenimiento del cuerpo, la producción de crías y el rendimiento de carne y productos no cárnicos, por ejemplo, leche, huevos y lana. Por lo tanto, para la agricultura animal productiva, la proteína es esencial.

Las necesidades de proteína y, por lo tanto, de aminoácidos de la mayoría de los animales importantes desde el punto de vista agrícola se conocen bien en la técnica {véase por ejemplo, The Encyclopedia of Farm Animal Nutrition, M. F. Fuller (ed) 2004, Cabi Publishing). Como se conoce en la técnica, las necesidades varían según la especie y la edad de los animales. Por ejemplo, los pastos y el forraje pueden desempeñar un papel importante en el suministro a los rumiantes de sus necesidades de proteínas, porque la biota de los animales rumiantes sintetiza aminoácidos y proteínas de novo. Pero para algunas especies, por ejemplo, los peces, el suministro de una nutrición adecuada, especialmente proteínas adecuadas, tiene que provenir directamente de la dieta.

La cría de peces en la acuicultura presenta problemas nutricionales que son únicos entre los animales agrícolas. En particular, las raciones de proteínas en las dietas de los peces son apreciablemente más altas que las de las dietas de animales terrestres de sangre caliente. Por lo tanto, los piensos para acuicultura contienen característicamente un mayor por ciento de proteína que los piensos que se usan en la agricultura para alimentar, por ejemplo, aves de corral, cerdos y carne de res. Sin embargo, no es solo la cantidad de proteína lo que hace que los piensos para la acuicultura sean únicos, sino también el requisito de proteína de alta calidad {véase, por ejemplo, j. Vv. Hertrampf, y otros (2000) Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds, Kluwer Academic Publishers; and Nutrient requirements of Fish, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council National Academy Press (1993)}.

La acuicultura es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento en el mundo. Por lo tanto, abordar las necesidades de las prácticas de acuicultura promete mejorar la alimentación y la nutrición para el futuro de la humanidad. La mayor necesidad en acuicultura es proporcionar piensos que suministren suficiente proteína de alta calidad en una forma apetitosa.

Los piensos para acuicultura típicamente comprenden harina de pescado como fuente de proteína. Sin embargo, desafortunadamente, en los últimos años, el costo de la harina de pescado ha aumentado, se han planteado preocupaciones sobre los residuos de contaminantes tóxicos, por ejemplo, dioxina, en la harina de pescado, la regulación de los nutrientes en los efluentes de los criaderos se ha intensificado y han surgido preguntas sobre la sostenibilidad de la harina de pescado como ingrediente de pienso para peces. Por lo tanto, existe un mayor interés en encontrar alternativas a la harina de pescado que puedan usarse solas o en combinación con harina de pescado para proporcionar dietas nutritivas para la acuicultura {véase, por ejemplo, Hites, R. A. Y otros (2004) Science 303:226-229; Naylor. R. L. Y otros (2000). Nature 405:1017-1024}.

Hay muchas fuentes posibles de proteína para las raciones de acuicultura. La proteína de la dieta puede derivarse de una o ambas fuentes vegetales y animales, pero la elección de la fuente de proteína debe seleccionarse cuidadosamente para proporcionar proteína de alta calidad en una cantidad correcta y con el equilibrio apropiado de aminoácidos esenciales. La proteína debe ser digestible y por lo tanto, biodisponible para los peces, y finalmente, dado que los peces pueden ser comensales selectivos, las fuentes de proteínas también deben ser apetitosas.

Existen muchas fuentes posibles de proteína vegetal para las raciones de ganado y naturalmente, los granos y las proteínas derivadas de plantas se consideran como una alternativa a la harina de pescado en las dietas de acuicultura. Sin embargo, desafortunadamente, la concentración de proteína de las fuentes vegetales es típicamente más baja que la harina de pescado, le faltan aminoácidos esenciales, la digestibilidad de las proteínas puede ser pobre y la apetitosidad de los piensos preparados con proteínas derivadas de las plantas puede que no sea apetitosa para los peces. Debido a su concentración relativamente alta de proteína en relación con otras fuentes vegetales, la soja y la harina de soja se han evaluado ampliamente y ahora se usan en piensos para acuicultura, particularmente para especies no carnívoras de peces de cultivo, {véase, por ejemplo, Hardy, R. W. (2003) Use of Soybean Meals in Diets of Salmon and Trout. Technical Review Paper, Managed Aquaculture Program, United Soybean Board, American Soybean Association, disponible a través de: American Soybean Association Headquarters, 12125 Woodcrest Executive Drive. Suite 100 St. Louis, MO 63141-5009}. Sin embargo, la soja contiene compuestos antinutricionales, por ejemplo, fitato, y/o carbohidratos indigestibles, por ejemplo, oligosacáridos, y estos compuestos antinutricionales limitan el uso de proteínas derivadas de

la soja en piensos para acuicultura. Este es un problema particular con los piensos para especies como la trucha y el salmón (véase, por ejemplo, Knudsen, D., y otros (2007) *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55:2261-2267; Knudsen, D., y otros (2006). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54:6428-6435.

5 El documento WO 2006/119206 a2 describe un proceso de molienda húmeda de granos para producir etanol. El grano entero puede procesarse mediante (a) remojo del grano en un líquido acuoso para producir grano ablandado, (b) molienda del grano ablandado para producir grano molido, (c) licuado del grano molido tras ponerlo en contacto con amilasa y calentarlo a una temperatura de al menos alrededor de 50 °C, lo que produce un material licuado, (d) sacarificación al menos parcialmente del material licuado tras ponerlo en contacto con amiloglucosidasa a una temperatura de al menos
10 alrededor de 50 °C, lo que produce un primer material sacarificado, y (e) separación de la fibra y el germen del primer material sacarificado, lo que produce un material tamizado que es sustancialmente sin fibra ni germen. El proceso también incluye las etapas de (f) sacarificación adicional y fermentación del material tamizado con un microorganismo que produce etanol, lo que produce por consiguiente un caldo que comprende etanol, proteína soluble, y proteína insoluble, y (g) separación del etanol del caldo. Puede recuperarse un producto rico en proteínas del caldo que comprende gluten del
15 grano y microorganismos de la etapa de fermentación.

Los documentos WO 02/069738 a1 y JP s58 158148 a describen métodos para la producción de productos alimenticios fermentados, en particular productos de cereales fermentados de tipo tempeh mediante el uso de cereales integrales como materia prima, a saber, cebada o frijoles, nueces, granos, como la soja, etc., que se muelen, se tratan térmicamente,
20 se acidifican y se inoculan con *rhizopus*.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de fuentes de proteínas de alta calidad que se basan en vegetales que sean adecuadas para su uso en, entre otros, piensos para acuicultura. Afortunadamente, como quedará claro a partir de la siguiente descripción, la presente invención proporciona esta y otras necesidades.
25

Resumen de la invención

En una modalidad, la invención proporciona un proceso para producir un concentrado de proteínas a partir de un grano o semilla oleaginosa que contiene almidón, en donde el método comprende: (i) moler el grano que contiene almidón para producir un grano que contiene almidón molido; (ii) resuspender el grano que contiene almidón molido en agua; (iii) solubilizar el almidón y los glucanos con enzimas; (iv) añadir un organismo de fermentación a la suspensión, en donde el organismo de fermentación se selecciona de *Rhizopus Oryzae*, *Rhizopus Microsporus* y levadura; (v) fermentar la suspensión que comprende el organismo de fermentación hasta que se complete la fermentación, lo que produce por consiguiente una suspensión fermentada; (vi) separar la suspensión fermentada en fracciones sólida y líquida; (vii) recuperar las fracciones sólida y líquida; (viii) secar la fracción sólida recuperada a una temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas; lo que produce un concentrado de proteínas.
30
35

Solubilizar el almidón y los glucanos con enzimas produce glucosa.

40 En una modalidad ilustrativa, el proceso es un proceso sin cocción en donde el almidón granular crudo no gelatinizado se hidroliza a glucosa. En otra modalidad ilustrativa, el proceso es un proceso de cocción en donde una suspensión de almidón molido se calienta a una temperatura que gelatiniza los gránulos de almidón.

En una modalidad ilustrativa, el proceso comprende, además: destilar la fracción líquida recuperada para recuperar un producto de fermentación. En otra modalidad ilustrativa, el producto de fermentación es etanol. En otra modalidad ilustrativa, el grano que contiene almidón es un miembro seleccionado del grupo que consiste en cebada, trigo, avena, maíz, centeno, triticale y sorgo, o una combinación de los mismos. En otra modalidad ilustrativa, el grano que contiene almidón es una semilla oleaginosa que contiene almidón, por ejemplo, soja, lino, camelina. Por lo tanto, en otra modalidad ilustrativa, el grano que contiene almidón es un grano procesado, por ejemplo, una harina de semillas oleaginosas, por ejemplo, harina de soja. En una modalidad ilustrativa, el grano que contiene almidón es la cebada. En otra modalidad ilustrativa, la cebada es sin cáscara. En otra modalidad ilustrativa, la cebada se descascara mecánicamente.
45
50

La invención también proporciona un concentrado de proteínas preparado de acuerdo con un proceso para producir un concentrado de proteínas a partir de un grano que contiene almidón, en donde el proceso comprende: etapas (i) - (viii), y además comprende antes de la etapa (viii): (a) cultivar un microbio apropiado para proporcionar una masa celular en un medio de cultivo que comprende la fracción líquida recuperada en la etapa vii, y (b) recuperar la masa celular con los sólidos de grano, lo que proporciona por consiguiente un concentrado de proteínas que tiene una concentración de proteína aumentada, en donde el microbio es un miembro seleccionado del grupo formado por *Rhizopus Oryzae* y *Rhizopus Microsporus*. El concentrado de proteínas comprende proteína en una cantidad que está en un intervalo que está entre alrededor del 30 % de proteína y alrededor del 65 % de proteína en base seca.
55
60

La invención proporciona además un pienso para acuicultura que comprende el concentrado de proteínas preparado de acuerdo al proceso que se define en las reivindicaciones 1 y 12.

65 En otra modalidad ilustrativa, la invención proporciona un proceso para producir un concentrado de proteínas con una concentración de proteína incrementada a partir de un grano que contiene almidón o una semilla oleaginosa, en donde el

método comprende: descascarar el grano o usar una variedad sin cáscara, moler el grano que contiene almidón para producir un grano que contiene almidón molido; resuspender el grano que contiene almidón molido en agua; solubilizar el almidón y los glucanos con enzimas; añadir un organismo de fermentación a la suspensión; fermentar la suspensión que comprende el organismo de fermentación seleccionado de *Rhizopus Oryzae*, *Rhizopus Microsporus* y levadura hasta que se complete la fermentación, lo que produce por consiguiente una suspensión fermentada; separar la suspensión fermentada en fracciones sólida y líquida; recuperar las fracciones sólida y líquida; cultivar un microbio apropiado que proporcione una masa celular en un medio de cultivo que comprenda la fracción líquida recuperada, recuperar la masa celular con los sólidos del grano, y secar la fracción sólida recuperada a una temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas; lo que produce por consiguiente un concentrado de proteínas.

La invención proporciona un método para producir un concentrado de proteínas con una concentración de proteína aumentada a partir de un grano que contiene almidón, el método comprende: moler el grano que contiene almidón para producir un grano que contiene almidón molido; resuspender el grano que contiene almidón molido en agua; solubilizar el almidón y los glucanos con enzimas; añadir un organismo apropiado seleccionado para la producción de masa celular a la suspensión; fermentar la suspensión que comprende el organismo seleccionado de *Rhizopus Oryzae*, *Rhizopus Microsporus* y levadura hasta que se complete la fermentación, lo que produce por consiguiente una suspensión en la que los azúcares solubles se han convertido en masa celular; separar la suspensión en fracciones sólida y líquida; recuperar las fracciones sólida y líquida; recuperar la masa celular con los sólidos del grano, y secar la fracción sólida recuperada a una temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas; lo que produce por consiguiente un concentrado de proteínas con una mayor concentración de proteínas.

En una modalidad ilustrativa, el microbio apropiado es un miembro seleccionado del grupo que consiste en *Rhizopus Oryzae* y *Rhizopus Microsporus*. En otra modalidad ilustrativa, la invención proporciona un concentrado de proteínas preparado por el método. En aún otra modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas preparado por el método es un concentrado de proteínas de soja con fitato reducido o eliminado y factores antinutricionales reducidos o eliminados.

Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 Es un diagrama de flujo que ilustra en el lado izquierdo, la producción de etanol mediante el uso de procesos comerciales estándar de molienda en seco. El lado izquierdo del diagrama de flujo ilustra el proceso de cocción convencional que se usa para convertir el almidón en azúcares fermentables. El lado derecho ilustra el proceso para un proceso convencional "sin cocción".

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra en el lado izquierdo, la producción de un concentrado de proteínas y la producción de etanol mediante el uso de los procesos descritos. El lado izquierdo del diagrama de flujo ilustra el proceso de cocción. El lado derecho ilustra el proceso para un proceso convencional "sin cocción".

La Figura 3 muestra el efecto de sustituir harina de pescado o concentrado de proteínas de soja con concentrado de proteínas de cebada.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "concentrado de proteínas" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas que están aisladas de su fuente nativa, por ejemplo, proteínas aisladas de un grano o semilla oleaginosa que contiene almidón. Típicamente, las proteínas aisladas están en una forma más concentrada que en su estado nativo.

El término "grano que contiene almidón" como se usa en la presente descripción se refiere a granos que proporcionan fuentes de carbohidratos, típicamente en forma de almidón. Los ejemplos ilustrativos de granos que contienen almidón incluyen, pero no se limitan a granos de cereal y semillas o "seudocereales". El término "grano de cereal" se usa convencionalmente en la presente descripción y se refiere generalmente al grano comestible de los miembros de la familia de las gramíneas. Los granos de cereal ilustrativos de plantas de la familia de las gramíneas incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, avena, cebada, trigo, maíz, lino, lúpulo, arroz, centeno, sorgo, mijo, triticale, etc. Los "granos que contienen almidón" de semillas o "seudocereales" ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, trigo sarraceno de quinua, amaranto, etc. Los "granos que contienen almidón" de semillas oleaginosas ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, soja, lino, girasol, semilla de algodón, camelina, etc. De hecho, el frijol de soja y la harina de soja preparados mediante el uso de los métodos que se describen en la presente descripción proporcionan una proteína de soja de alta calidad en donde los oligosacáridos y el fitato antinutricionales se reducen o eliminan en comparación con la harina de proteína de soja preparada mediante métodos mecánicos.

El término "semilla oleaginosa", como se usa en la presente descripción, se refiere a semillas que comprenden un contenido de aceite relativamente alto de modo que puedan procesarse fácilmente para proporcionar aceite vegetal. Aunque las semillas oleaginosas, por ejemplo, la soja, la canola, el girasol, el lino, etc., se usan comúnmente en la

producción de aceites vegetales, las semillas oleaginosas también comprenden carbohidratos en forma de almidón o azúcares simples y, por lo tanto, son un "grano que contiene almidón" como se define en la presente descripción. Como tales, son adecuados para su uso en la preparación de un concentrado de proteínas vegetales.

5 El término "almidón" como se usa en la presente descripción se refiere a un compuesto de carbohidrato que tiene la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde el subíndice "n" indica el número total de unidades de monómero de glucosa. Típicamente, los almidones comprenden los polisacáridos amilosa y amilopectina. El polisacárido de amilosa comprende principalmente
10 unidades de monómero de glucosa unidas entre sí mediante 4 enlaces β -1. La amilosa típicamente se considera una molécula lineal, sin embargo, a veces se encuentra alguna ramificación menor. Típicamente, los polímeros de amilosa varían en longitud entre alrededor de 500 y alrededor de 20 000 unidades de monómero de glucosa, pero es posible cualquier longitud. La amilopectina también comprende unidades de monómero de glucosa, pero generalmente no se considera una molécula estrictamente lineal. En cambio, el polisacárido comprende 4 monómeros de glucosa unidos en β -1, entremezclados a intervalos con ramas formadas por monómeros de glucosa en el enlace β 1,6 {véase, por ejemplo, *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 41: *Starch: Basic Science to Biotechnology*, Mirta Noemi Sivak y Jack Preiss eds. Academic Press (1998)

El contenido relativo de amilosa y amilopectina en el almidón puede variar. Típicamente, la amilosa comprende de alrededor del 20 % a alrededor del 25 % a alrededor del 30 % del almidón, pero también puede estar presente en concentraciones más altas. Por ejemplo, el "almidón de maíz rico en amilosa" (HACS) comprende al menos alrededor del
20 40 % de amilosa, y en algunas modalidades comprende alrededor del 50 %, alrededor del 55 %, alrededor del 60 %, alrededor del 65 %, alrededor del 70 %, alrededor del 75 % de amilosa, y en otras modalidades comprende alrededor del 80 % de amilosa o alrededor del 85 % de amilosa. La amilopectina, por otro lado, típicamente comprende alrededor del 70 % a alrededor del 75 %, a alrededor del 80 % de almidón, pero también puede estar en proporciones más altas o en proporciones más bajas, por ejemplo, el almidón de maíz ceroso puede comprender más del 99 % de amilopectina, y el HACS puede comprender tan poco como 15 % de amilopectina o menos.

El almidón se encuentra en casi todos los tipos de tejidos vegetales, que incluyen, pero no se limitan a, los frutos, semillas, tallos, hojas, rizomas y/o tubérculos. Por lo tanto, muchos almidones son almidones derivados de plantas o "almidón vegetal". Por lo general, el almidón producido en los Estados Unidos se deriva del maíz, las papas, el arroz y el trigo. Sin embargo, los almidones útiles pueden provenir de cualquier fuente, por ejemplo, algas marinas y otras macroalgas, microalgas unicelulares; arrurruz; goma de guar; algarroba; tapioca; arracacha; alforfón; plátano; cebada; mandioca; konjac; kudzu; oca; sagú; sorgo; batata; malanga, ñames; soja, y frijoles, por ejemplo, habas, lentejas y guisantes.

El término "almidón", como se usa en la presente descripción, también se refiere a "almidón modificado" que se ha modificado por intervención humana de modo que difiere de la forma cruda, no modificada que se extrae de una planta. Por ejemplo, el almidón puede modificarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante entrecruzamiento químico y/o mediante estabilización a través de la introducción de grupos aniónicos en el gránulo de almidón.

El término "acuicultura", como se usa en la presente descripción, se refiere a la cría de organismos acuáticos, por ejemplo, peces, moluscos, crustáceos, etc., con algún tipo de intervención en el proceso de cría para facilitar la producción, por ejemplo, almacenamiento regular, alimentación, protección contra los depredadores, etc.

El término "resuspender", como se usa en la presente descripción, se refiere a combinar una sustancia sólida o semisólida con un líquido y mezclar para formar una mezcla más o menos homogénea. Así, la frase "resuspender el grano que contiene almidón molido" se refiere a mezclar el grano que contiene almidón molido, por ejemplo, cebada, con un líquido, por ejemplo, agua, para formar una mezcla más o menos homogénea.

El término "fermentación" como se usa en la presente descripción se refiere a la conversión de un "sustrato de fermentación", por ejemplo, un carbohidrato, por ejemplo, un almidón, azúcar, etc., en un "producto de fermentación", por ejemplo, un ácido o un alcohol. En una modalidad ilustrativa, la fermentación usa un hongo para convertir un azúcar en un alcohol. En otra modalidad ilustrativa, la fermentación usa una bacteria para convertir un azúcar en un ácido. En otra modalidad ilustrativa, la fermentación se lleva a cabo en un ambiente anaeróbico. En aún otra modalidad ilustrativa, la fermentación se lleva a cabo en un ambiente aeróbico.

El término "organismo de fermentación" como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier organismo que, en condiciones apropiadas, por ejemplo, condiciones anaeróbicas, es capaz de fermentar un sustrato de fermentación, por ejemplo, glucosa. Dicho organismo de fermentación es un hongo, por ejemplo, *Saccharomyces Cerevisiae*, *Pichia Stipitis*, *Rhizopus Oryzae*, *Rhizopus Microsporus*. Otro organismo de fermentación que puede usarse es una bacteria, por ejemplo, *Zymomonas mobilis*. En el proceso de la invención, los organismos fermentadores son *Rhizopus Oryzae*, *Rhizopus Microsporus* y *Saccharomyces Cerevisiae*.

La expresión "fermentar hasta que se complete la fermentación", como se usa en la presente descripción, se refiere a la fermentación hasta que al menos la mayor parte del sustrato de fermentación se haya convertido en producto de fermentación.

La expresión "secado a una temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas" como se usa en la presente descripción, se refiere a temperaturas que son más bajas que las que se sabe que causan que las proteínas se desnaturalicen. En una modalidad ilustrativa, una "temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas" es una temperatura inferior a alrededor de 100 °C, por ejemplo, alrededor de 20 °C, alrededor de 25 °C, alrededor de 30 °C, alrededor de 40 °C, alrededor de 50 °C, alrededor de 60 °C, alrededor de 70 °C, alrededor de 80 °C o alrededor de 90 °C. En otra modalidad ilustrativa, una "temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas" es una temperatura que está en un intervalo que está entre alrededor de 40 °C y alrededor de 100 °C. Por lo tanto, en algunas modalidades ilustrativas, una "temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas" es una temperatura que es de alrededor de 40 °C, alrededor de 50 °C, alrededor de 60 °C, alrededor de 70 °C, alrededor de 80 °C, alrededor de 90 °C, o alrededor de 100 °C.

El término "producto de fermentación", como se usa en la presente descripción, se refiere a una sustancia o producto que se produce por fermentación. En una modalidad ilustrativa, un producto de fermentación es un alcohol, por ejemplo, etanol, metanol, butanol. En otra modalidad ilustrativa, un producto de fermentación es un antibiótico, por ejemplo, penicilina. En otra modalidad ilustrativa, un producto de fermentación es un aminoácido. En otra modalidad ilustrativa, un producto de fermentación es un ácido orgánico, por ejemplo, ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico.

El término "beta glucano" como se usa en la presente descripción se refiere a un compuesto de carbohidrato que tiene la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde el subíndice "n" indica el número total de unidades de monómero de glucosa con las unidades de monómero de glucosa unidas por enlaces beta 1,3.

I. Introducción:

En una modalidad ilustrativa, la invención proporciona un proceso para producir un concentrado de proteínas a partir de un grano que contiene almidón. Por lo tanto, en una modalidad ilustrativa, la invención proporciona un concentrado de proteínas altamente digestible, de alta calidad que, en una modalidad ilustrativa, es adecuado para su uso en la preparación de piensos para acuicultura.

En una modalidad ilustrativa, el proceso se optimiza para la producción de proteínas y usa granos sin cáscara. Típicamente, los granos sin cáscara se muelen, se mezclan con agua para producir un puré, que después puede procesarse de acuerdo con un proceso de cocción o sin cocción.

El puré se trata enzimáticamente para hidrolizar el almidón y los beta glucanos (si están presentes), lo que libera por consiguiente proteínas insolubles y produce azúcares fermentables, principalmente glucosa. Ya sea simultáneamente, o posteriormente, el puré tratado enzimáticamente se fermenta para producir etanol. Después de la fermentación, pero antes de la destilación, la fracción líquida y la fracción sólida que comprende la proteína, se separan, por ejemplo, mediante centrifugación. La fracción sólida que contiene proteínas se seca a temperaturas que no exceden los 100 °C. En una modalidad ilustrativa, la fracción líquida se usa como materia prima de fermentación para la producción de etanol. En otra modalidad ilustrativa, la fracción líquida se usa para la producción de otros productos de fermentación, por ejemplo, metanol, ácido cítrico, aminoácidos, etc. Por lo tanto, el proceso produce una materia prima de fermentación, y también un concentrado de proteínas, en donde la proteína que comprende el concentrado de proteínas es una proteína de alta calidad, altamente digestible, adecuada para su uso en piensos para acuicultura.

II. Producción de concentrado de proteínas

A. Granos

Cebada

La cebada es un cultivo de temporada corta, y maduración temprana que se cultiva comercialmente tanto en ambientes de regadío como en tierras secas. La cebada es resistente a la sequía, las inundaciones y las heladas, por lo que se adapta bien a muchos tipos diferentes de ambientes de cultivo. Debido a su adaptabilidad y la capacidad de tolerar una amplia gama de condiciones ambientales, la cebada puede cultivarse en muchas regiones del mundo donde puede ser difícil o imposible cultivar otros tipos de cereales.

En una modalidad ilustrativa, el proceso que se describe en la presente descripción para producir un concentrado de proteínas usa cebada como el grano que contiene almidón. Puede usarse cualquier variedad de cebada, por ejemplo, con cáscara o sin cáscara (véase, por ejemplo, Cereal Chemistry 76:589-599).

En una modalidad ilustrativa, el proceso usa una variedad de cebada con cáscara. Las variedades de cebada "con cáscara" o equivalentemente "cubiertas" producen granos con una cáscara exterior no comestible resistente. Típicamente, la cáscara o cascarilla exterior resistente se retira antes de su uso en los métodos que se describen en la presente descripción. La "cebada descascarada" se prepara por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, mediante el uso de una descascaradora vertical) y se refiere a granos de cebada a los que se les ha quitado la cáscara exterior, pero que todavía tienen el germen y la capa externa de salvado. Por lo tanto, en una modalidad ilustrativa, los granos de cebada con cáscara se descascarar primero mediante el uso de técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

La cebada "descascarada" puede procesarse adicionalmente para retirar la capa de salvado y por consiguiente proporcionar una cebada descascarada adicional que se denomina en la técnica "cebada perlada". En una modalidad ilustrativa, la "cebada perlada" se procesa por los métodos que se describen en la presente descripción. Sin embargo, en esta modalidad, el proceso de perlado extrae parte de la proteína que de otro modo podría recuperarse mediante el uso de los métodos que se describen en la presente descripción.

Aunque la cebada con cáscara típicamente se descascara, en otra modalidad ilustrativa, la "cebada con cáscara" se procesa de acuerdo con los métodos que se describen en la presente descripción sin retirar la cáscara o cascarilla exterior resistente. En esta modalidad, se obtiene un concentrado de proteínas más fibroso.

En una modalidad ilustrativa, la cebada es una variedad de cebada sin cáscara.

La cebada sin cáscara se usa típicamente sin descascarar antes de su uso. En una modalidad ilustrativa, la variedad de cebada sin cáscara es merlin.

Por lo tanto, la cebada procesada como se describe en la presente descripción es una fuente útil de proteína vegetal para su uso en piensos para acuicultura. De hecho, como se describe en, por ejemplo, el ejemplo 6, el concentrado de proteínas de cebada preparado como se describe en la presente descripción es apetitoso para un pez, por ejemplo, la trucha. Además, el concentrado de proteínas de cebada preparado como se describe en la presente descripción sustenta tasas de crecimiento de trucha comparables a los piensos a base de harina de pescado, véase, por ejemplo, el ejemplo 7.

Otros granos que contienen almidón

Pueden usar otros granos para preparar concentrados de proteínas mediante los procesos descritos. En una modalidad ilustrativa el grano que contiene almidón es avena. De hecho, en una modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas de avena que tiene al menos alrededor del 47 % de concentración de proteína se prepara de acuerdo con el proceso.

En otra modalidad ilustrativa, el grano que contiene almidón es trigo. En una modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas de trigo que contiene al menos alrededor de 31 % de proteína se prepara de acuerdo con el proceso.

En otra modalidad ilustrativa más, el grano que contiene almidón es soja. El concentrado de proteínas de soja que se prepara de acuerdo con los métodos que se describen en la presente descripción típicamente es sin los oligosacáridos y fitatos antinutricionales que comprenden la harina de soja y los concentrados de soja producidos por otros métodos. Sin limitarse a la teoría, se cree que la acción enzimática de los microbios/microorganismos de fermentación seleccionados que se usan en el proceso es responsable de la eliminación/reducción de fitatos y oligosacáridos antinutricionales. Los microbios/microorganismos ilustrativos cuyo uso en el proceso da como resultado una reducción/eliminación del fitato incluyen, por ejemplo, *Rhizopus Oryzae* y *Rhizopus Microsporus*. Además de eliminar ciertos compuestos antinutricionales de los concentrados de proteína de soja, los métodos que se describen proporcionan un concentrado de proteínas de soja que tiene una concentración de proteína más alta que la de la harina de soja típica. De hecho, el concentrado de proteínas de soja preparado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente descripción comprende típicamente entre alrededor del 54 % y alrededor del 62 % de proteína. En una modalidad ilustrativa, se prepara un concentrado de proteínas de soja que contiene alrededor del 57 % de proteína de acuerdo con el proceso.

Aunque los métodos que emplean fraccionamiento mecánico pueden producir concentrados de proteína de soja que contienen un 70 % de proteína, no se ha apreciado hasta ahora que un proceso enzimático/biológico podría producir un concentrado de proteínas de soja que tenga una alta concentración (típicamente entre alrededor del 54 % y alrededor del 62 %) de proteínas. Dado que el proceso biológico descrito en la presente descripción es menos costoso que otros métodos conocidos en la técnica, el proceso descrito en la presente descripción proporciona un concentrado de proteínas de soja con alto contenido proteico a un costo reducido.

En general, cualquier grano o semilla oleaginosa que contenga almidón, por ejemplo, cebada, trigo, maíz, triticale, milo (grano de sorgo), avena, centeno, mijo, soja, etc., puede usarse para preparar un concentrado de proteínas de acuerdo con el proceso de preparación de un concentrado de proteínas descrito en la presente descripción.

B. Preparación de granos que contienen almidón

Descascarado

En una modalidad ilustrativa, el proceso descrito para producir un concentrado de proteínas incorpora una etapa de descascarado. En una modalidad ilustrativa, el descascarado usa un equipo de descascarado estándar disponible comercialmente (véase, por ejemplo, R. D. Reichert y otros (2006) Journal of Food Science 49(1): 267 - 272).

Cualquier método de molienda que retire y separe la cáscara del resto del grano es adecuado para su uso en los métodos que se describen en la presente descripción. En una modalidad ilustrativa, el descascarado se realiza en un molino mediante el uso de piedras abrasivas giratorias, barras de resistencia y tamiz. La cáscara y el polvo del proceso de

molienda se extraen mediante tamizado y aspiración a los colectores de polvo. Como apreciará el experto en la técnica, el grado de descascarado o perlado está en función de la altura, la velocidad y el grano de las piedras abrasivas.

Aunque los granos que contienen almidón pueden procesarse para proporcionar un concentrado de proteínas sin descascarar primero el grano, el descascarado extrae la fibra que de otro modo terminaría en el concentrado de proteínas. En una modalidad ilustrativa, un concentrado de proteínas preparado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente descripción se usa para la preparación de un pienso para acuicultura. Dado que la fibra es típicamente indigestible por los peces, se desea descascarar el grano que contiene almidón, por ejemplo, los granos de cebada, al menos en un grado en donde se quita la cáscara (cascarilla) y se deja el salvado unido al grano, antes de preparar un concentrado de proteínas para uso en piensos para acuicultura.

En una modalidad ilustrativa, el descascarado extrae entre al menos alrededor del 60 % y alrededor del 100 % de la cáscara del grano. En otra modalidad ilustrativa, el descascarado extrae al menos alrededor del 75 % de la cáscara del grano. En otra modalidad ilustrativa, el descascarado extrae al menos alrededor del 85 % de la cáscara del grano. En aún otra modalidad ilustrativa, el descascarado extrae al menos alrededor del 95 % de la cáscara del grano.

En otra modalidad ilustrativa, el proceso descrito para producir un concentrado de proteínas usa una variedad de grano sin cáscara, por ejemplo, una variedad de cebada sin cáscara, lo que evita por consiguiente una etapa de descascarado.

Molienda

Cualquier método conocido en la técnica que reduzca el tamaño de partícula del grano puede usarse para moler el grano o semilla oleaginosa que contiene almidón. En una modalidad ilustrativa el tamaño de partícula del grano se consigue mediante el uso de un molino de martillos. En otra modalidad ilustrativa el tamaño de partícula del grano se consigue mediante el uso de un molino de rodillos. Los molinos de martillo y de rodillo se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Kim Koch, Hammermills and Roller Mills, Kansas State University, mayo de 2002).

En una modalidad ilustrativa, un molino de martillos estándar se opera con un tamaño de tamiz para moler grano en donde al menos alrededor del 50 % o más del grano molido pasa un tamiz de 20 mallas estadounidenses estándar. Sin embargo, en algunas modalidades ilustrativas, se usa un grano molido más grueso. En una modalidad ilustrativa, un molino de martillos estándar operado con un tamaño de tamiz para moler grano en donde al menos alrededor del 50 % o más del grano molido pasa un tamiz de 16 mallas estadounidenses estándar. En otras modalidades ilustrativas, se usa un grano molido en donde al menos alrededor del 50 % o más del grano molido pasa un tamiz de 10 mallas estadounidenses estándar. En aún otras modalidades ilustrativas, se usa una harina molida muy fina, por ejemplo, en donde al menos alrededor del 50 % o más del grano molido pasa un tamiz con aberturas menores de 20 mallas estadounidenses estándar.

C. Procesamiento de granos para preparar una suspensión de granos

Una suspensión de granos se prepara típicamente a partir del grano que contiene almidón. Típicamente, el grano que contiene almidón molido se resuspende con agua hasta un contenido total de sólidos de entre alrededor del 10 % a alrededor del 40 %. El concentrado de proteínas se prepara a partir de la suspensión mediante el uso de una de las varias opciones de proceso que se describen en la presente descripción a continuación.

Contenido de sólidos del puré

En una modalidad ilustrativa, el puré se prepara con un contenido de sólidos tan alto en el puré como sea posible sin reducir el rendimiento del producto o la eficiencia de conversión. Típicamente, la viscosidad del puré es el factor que limita el por ciento máximo de sólidos en el puré y el contenido de sólidos varía con el grano; por ejemplo, la cebada produce típicamente un puré más viscoso que el maíz. En general, la viscosidad del puré tiene un intervalo superior de entre alrededor de 2500 centipoises (cp) a alrededor de 5000 cp. Cp, es decir, de alrededor de 2,5 a alrededor de 5 pascales. El experto en la técnica apreciará el contenido de sólidos apropiado para su solicitud particular.

En una modalidad ilustrativa, se prepara un puré de cebada que comprende una concentración de sólidos de alrededor del 35 % en peso/volumen en agua. En otra modalidad ilustrativa, el máximo que puede lograrse con agitación efectiva y transferencia de calor mediante el uso del equipo disponible. Típicamente, el intervalo para el puré de cebada está entre alrededor del 10 % y alrededor del 40 % en peso/volumen. Con granos distintos de la cebada que contienen almidón, el contenido de sólidos está típicamente entre alrededor del 10% y alrededor del 50% en peso/volumen.

Afortunadamente, sin embargo, el contenido total de sólidos puede ser superior a alrededor del 40 % en el caso de la cebada, o superior al 50 % en el caso de otros granos que contienen almidón cuando se usa un sistema discontinuo para preparar el puré. De hecho, en una modalidad ilustrativa, se emplea un sistema discontinuo para proporcionar un puré de cebada que comprende alrededor del 60 % en peso/volumen de contenido de sólidos. Sin limitarse a la teoría, se cree que pueden añadirse más granos que contienen almidón, por ejemplo, cebada ya que el almidón se convierte en azúcares solubles y alcohol. En los sistemas discontinuos, la hidrólisis enzimática reduce la viscosidad, lo que permite por consiguiente añadir grano adicional al puré.

D. Procesamiento de puré en suspensión

1. Proceso de cocción

5 En una modalidad, la suspensión se ajusta a un pH de 5 a 7. Después, se calienta la suspensión y se mantiene a una temperatura que está entre alrededor de 80 °C y alrededor de 125 °C durante de 5 minutos a 24 horas. Puede usarse cualquier medio conocido en el procesamiento de granos para calentar y retener la suspensión, por ejemplo, tanques de dosificación calentados por inyección de vapor o intercambiadores de calor, cocinas de chorro, calentadores de agua que alimentan los tanques de retención, etc. Se añade una alfa amilasa resistente al calor (por ejemplo, de *Bacillus Licheniformis*) en una cantidad suficiente para hidrolizar el almidón a dextrinas solubles. Los métodos para medir dextrinas solubles se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, L. Serre y C. Lauriere (1990) *Analytical Biochemistry* 186(2): 312-315).

15 La alfa amilasa resistente al calor puede ser cualquier alfa amilasa resistente al calor disponible comercialmente, y se usa típicamente según lo que recomienda el fabricante. En una modalidad ilustrativa, la alfa amilasa resistente al calor Termamyl® SC de Novozymes se añade en una cantidad igual a 0,025 a 0,05 % del peso del grano. Las muestras de fermentación pueden analizarse para determinar la cantidad y la composición del almidón restante para establecer una línea de base consistente con el tiempo o la viscosidad.

20 Después del calentamiento, la suspensión se enfría a al menos alrededor de 70 °C o menos, y el pH se ajusta a un pH que está entre alrededor de pH 5 y alrededor de pH 7. La glucoamilasa se añade al puré cocido enfriado en una cantidad suficiente para hidrolizar las dextrinas solubles en glucosa. La glucoamilasa puede ser cualquier glucoamilasa disponible comercialmente o producida en casa. La glucoamilasa disponible comercialmente se añade típicamente a una temperatura y en una cantidad de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En una modalidad ilustrativa, el combustible de glucoamilasa Spirizyme® de Novozymes se añade en una cantidad igual a 0,04 a 0,06 % del peso del grano.

30 En algunas modalidades ilustrativas, los granos que contienen almidón, por ejemplo, cebada, comprenden beta glucanos. Por lo tanto, en algunas modalidades ilustrativas, también se añaden enzimas beta glucosidasas. En general, la beta glucosidasa se añade en una cantidad y bajo condiciones de temperatura y pH consistentes con las recomendaciones del fabricante, de modo que sea suficiente para hidrolizar esencialmente todos los beta glucanos presentes. Los métodos para medir beta glucanos se conocen en la técnica {véase, por ejemplo, Maximov, V. I. Y otros (1975) *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 11(3): 455-459, EP0709681, etc). En una modalidad ilustrativa, la beta glucanasa Viscozyme® I de Novozymes se añade en una cantidad entre 0,1 y 0,3 % del peso del grano.

35 La suspensión que comprende las enzimas glucoamilasa y beta glucanasa se mantiene típicamente a una temperatura de entre alrededor de 35 °C a alrededor de 70 °C durante un período de hasta alrededor de 12 horas y se enfría de 20 °C a 35 °C, o hasta que se obtenga un intervalo de viscosidad de alrededor de 100 cp a alrededor de 1000 cp (alrededor de 01, a alrededor de 10 pascales). Una viscosidad de 100-1000 cp es un indicador de que todo el almidón se ha convertido en azúcar. La cocción y la hidrólisis enzimática de almidón a glucosa también pueden controlarse tras analizar la glucosa mediante cualquier método de análisis estándar, como por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución. Las enzimas glucanasa y beta glucosidasa pueden ser cualquier preparación disponible comercialmente, por ejemplo, preparaciones enzimáticas de Novozymes o Genencore. Típicamente, la cantidad de enzima usada se estima sobre la base de la carga de sólidos y el contenido de almidón/glucano del grano que contiene almidón, por ejemplo, cebada. En general, la dosificación de la enzima se selecciona de tal manera que sea suficiente para solubilizar esencialmente todo el almidón y los glucanos. Por lo tanto, un experto en la técnica apreciará la dosificación de la enzima apropiada para su aplicación particular.

50 Cocción del puré

En la cocción del puré, se emplea adecuadamente cualquier sistema que aumente la temperatura del puré al menos hasta el punto de gelatinización del almidón del grano. Típicamente, las temperaturas de gelatinización del almidón varían en dependencia del tipo y la fuente de almidón y pueden determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Li F. -D.; y otros (2004) *J. Food Eng.* 62 (2): 113-120). La mayoría de los almidones derivados de granos típicamente comienzan a gelatinizarse a alrededor de 65 °C, mientras que los almidones de papa generalmente comienzan a gelatinizarse a temperaturas de alrededor de 51 °C. En el proceso de cocción, el intervalo de temperaturas puede variar de 65 °C a 140 °C. El intervalo de temperatura preferido para nuestro proceso es de 90 °C a 120 °C. El intervalo de temperatura es lo suficientemente alto como para impedir o matar los microbios contaminantes, las enzimas amilasa todavía funcionan, pero lo suficientemente bajo como para que las moléculas de proteína no se alteren. En el proceso "sin cocción", no es necesario calentar el almidón a temperaturas de gelatinización.

65 Los sistemas de cocción pueden ser tanques de dosificación o flujo continuo mediante el uso de "cocinas de chorro". En una modalidad ilustrativa, un proceso a escala comercial que emplea cebada se cocina con una cocina de chorro del tipo empleado habitualmente en la producción de etanol en molino seco. La cocina de chorro se opera para alcanzar de 80 °C a 120 °C y para alimentar un tanque de retención o recipientes para mantener de 80 °C a 100 °C durante al menos 1 hora.

El desarrollo del proceso empleó un tanque de dosificación equipado con serpentines de vapor para el calentamiento y la agitación que cocina el puré a 90 °C.

Licuefacción enzimática de puré cocido

5 En una modalidad ilustrativa, se usa una alfa amilasa resistente a la temperatura y al ácido para solubilizar y/o licuar el almidón gelatinizado. Las enzimas alfa amilasas resistentes a la temperatura y al ácido típicamente toleran hasta 110 °C y típicamente tienen un pH óptimo en el intervalo de alrededor de 4 a alrededor de 6. Algunas enzimas alfa amilasa resistentes a la temperatura y a los ácidos adecuadas para su uso con puré de granos cocidos incluyen, pero no se limitan a Genencor ZPEZYME FRED, Novozymes Liquozyme®. En una modalidad ilustrativa, un puré de cebada se ajusta a un pH de alrededor de pH 5 y el puré se calienta a una temperatura que está en un intervalo que es entre alrededor de 90 °C a alrededor de 105 °C, y se añade alfa amilasa en una relación de enzima a almidón que coincide con la recomendación del fabricante para la tasa de dosis. Puede usarse cualquier enzima alfa amilasa en el proceso, lo que incluye la enzima preparada mediante el cultivo de un microorganismo seleccionado en un proceso separado pero paralelo en el sitio o en otro lugar {véase, por ejemplo, WO 1989/012679; patente de Estados Unidos 4,536,477; Aehle, Wolfgang ed Enzymes in Industry: Production and Applications. Wiley-VCH, 2007) o alfa amilasa comprada a proveedores comerciales.

Sacarificación enzimática de puré licuado cocido

20 En una modalidad ilustrativa, se usa una glucoamilasa con actividad de hasta 70 °C. En una modalidad ilustrativa, Genecor Distillase o Novozymes Spiritzyme son glucoamilasas disponibles comercialmente adecuadas para su uso en el proceso. En una modalidad ilustrativa, un puré de cebada cocido se enfría a alrededor de 65 °C, se ajusta el pH y se añade la enzima a una tasa de dosis consistente con la recomendación del fabricante. El puré se mantiene durante un período de alrededor de unos pocos minutos a alrededor de 24 horas a una temperatura de alrededor de 50 °C a alrededor de 70 °C y después se enfría a una temperatura de fermentación de 20 °C a 35 °C. Puede usarse cualquier glucoamilasa en el proceso lo que incluye la glucoamilasa producida por un microorganismo seleccionado en un proceso paralelo separado en el sitio de producción de proteínas o en cualquier otro lugar, mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 4,536,477).

30 Hidrólisis de beta glucano

En una modalidad ilustrativa, el proceso usa cebada y emplea beta glucanasas para hidrolizar los beta glucanos de la cebada a glucosa. La hidrólisis de beta glucanos reduce la viscosidad, solubiliza los carbohidratos, lo que aumenta por consiguiente la concentración de proteínas y el rendimiento de etanol. Las beta glucanasas se añaden a la temperatura y pH recomendados por los fabricantes. Las beta glucanasas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a Genencor Optimash y Novozymes Viscozyme. Sin embargo, cualquier beta glucanasa puede usarse en el proceso, lo que incluye la beta glucanasa producida por un microorganismo seleccionado en un proceso paralelo separado en el sitio de producción de proteínas o en cualquier otro lugar, como se conoce en la técnica. En una modalidad ilustrativa, se añade beta glucanasa después de que el puré cocido se enfría a la temperatura apropiada. En otra modalidad ilustrativa, se añade beta glucanasa al puré antes de la cocción para reducir la viscosidad del puré.

Fermentación de puré cocido, sacarificado

45 Después de la adición de glucoamilasa y beta glucanasa, el puré se enfría aún más a 35 °C y se añade cultivo de levadura para iniciar la fermentación. En una modalidad ilustrativa, la temperatura de fermentación es de alrededor de 35 °C. En otra modalidad ilustrativa, la temperatura de fermentación está en un intervalo que es entre alrededor de 15 °C y alrededor de 40 °C. En una modalidad ilustrativa, el pH es de alrededor de 4,0. En otras modalidades ilustrativas el pH varía dentro de un intervalo que está entre alrededor de 3,3 y alrededor de 7.

50 En algunas modalidades ilustrativas, el organismo de fermentación es una levadura que produce etanol a partir de glucosa, por ejemplo, *Saccharomyces Cerevisiae* (véase, por ejemplo, Frelot, D., y otros (1982) *Biotechnology Letters* 4(ii): 705-708). En algunas modalidades ilustrativas, el organismo de fermentación es una bacteria que produce etanol u otros productos de fermentación a partir de glucosa, por ejemplo, *Zymomonas*. En una modalidad ilustrativa, se usa levadura con fermentación rápida y tolerancia hasta 12 % peso/peso de etanol en la cerveza de fermentación. Típicamente, las levaduras se preparan en un cultivo de inóculo de aproximadamente el 1 % del volumen de puré. El cultivo de inóculo se cultiva en un caldo de nutrientes durante 24 horas a una densidad celular de alrededor de 100 millones por ml. Cuando se añade al puré sacarificado, la densidad celular inicial de la levadura es típicamente de alrededor de un millón por ml. Sin embargo, puede usarse una amplia gama de cepas de levadura y procedimientos de inóculo en el proceso siempre que el procedimiento de levadura e inóculo seleccionado dé como resultado una conversión aceptable de glucosa a etanol. En una modalidad ilustrativa, la fermentación se inocula directamente con preparaciones de levadura seca disponibles comercialmente. La fermentación se mantiene de 15 °C a 40 °C o preferentemente a 35 °C hasta que se complete la conversión máxima de glucosa y otros azúcares fermentables en etanol. La integridad de la fermentación puede controlarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante muestreo y análisis de la concentración de etanol (véase, por ejemplo, Hyun-Beom Seo y otros (2009) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 36:285-292) o por ensayo para almidón residual y azúcares solubles (véase, por ejemplo, Vidal, Bernardo C. y otros (2009) *Cereal Chemistry* 86(2): 133-135; Saglio, P. H y Pradet, a. (1980) *Plant Physiol.* (1980) 66:516-519) en el puré fermentado. El

tiempo de fermentación variará con la carga inicial de sólidos del grano y el contenido de almidón disponible. En una modalidad ilustrativa, cebada con 35 % de sólidos, hasta una concentración final de etanol de fermentación de 8 a 12 % peso/peso, el tiempo de fermentación es de 48 a 60 horas. El intervalo de tiempo de fermentación varía típicamente entre alrededor de 8 y alrededor de 72 horas. En algunas modalidades ilustrativas, el organismo que se añade al puré sacarificado cocido es un hongo, por ejemplo, *Rhizopus* que convierte los azúcares en masa celular, lo que aumenta la producción de proteínas o la concentración de proteínas.

2. Proceso sin cocción

En una modalidad ilustrativa, la invención proporciona un proceso para la hidrólisis del almidón del grano y la fermentación de azúcares es un proceso sin cocción. En un proceso sin cocción, la temperatura del puré se mantiene por debajo del punto de gelatinización del almidón. Los procesos sin cocción se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7,037,704; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20040234649; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20050233030; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 20040219649). En un proceso ilustrativo sin cocción, se prepara puré de cebada que comprende de alrededor del 10 % a alrededor del 35 % de sólidos (peso/volumen). El puré se ajusta a un pH entre alrededor de 3,5 y alrededor de pH 4,0, seguido de la adición de cultivo de levadura y una preparación enzimática que hidroliza el almidón crudo no gelatinizado. En una modalidad ilustrativa, una preparación enzimática que comprende alfa amilasa y beta glucanasa es adecuada para este proceso. En otra modalidad ilustrativa, las preparaciones enzimáticas disponibles comercialmente también pueden usarse en un proceso sin cocción a temperaturas inferiores al punto de gelatinización para el almidón. El puré con enzima y levadura se incuba, preferentemente con agitación, a una temperatura que es un miembro seleccionado de una temperatura que está entre alrededor de 30 °C a 70 °C durante alrededor de 48 horas a alrededor de 72 horas en una hidrólisis y fermentación de almidón simultáneas.

E. Procesamiento de la suspensión fermentada para preparar un concentrado de proteína

Separación de líquidos y sólidos

Después de que se completa la fermentación y antes de la destilación, los sólidos se separan del líquido mediante procesos que se conocen en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, etc. En una modalidad ilustrativa, se usa una centrifuga de flujo continuo Sharpies. Sin embargo, puede emplearse cualquier sistema de centrifuga o filtro adecuado. La corriente líquida se destila para recuperar el etanol. En una modalidad ilustrativa, los fondos de destilación o el líquido restante después de extraer el etanol pueden reciclarse de nuevo para su uso como "respaldo" o agua complementaria para formar el puré.

La proteína soluble se recupera, por ejemplo, de los fondos de destilación, mediante cualquier proceso conocido, por ejemplo, evaporación, y se añade a los sólidos. Los sólidos de la separación se secan al aire a temperaturas inferiores a alrededor de 100 °C en los sólidos. En algunas modalidades ilustrativas, los sólidos de la separación se secan al aire a temperaturas en un intervalo que está entre alrededor de 40 °C y alrededor de 100 °C. Sin embargo, cualquier temperatura que no desnaturalice o dañe la proteína es adecuada. Los sólidos secos se muelen en polvo mediante el uso de un molino de martillos u otro equipo adecuado para formar el concentrado de proteínas de granos.

En una modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas resultante es un concentrado de proteínas de cebada que comprende al menos alrededor del 53 % de proteína. En otra modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas resultante es un concentrado de proteínas de cebada en donde la concentración de proteína se selecciona de concentraciones de proteína en un intervalo de entre alrededor del 30 % de proteína y alrededor del 70 % de proteína.

En una modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas tiene una digestibilidad de proteínas superior al 80 %, una disponibilidad de fosfato de alrededor del 70 %, es apetitoso para las truchas y, por lo tanto, se usa como uno de los ingredientes proteicos en los piensos para truchas.

En otras modalidades ilustrativas, se preparan otros concentrados de proteína de granos de acuerdo con los procesos descritos en la presente descripción y los concentrados de proteína comprenden proteína en una concentración seleccionada de concentraciones de proteína en un intervalo de entre alrededor del 36 % de proteína a alrededor del 75 % de proteína y son adecuados para su uso en pienso para acuicultura.

Variaciones

En una modalidad ilustrativa, las fracciones sólida y líquida se separan antes de la fermentación por medios mecánicos tales como por centrifugación o por filtración. La fracción de sólidos húmedos se recoge, se vuelve a resuspender en agua para lavar nuestros azúcares residuales y se separa por centrifugación o filtración. Los sólidos se recuperan y se secan. La fracción de sólidos es el concentrado de proteínas y típicamente comprende entre alrededor del 30 % de proteína y alrededor del 70 % de proteína. La fracción líquida se fermenta mediante la adición de un organismo de fermentación como se describió anteriormente en la presente descripción y después se destila.

- 5 En otra modalidad ilustrativa, los sólidos y la fracción líquida se separan antes de la fermentación por medios mecánicos tales como por centrifugación o por filtración. Los sólidos húmedos se inoculan con un cultivo fúngico. Sin limitarse a la teoría, se cree que los hongos inoculados usan los azúcares residuales y, por lo tanto, extraen los azúcares del concentrado de proteínas. Después de un período de cultivo adecuado que es típicamente entre alrededor de 24 horas y
- 10 alrededor de 72 horas, los sólidos se secan y se muelen para preparar el concentrado de proteínas. La corriente líquida se fermenta a etanol u otro producto. Debido a que el hongo extrae de manera más eficiente los azúcares solubles, esta modalidad no usa una etapa de lavado, por lo tanto, la corriente de líquido para la fermentación no se diluye y puede procesarse de manera más eficiente.
- 15 Los hongos adecuados para la inoculación de los sólidos húmedos incluyen, pero no se limitan a, cualquier hongo que sea un hongo que utilice azúcares y que no sea tóxico ni patógeno y que sea seguro de usar en piensos para animales. Además, en una modalidad ilustrativa, el hongo es apetitoso para los peces o animales. En una modalidad ilustrativa, el hongo es *Rhizopus oryzae*. En otra modalidad ilustrativa, el hongo es *Rhizopus microsporus*. Las concentraciones de proteínas típicas que usan este enfoque son alrededor del 60 %.
- 20 En otra modalidad ilustrativa, la proteína soluble en los fondos de destilación se recupera mediante el cultivo de una levadura u hongo en los fondos de destilación. Se añade azúcar o puré de grano hidrolizado en una cantidad que está entre alrededor del 0,5 al 1 % para proporcionar una fuente de carbono. El microorganismo usa la proteína soluble y cualquier azúcar añadida, lo que convierte los nutrientes en masa celular insoluble que se recupera mediante filtración o centrifugación y se añade a los sólidos. Puede usarse cualquier hongo de levadura siempre que sea un hongo que no sea tóxico ni patógeno y que sea seguro de usar en piensos para animales; sea apetitoso para los peces o animales y use preferentemente azúcares. *Rhizopus oryzae* o *Rhizopus microsporus* son dos organismos adecuados para esta modalidad.
- 25 En aún otra modalidad ilustrativa, se añade levadura u otro organismo de fermentación a la suspensión antes de la separación de líquidos y sólidos. La fermentación continúa hasta que todos los azúcares solubles se convierten en etanol u otro producto de fermentación. Típicamente en alrededor de 24 a alrededor de 72 horas. Cuando se completa la fermentación, las fracciones de sólidos y líquidos se separan por centrifugación o filtración u otros medios adecuados. Los sólidos se recuperan y se secan. En la etapa de secado, se evapora cualquier etanol residual u otro producto de fermentación volátil. La fracción líquida se envía a destilación u otra etapa de recuperación del producto de fermentación. Esto difiere de un proceso de etanol convencional en que los sólidos se separan antes de la destilación. La destilación puede desnaturalizar o alterar la proteína lo que hace que la proteína sea menos digestible.
- 30 En otra modalidad ilustrativa, los azúcares solubles en la suspensión se convierten en proteína adicional en lugar de en etanol mediante la adición de un microbio apropiado. Los azúcares solubles se convierten en masa celular mediante la adición de una levadura u hongo adecuado cultivado en condiciones de agitación, aireación, temperatura y pH diseñados para producir la masa celular máxima. La masa celular se recupera junto con los sólidos del grano lo que da como resultado un aumento en el concentrado de proteínas que se recupera del proceso. Los microbios apropiados incluyen, pero no se limitan a, cualquier hongo o levadura que no sea tóxico ni patógeno y que sea seguro para su uso en piensos para animales; sea apetitoso para los peces o animales y use preferentemente azúcares. Los microbios apropiados ilustrativos incluyen, por ejemplo, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*.
- 35 En una modalidad ilustrativa, se añade al menos una especie de *Rhizopus* para aumentar la concentración de proteína del concentrado de proteínas final. Típicamente, se añade *Rhizopus* en cualquiera de las tres formas para aumentar la concentración de proteínas. En un ejemplo, se añade *Rhizopus* después de la fermentación de levadura, pero antes de la destilación para usar proteínas solubles y aumentar la proteína recuperable. En otra modalidad ilustrativa, se añade *Rhizopus* en lugar de otro hongo, por ejemplo, una levadura, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. En esta modalidad, *Rhizopus* usa azúcares solubles y proteínas solubles para producir masa celular en lugar de etanol, lo que aumenta la recuperación total de proteínas. En aún otra modalidad ilustrativa, el grano que contiene almidón molido se resuspende y el almidón y los glucanos se solubilizan con enzimas. Después se añade levadura a la fracción líquida para fermentar los azúcares solubles en etanol. *Rhizopus* se añade a la fracción de sólidos húmedos de la centrífuga antes del secado. Los sólidos húmedos contienen azúcares que *Rhizopus* convierte en masa celular. En una modalidad ilustrativa, el grano que contiene almidón usado para esta modalidad es soja. En esta modalidad, la fermentación con *Rhizopus* reduce o elimina el fitato y otros compuestos antinutricionales típicamente asociados con la soja, y por lo tanto proporciona un concentrado de proteínas con fitato reducido o eliminado y factores antinutricionales reducidos o eliminados.
- 40 En todas las modalidades, las etapas de secado se llevan a cabo a temperaturas inferiores al punto donde las proteínas se desnaturalizan, se queman o se alteran negativamente. En una modalidad ilustrativa, se usa el secado al aire a alrededor de 50 °C. En otra modalidad ilustrativa, se usa el secado al aire a 50 °C o por debajo.
- 45 Típicamente, en el concentrado de proteínas hay un polvo fino de color marrón a blanquecino que comprende entre alrededor del 30 % y alrededor del 70 % o más de proteína. En una modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas comprende alrededor del 35 % de proteína. En otra modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas comprende alrededor del 40 % de proteína. En otra modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas comprende alrededor del 45 % de proteína. En otra modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas comprende alrededor del 50 % de proteína. En otra modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas comprende alrededor del 55 % de proteína. En otra modalidad
- 50
- 55
- 60
- 65

ilustrativa, el concentrado de proteínas comprende alrededor del 60 % de proteína. En otra modalidad ilustrativa, el concentrado de proteínas comprende alrededor del 65 % de proteína.

III. Acuicultura

Como se señaló anteriormente, la acuicultura es el sector de producción de piensos de más rápido crecimiento en el mundo. Por ejemplo, el valor actual de la producción acuícola de los Estados Unidos es de alrededor de 900 millones de dólares anuales, el departamento de comercio de los Estados Unidos espera aumentar esto a 5 mil millones de dólares para 2025. Por lo tanto, la acuicultura es realmente la próxima revolución agrícola debido a los grandes cambios que se generan en la producción de productos de mariscos y peces de aletas.

Para que la acuicultura continúe su crecimiento, se necesitan fuentes mejoradas de proteína que se basan en vegetales. Un objetivo principal en la formulación de dietas para peces es proporcionar una mezcla nutricionalmente equilibrada de ingredientes para apoyar el mantenimiento, el crecimiento, la reproducción y la salud del animal a un costo aceptable. Muchos de los requerimientos de nutrientes de los peces y la nutrición acuícola se conocen en la técnica, por ejemplo, Nutrient Requirements of Fish, comité de nutrición animal, junta de agricultura, consejo nacional de investigación, National Academy Press, Washington, dc. 1993 National Academy of Sciences

1. Procesamiento de piensos para acuicultura

Como se conoce bien en la técnica, los piensos para peces se procesan típicamente en forma de partículas estables en agua (gránulos, bolitas) para un consumo eficiente por parte de los peces y para minimizar la suciedad del agua. La mayoría del pienso para peces que se fabrica se procesa mediante granulación por compresión o extrusión; otras formas que se fabrican incluyen piensos húmedos (o semihúmedos), microencapsulados y micropulverizados. Estos procesos se conocen bien en la técnica.

La harina de pescado ha sido una fuente primaria de proteínas en los piensos para truchas y cualquier cambio que pueda reducir los niveles de harina de pescado y los costos totales son beneficiosos. Reemplazar la harina de pescado por proteína vegetal es una primera etapa, pero el contenido de aminoácidos de las dietas que se basan en vegetales puede ser limitante.

Los aminoácidos son necesarios para muchas funciones metabólicas, la mayor de ellas es la acumulación de proteínas y el combustible metabólico. Proporcionar el equilibrio adecuado de aminoácidos en la dieta reducirá los costos de alimentación y la producción de desechos nitrogenados como el amoníaco.

El reemplazo completo de la proteína de harina de pescado por proteína vegetal sin una reducción en el crecimiento ha sido el objetivo de muchos estudios (véase, por ejemplo, Adelizi P. D., y otros, supra). Sin embargo, como se sabe en la técnica, la fuente de proteína afecta la tasa de crecimiento (véase, por ejemplo, F. T. Barrows, y otros (2007) Aquaculture Research 38 (16): 1747-1758).

La aceptabilidad, apetitosidad y digestibilidad del pienso varían con los ingredientes y la calidad del pienso. Los piscicultores prestan especial atención a la actividad de alimentación para ayudar a determinar la aceptación de los piensos, calcular las relaciones de conversión de piensos y la eficiencia de los piensos, monitorear los costos de los piensos y rastrear la demanda de piensos durante todo el año.

Las tablas de tasas de alimentación publicadas están disponibles para las especies de peces más comúnmente cultivadas. Los agricultores pueden calcular las tasas de alimentación óptimas sobre la base del tamaño promedio en longitud o peso y el número de peces en el tanque, la pista de rodadura o el estanque por métodos conocidos en la técnica (véase Hinshaw 1999 y Robinson y otros 1998). Los peces de cultivo suelen alimentarse entre el 1 y el 4 % de su peso corporal por día, en dependencia del tamaño del pez, la temperatura del agua y las especies.

2. Prácticas de alimentación acuícola

Típicamente, los diferentes tamaños y especies de peces y las diversas condiciones ambientales y de manejo usadas en la acuicultura requieren diferentes estrategias de alimentación. Las características de la dieta, como la fuente (pienso vivo o no vivo), el tamaño de partícula, la textura, la densidad y la apetitosidad, deben considerarse cuidadosamente para el tamaño y las especies de peces. La cantidad de pienso y la frecuencia de alimentación son importantes para la tasa de crecimiento y la eficiencia del pienso. El tipo de pienso (flotante o hundido) que se usa y el método de alimentación dependerán de los peces, el sistema de cultivo y el equipo y el personal disponible.

IV. Otros usos del concentrado de proteínas

El concentrado de proteínas producido por los métodos que se describen en la presente descripción es adecuado para su uso como ingrediente en piensos para acuicultura y en otros piensos para animales donde se necesita o se desea una fuente alta en proteínas derivada de plantas.

A. Producción de etanol

El etanol se produce a partir de la corriente de fermentación líquida por métodos que se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Gyamerah, M. Y Glover, J. (1996) *J. of Chem. Tech. and Biotech.* 66(2): 145-152; Minier M. y Coma, G (1981) *biotechnology letters* 3(8): 405-408; p. Christen y otros (1990) *biotechnology and bioengineering* 36(2): 116-123). En una modalidad ilustrativa, la corriente de líquido y el agua de lavado se combinan en un tanque apropiado. Se añade un organismo de fermentación adecuado y se fermenta la corriente líquida. Los organismos adecuados ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, levaduras que fermentan la corriente líquida a etanol. La concentración de etanol en el líquido fermentado típicamente depende del contenido de sólidos de la suspensión original y del contenido de carbohidratos de la cebada, pero típicamente está en un intervalo que está entre alrededor del 3 % y el 15 %. Después de separar los sólidos proteicos, la corriente líquida fermentada se destila por métodos conocidos para separar el etanol del agua (véase, por ejemplo, Kister, Henry Z. (1992). *Distillation Design* (1ª edición ed.). McGraw-Hill).

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1:

El siguiente ejemplo ilustra un proceso ilustrativo por el cual se produce un concentrado de proteínas a escala piloto a partir de cebada.

La cebada sin cáscara, variedad Merlin, se molió en un molino de martillos mediante el uso de un tamiz fino. La cebada molida se mezcla con agua para hacer un puré con un contenido de sólidos del 20 % en un tanque batch de 300 litros equipado con agitador e intercambiador de calor. El pH fue de alrededor de 5,5. Se inició el calentamiento del puré y cuando el puré alcanzó 50 °C, se añadió alfa amilasa (Genecor SPEZYME FRED) en el montaje de 3,3 ml por kg de cebada. El calentamiento continuó hasta que el puré estuvo a 90 °C. El puré se mantuvo a 90 °C durante dos horas. El puré se enfrió después a 65 °C. Se añadió glucoamilasa (Genencor Distillase 500I) a razón de 1,6 ml por kg de grano y beta glucanasa (Genencor Optimash BG) a razón de 1,66 ml por kg de grano. El puré se enfrió lentamente durante 16 horas a 35 °C, momento en el cual se añadió un cultivo de levadura. La densidad celular inicial fue de alrededor de un millón de levadura por ml de puré. La fermentación se mantuvo a 35 °C con agitación durante alrededor de 52 horas. La cerveza de fermentación se centrifugó después mediante el uso de una centrifuga Sharpies operada a 70 000 rpm. Se muestreó la corriente líquida y se determinó la concentración de etanol mediante cromatografía de gases como 5 % peso/peso. Los sólidos se recuperaron de la centrifuga, se secaron y se molieron. La concentración de proteína del polvo seco se determinó como n total mediante el uso de un analizador de nitrógeno leco con una concentración de proteína igual a % n x 6,25. La concentración de proteína de 7 lotes de producción de concentrado de proteínas de cebada promedió 54 %. Los concentrados de proteína preparados como en este ejemplo se usaron para formular piensos para ensayos de alimentación de truchas como se describe en los ejemplos 5 y 6.

Ejemplo 2:

El siguiente ejemplo ilustra un proceso ilustrativo mediante el cual se produjo un concentrado de proteínas a escala de laboratorio a partir de avena.

La avena se molió en un molino de martillos mediante el uso de un tamiz fino como se describe en el ejemplo 1. La avena molida se mezcló con agua para hacer un puré con un contenido de sólidos del 20 % en un tanque batch de 300 litros equipado con agitador e intercambiador de calor. El pH fue de alrededor de 5,5. Se inició el calentamiento del puré y cuando el puré alcanzó 50 °C, se añadió alfa amilasa (Genecor SPEZYME FRED) a 3,3 ml por kg de cebada. El calentamiento continuó hasta que el puré fue de 107 °C. El puré se mantuvo a 107 °C durante siete minutos. El puré se enfrió después a 65 °C. Se añadió glucoamilasa (Genencor Distillase 500I) a razón de 1,6 ml por kg de grano y beta glucanasa (Genencor Optimash BG) a razón de 1,66 ml por kg de grano. El puré se enfrió durante una noche a 35 °C, momento en el que se añadió un cultivo de levadura. La densidad celular inicial fue de alrededor de un millón de levadura por ml de puré. La fermentación se mantuvo a 35 °C con agitación durante alrededor de 52 horas. La cerveza de fermentación se centrifugó a 70 000 rpm. Se muestreó la corriente líquida y se determinó la concentración de etanol mediante cromatografía de gases como 5 % peso/peso. Los sólidos se recuperaron de la centrifuga, se secaron y se molieron. La concentración de proteína del polvo seco se determinó como nitrógeno total (n) mediante el uso de un analizador de nitrógeno leco con una concentración de proteína igual a % n x 6,25.

La avena tratada en el proceso a escala de laboratorio dio como resultado un concentrado de proteínas con 47,5 % de proteína.

Ejemplo 3:

Una variedad estándar de cebada con cáscara (Baronesse) se descascaró y se trató mediante el proceso descrito en el ejemplo 1. Excepto que el puré se cocinó mediante bombeo a través de un hidrocalentador a 105 °C, después en un tanque de 200 galones donde el puré se enfrió a 90 °C, se añadió alfa amilasa y se mantuvo durante alrededor de 2 horas.

El puré se enfrió adicionalmente a 65 °C cuando se añadieron glucoamilasa y beta glucanasa y se mantuvieron durante alrededor de 2 horas. El puré se enfrió aún más a 35 ° c cuando se añadieron levaduras. La fermentación y la recuperación de proteínas fueron como se describe en el ejemplo 1. El contenido de proteína inicial de la cebada antes del descascarado fue del 15,7 %, el contenido de proteína final del concentrado de proteínas de cebada fue del 53,1 %.

5

Ejemplo 4:

El siguiente ejemplo ilustra un proceso sin cocción para preparar un concentrado de proteínas a partir de cebada.

10

El proceso ilustrativo usa la cebada Merlin. En el proceso sin cocción, se prepara un puré de cebada con 30 a 35 % de sólidos y se ajusta a un pH entre 3,5 y 4,0 seguido de la adición de cultivo de levadura y una preparación enzimática que hidroliza el almidón crudo no gelatinizado. La preparación enzimática comprende un cultivo de una cepa seleccionada de *aspergillus* cultivada en cultivo de sustrato sólido como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite solicitud de patente núm. 12/264,875, presentada el 4 de noviembre de 2008. Algunas mezclas enzimáticas adecuadas también están disponibles comercialmente. El puré con enzima y levadura se incubó preferentemente con agitación a 30° c a 35 °C durante 48 a 72 horas en una hidrólisis y fermentación simultáneas de almidón.

15

En cuanto a los procesos de "cocción" descritos en los ejemplos 2 y 3, después de que se completa la fermentación, y antes de la destilación, los sólidos se separan del líquido mediante procesos conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración.

20

Los sólidos y líquidos se procesan como se describe para procesos de cocción.

Ejemplo 5:

25

El siguiente ejemplo ilustra un proceso ilustrativo mediante el cual se produjo un concentrado de proteínas a escala de laboratorio a partir de harina de soja. La harina de soja extraída con disolvente se trató en un proceso sin cocción. La harina de soja molida se suspendió en agua con un contenido de sólidos del 20 %. La suspensión se ajustó a pH 3,6 y se añadió una preparación de amilasa activa de almidón crudo y levadura. La suspensión con amilasa y levadura se incubó a 35 °C durante 72 horas en una hidrólisis y fermentación simultáneas. Las fracciones sólida y líquida se separaron por centrifugación. La fracción de sólidos se secó a alrededor de 50 °C y se molió. El contenido inicial de proteínas de la harina de soja fue del 48 %. El proceso produjo un concentrado de proteínas con una concentración final de proteína del 57 % como se determinó mediante el método del ejemplo 1.

30

35

Ejemplo 6:

El siguiente ejemplo ilustra el proceso para producir proteínas adicionales en lugar de etanol a partir de azúcares solubles. La cebada sin cáscara (variedad Merlin) se trató enzimáticamente de acuerdo con los métodos que se describen en el ejemplo 1. Cuando el puré se enfrió a 35 °C en lugar de añadir levadura, el puré se inoculó con un cultivo de *Rhizopus oryzae*. El cultivo de *R. oryzae* se preparó mediante la transferencia de un cultivo inclinado de almacenamiento a un caldo de nutrientes que se cultivó durante 48 horas. El cultivo en matraz se usó para inocular el puré a razón de 10 ml de inóculo de *r. Oryzae* por litro de puré. El puré inoculado se incubó a 35 °C durante 72 horas. El cultivo se centrifugó para separar los sólidos que se secaron al aire a 50 °C hasta un contenido de humedad inferior al 10 %. Los sólidos secos se analizaron para determinar el contenido de proteína de acuerdo con los métodos del ejemplo 1. La concentración de proteína fue del 58 %.

40

45

Ejemplo 7:

El siguiente ejemplo ilustra una comparación de la apetitosidad de la harina de pescado, el concentrado de proteínas de soja y un concentrado de proteínas producido a partir de cebada de acuerdo con los métodos que se describen en la presente descripción.

50

Algunos ingredientes alimenticios alternativos afectan negativamente la apetitosidad de la dieta o la disposición de los peces a consumir el pienso. Para evaluar la apetitosidad de los ingredientes antes de realizar los ensayos de digestibilidad o crecimiento, se realizó un ensayo de apetitosidad de 3 semanas.

55

Se administraron tres dietas experimentales que contenían el 30 % de la proteína de evaluación y control (tabla 1).

Tabla 1. Composición de las dietas usadas para determinar la apetitosidad relativa de los concentrados de proteínas.

	Ingrediente	Control de pescado g/100 g	Control de soja g/100 g	BPC g/100 g
5	Harina de anchoa, 65	30,00	---	---
	Concentrado de proteínas de soja	---	30,00	---
	Concentrado de proteínas de cebada	---	---	30,00
10	Harina de gluten de maíz	10,37	10,37	10,37
	Harina de soja	20,00	20,00	20,00
	Harina de gluten de trigo	8,8	8,8	8,8
	Harina de trigo	13,06	13,06	13,06
15	Aceite de pescado en el interior	10,53	10,53	10,53
	Lecitina	2,00	2,00	2,00
	Fosfato dicálcico	2,27	2,27	2,27
	DL-metionina	,75	,75	,75
20	Lisina-HCL	1,12	1,12	1,12
	Premezcla de vitamina 30	,80	,80	,80
	Stay-C	,20	,20	,20
	Premezcla de traza mineral # 3	,10	,10	,10
25	Total	100,0	100,00	100,00

La dieta que contiene harina de pescado sirvió como control positivo, y la dieta que contiene concentrado de proteínas de soja es una dieta de referencia que se basa en vegetales que se ha demostrado que respalda el buen crecimiento y el consumo de pienso en estudios de alimentación a largo plazo. Cada dieta se administró en tanques por triplicado de 30 truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) mantenidas en tanques de 75 litros provistos de agua a 14 °C durante 3 semanas, después de un período de acondicionamiento de 2 semanas. Los peces se alimentaron manualmente hasta la aparente saciedad y se controló el consumo de pienso. Después de 3 semanas, se promedió el consumo de pienso y se expresó como gramos de pienso por gramo de peso de pescado por día. Hubo una diferencia significativa en el consumo de pienso entre las truchas alimentadas con cualquiera de las tres dietas (tabla 2).

Tabla 2 el efecto de la fuente de proteína en el consumo de pienso

	Dieta	g de pienso/g de pescado/día	% de control de pescado	% de control de vegetal
40	Control de pescado	0,73 + 0,03	100,0 ^a	200,4
	Control de vegetal	0,36 + 0,02	49,9 ^c	100,0
	Concentrado de proteínas de cebada	0,42 + 0,03	56,8 ^b	113,8

Como puede observarse en la tabla 2, las truchas alimentadas con el control que se basa en vegetales solo consumieron el 49,9 % de la cantidad de pienso que consumieron las truchas alimentadas con la dieta de harina de pescado control. Las truchas alimentadas con la dieta que contiene el concentrado de proteínas de cebada consumieron el 56,8 % de la cantidad de pienso que consumieron las truchas alimentadas con harina de pescado control. Los resultados de este ensayo indican una ingesta reducida de pienso para las truchas alimentadas con el control de vegetal o con la dieta que contiene el concentrado de proteínas de cebada, pero está bien documentado que las truchas alimentadas con la dieta control de vegetal se ajustan a la dieta después de solo 9 semanas de alimentación. Concluimos que el concentrado de proteínas de cebada no se rechaza por las truchas en períodos de alimentación prolongados y tiene una mejor apetitosidad que el concentrado de proteínas de soja durante las primeras 3 semanas de alimentación.

La apetitosidad del concentrado de proteínas de cebada se lleva cabo actualmente con un omnívoro de agua dulce (rémora) y un carnívoro marino (bacalao negro).

Ejemplo 8:

El siguiente ejemplo ilustra la digestibilidad de los piensos para acuicultura preparados con concentrados de proteínas preparados de acuerdo con los procesos que se describen en la presente descripción.

Los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) estiman el porcentaje de un nutriente en un ingrediente que es digestible para el pescado. Estos valores son más indicativos del verdadero valor nutricional de un ingrediente que la composición química y son necesarios para la formulación precisa de la dieta.

65

Se realizó un estudio para determinar los ADC para fósforo, proteínas y aminoácidos. Las truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (~ 250 g/pez) se mantuvieron en tanques de fibra de vidrio de 300 l y se suministraron con 6 l/m de agua a 15 °C durante todo el experimento. La iluminación se mantuvo en un ciclo diurno de 14:10 h. La dieta de referencia estaba compuesta por harina de gluten de maíz (37,42 %), harina de gluten de trigo (7,61 %), harina de soja (20,62 %), harina de trigo (24,62 %), lisina-HCL (1,47 %). Taurina (0,50 %), aceite de pescado (13,43 %), stay-C (0,30 %), colina-CL (0,50 %), premezcla de vitaminas (0,80 %), premezcla de minerales traza (0,10 %), óxido de tritio (0,01 %). Cada ingrediente de prueba se mezcló con la dieta de referencia en una proporción de 30/70, peso/peso, antes del procesamiento. Las dietas que contenían concentrados de proteína de cebada se produjeron por extrusión en frío debido a las cantidades limitadas de material disponible y todas las demás dietas se produjeron por extrusión de cocción.

Las dietas se administraron por triplicado a grupos de peces, y se replicaron con el tiempo. Las dietas se asignaron aleatoriamente a un tanque de peces y los peces se alimentaron hasta la saciedad aparente dos veces al día. Los peces se alimentaron con sus respectivas dietas durante siete días antes de la recolección fecal. Se obtuvieron muestras fecales en una colecta mediante extracción manual 16-18 h después de la alimentación. La extracción manual de los peces se realizó con una red y se anestesiaron todos los peces en el tanque, seguido de un secado suave y después se aplicó presión en la región abdominal inferior para obtener la materia fecal en un platillo de plástico. Se tuvo cuidado de excluir las excreciones urinarias de la colecta. Posteriormente, se retiraron los peces, se reemplazaron con peces nuevos, y cada dieta se asignó aleatoriamente a un tanque de peces para la segunda y tercera réplica de la dieta. Las muestras fecales para un tanque dado se secaron durante la noche a 50 °C y se almacenaron a -20 °C hasta que se realizaron los análisis químicos. Los coeficientes de digestibilidad aparente (ADC) de cada nutriente en la dieta de prueba y los ingredientes se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones (Kleiber 1961, Forster 1999):

$$ADCN_{dieta} = 100 - 100 \left\{ \frac{\% Yt \text{ en dieta} \times \% \text{ de nutriente en heces}}{\% Yt \text{ en heces} \times \% \text{ nutriente en dieta}} \right\}$$

$$ADCN_{ingrediente} = \{(a + b) ADCN_t - (a) ADCN_r\} b^{-1}$$

donde,

$ADCN_{ingrediente}$ = coeficiente de digestibilidad aparente del nutriente en el ingrediente de prueba

$ADCN_t$ = coeficientes de digestibilidad aparente del nutriente en las dietas de prueba

$ADCN_r$ = coeficientes de digestibilidad aparente del nutriente en la dieta de referencia

A = (1-p) x contenido de nutrientes de la dieta de referencia

B = p x contenido de nutrientes del ingrediente de prueba

P = proporción de ingrediente de prueba en la dieta de prueba

Los ADC para proteínas y aminoácidos para el BPC fermentado fueron muy altos (tabla 3) y equivalentes o mejores que la harina de pescado estándar. El ADC para la proteína se incrementó significativamente por la concentración de los BPC tanto lavados como fermentados.

Tabla 3. Coeficientes de digestibilidad aparentes para fósforo y aminoácidos para ingredientes de piensos seleccionados.

% de Proteína	Coeficientes de Digestibilidad Aparente														
	Fósforo	Protein a	His	Gly	Thr	Ala	Arg	Tyr	Val	Met	Phe	Ile	Leu	Lys	
Semilla entera															
Cebada	14,2	38,6	56,9	76,5	60,2	66,3	63,6	85	71,4	74,2	72,0	81,8	66,8	77,0	68,1
Trigo	12,9	17,1	74,8	76,1	99,2	95,7	73,6	81,8	85,2	93,9	87,8	91,8	87,4	91,0	85,0
Coproducidos de etanol															
BPC Lavado	54,5	36,5	79,6	84,3	79,1 2	77,4	66,2	88,6	80,3	81,3	83,3	82,9	81,3	69,0	81,2
BPC Fermentado	57,9	63,7	90,9	93,3	91,7	90,9	82,7	93,5	91,2	91,6	92,5	92,3	92,4	85,0	93,0
Cebada compacta	25,0	50,7	92,2	95,3	91,7	92,8	90,6	96,8	90,4	92,5	92,2	92,5	86,6	91,6	87,1
Harina de pescado															
Calidad Media, Regular y Menhaden	73,5	41,8	86,0	92,0	83,4	91,3	91,8	92,4	91,9	89,7	93,8	92,3	90,2	94,1	95,1

Ejemplo 9:

El ejemplo siguiente ilustra el efecto sobre el crecimiento y la eficiencia de nutrientes de la harina de pescado hecha con un concentrado de proteínas de cebada.

Se realizó un estudio de alimentación de 12 semanas en el que el concentrado de proteínas de cebada se sustituyó tanto en una dieta basada en harina de pescado como en una dieta basada en harina vegetal (tabla 4).

Se suministraron politanques semicuadrados (200-1) con agua a 15 °C a un caudal de 8-12 l min⁻¹ (el flujo aumenta a medida que crecen los peces). El fotoperíodo se mantuvo constante mediante el uso de luces de halogenuros metálicos en un sistema temporizado que proporciona 14 h de luz:10 h de oscuridad. En cada tanque se colocaron 3 peces con un promedio de 15,5 g cada uno y se alimentaron con las dietas experimentales hasta la saciedad.

Tabla 4. Composición de dieta experimental para estudio de crecimiento con concentrado de proteínas de cebada

Ingrediente	BPC 1 F100	BPC 2 F66 BP33	BPC 3 F33 BP66	BPC 4 BP 100	BPC 5 SP 100	BPC 6 SP66 BP33	7 SP33 BP66
Harina de pescado	34,25	22,84	11,42	---	--	--	--
PC de soja	--	--	--	--	25,43	16,95	8,48
Concentración de proteína de cebada	--	14,75	29,50	44,11	--	14,75	29,50
Bio-soja.	--	--	--	--	--	--	--
Aceite de pescado	12,60	13,85	15,05	16,15	15,72	15,87	16,07
Harina	31,68	23,80	17,34	11,33	30,87	24,29	17,71
Aves de corral por	9,82	9,82	9,82	9,82	9,82	9,82	9,82
Harina de sangre	6,33	6,33	6,33	6,33	6,33	6,33	6,33
Harina de soja	3,42	3,42	3,42	3,42	3,42	3,42	3,42
Lisina	--	1,24	1,69	2,14	1,40	1,58	1,86
Metionina	--	0,40	0,60	,59	0,59	0,59	0,69
Treonina	--	0,36	0,46	,57	0,38	0,41	0,48
Taurina	--	,50	0,50	,50	0,50	0,50	,50
Premezcla de vitaminas	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Colina Cl	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	,60
Stay-C	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	,20
Premezcla macro	--	0,30	0,60	0,89	0,89	0,89	0,89
Di-calcio p	--	0,49	1,37	2,25	2,65	2,51	2,34
Premezcla de traza mineral # 3	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Proteína, crudo	42,33	43,92	43,85	43,16	42,47	42,96	43,37
Proteína, digestible	38,0	39,00	38,5	38,11	38,05	38,07	38,06
Grasa	18,0	18,0	18,05	18,00	18,0	18,0	18,0
Fósforo	,98	0,90	0,91	0,91	0,90	0,91	0,90
Met	,99	1,26	1,33	1,20	1,20	1,20	1,30
Cys	,31	0,24	0,17	0,10	0,41	0,31	0,20
Lys	2,88	3,51	3,52	3,54	3,50	3,51	3,50
Thr	1,72	1,97	1,97	1,98	1,97	1,97	1,96

Las dietas experimentales se asignaron aleatoriamente a tres tanques de peces para un total de 21 unidades experimentales.

Los tanques se limpiaron diariamente y no se observó mortalidad de peces. Los peces se muestrearon al comienzo y al final del ensayo para el análisis composicional para la determinación de las eficiencias de retención de proteínas y energía.

La figura 3 muestra el efecto de sustituir la harina de pescado o el concentrado de proteínas de soja con concentrado de proteínas de cebada. Como puede observarse en la figura 3, la administración de una dieta con 1/3 y 2/3 de sustitución de harina de pescado con concentrado de proteínas de cebada aumentó la tasa de crecimiento en comparación con la

alimentación con una dieta de harina de pescado al 100 % (las medias con letras diferentes son diferentes para $p < 0,05$). La alimentación de las truchas con la sustitución completa de la harina de pescado con concentrado de proteínas de cebada dio como resultado un crecimiento equivalente.

- 5 Esperamos que la eficiencia de retención de nutrientes sea equivalente para peces alimentados con una de las dietas.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un concentrado de proteínas a partir de un grano o semilla oleaginosa que contiene almidón, el proceso comprende:
 - (i) moler el grano que contiene almidón para producir un grano que contiene almidón molido;
 - (ii) resuspender el grano que contiene almidón molido en agua para preparar una suspensión que comprende almidón y glucanos;
 - (iii) solubilizar el almidón y los glucanos que comprenden la suspensión con enzimas para proporcionar una suspensión solubilizada, en donde la solubilización del almidón y los glucanos con enzimas produce glucosa;
 - (iv) añadir un organismo de fermentación a la suspensión solubilizada, en donde el organismo de fermentación es un miembro que se selecciona del grupo que consiste en *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus* y levadura;
 - (v) fermentar la suspensión solubilizada que comprende el organismo de fermentación hasta que se complete la fermentación, lo que produce de esta manera una suspensión fermentada;
 - (vi) separar la suspensión fermentada en fracciones sólida y líquida;
 - (vii) recuperar las fracciones sólida y líquida;
 - (viii) secar la fracción sólida recuperada a una temperatura inferior a la que desnaturizaría o dañaría las proteínas;

lo que produce de esta manera un concentrado de proteínas.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.
3. El proceso de la reivindicación 1, en donde el proceso es un proceso sin cocción.
4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el proceso es un proceso de cocción.
5. El proceso de la reivindicación 1, que comprende, además:
 - (ix) destilar la fracción líquida recuperada para recuperar un producto de fermentación.
6. El proceso de la reivindicación 5, en donde el producto de fermentación es etanol.
7. El proceso de la reivindicación 1, en donde el grano que contiene almidón es un miembro que se selecciona del grupo que consiste en cebada, trigo, avena, maíz, centeno, triticale, sorgo, soja, harina de soja, lino y camelina o una combinación de los mismos.
8. El proceso de la reivindicación 7, en donde el grano que contiene almidón es la cebada.
9. El proceso de la reivindicación 8, en donde la cebada es de una variedad de cebada sin cáscara.
10. El proceso de la reivindicación 8, en donde la cebada se descascara antes de la etapa (i).
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además preparar una composición de alimentación para acuicultura que comprende el concentrado de proteínas de la etapa viii.
12. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además antes de la etapa viii:
 - a) cultivar un microbio para proporcionar una masa celular en un medio de cultivo que comprende la fracción líquida recuperada en la etapa vii, y
 - b) recuperar la masa celular con los sólidos del grano, lo que proporciona de esta manera un concentrado de proteínas que tiene una concentración de proteínas aumentada,

en donde el microbio es un miembro que se selecciona del grupo que consiste en *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus microsporus*.
13. Un concentrado de proteínas de un grano o semilla oleaginosa que contiene almidón obtenible mediante el proceso de la reivindicación 12.

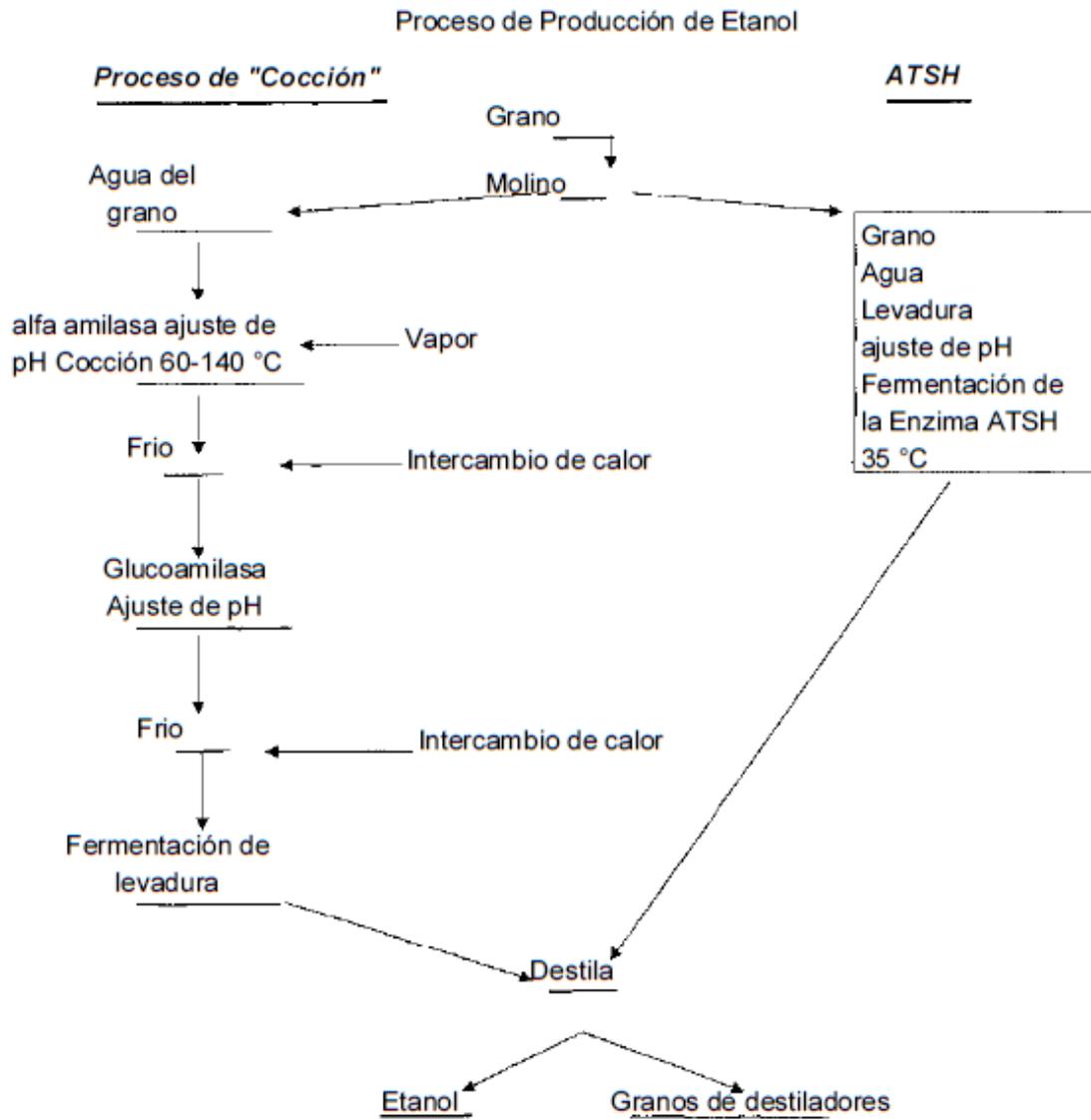


Figura 1

Proceso de Producción de Concentrado de proteínas de Grano

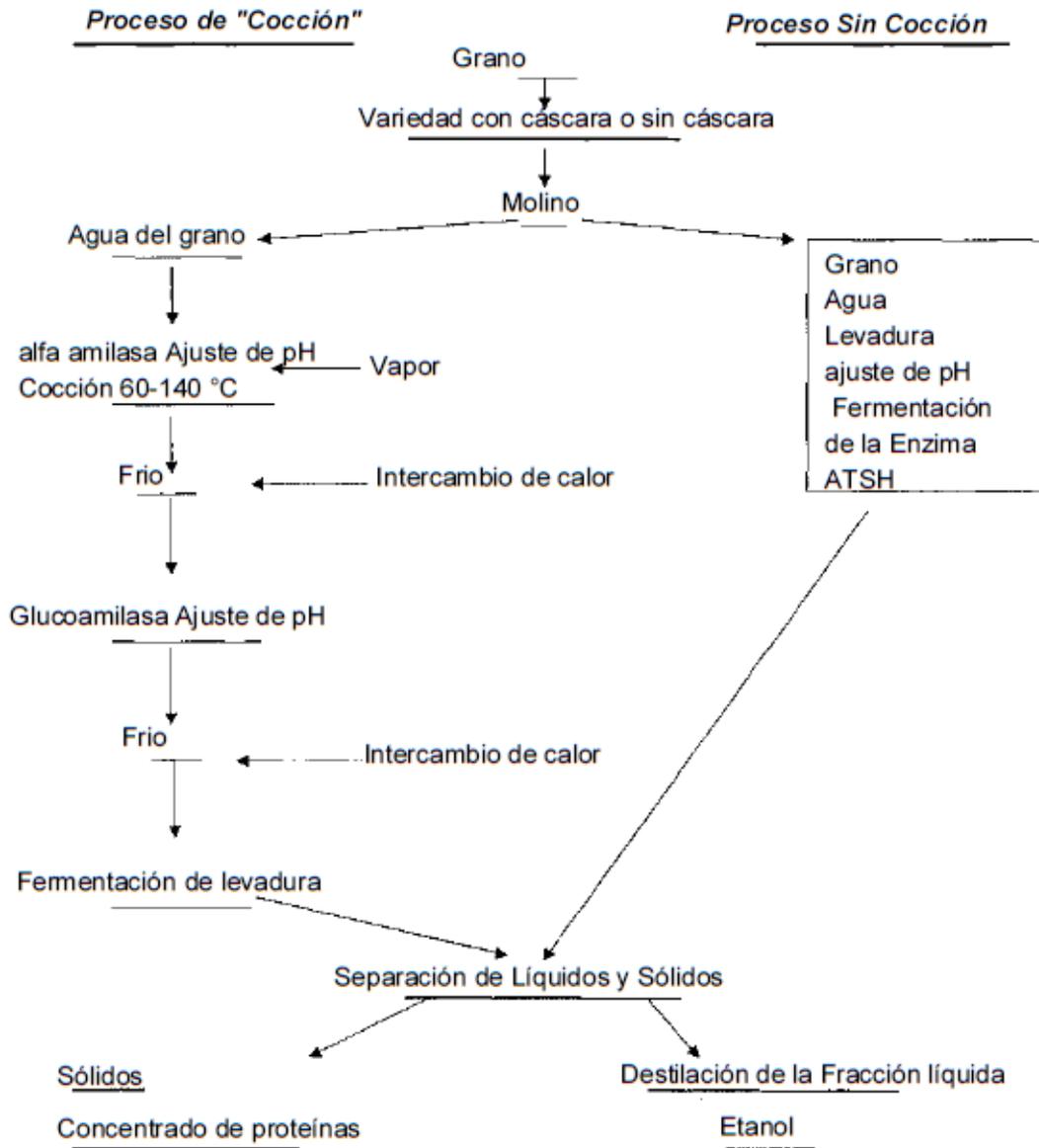


Figura 2

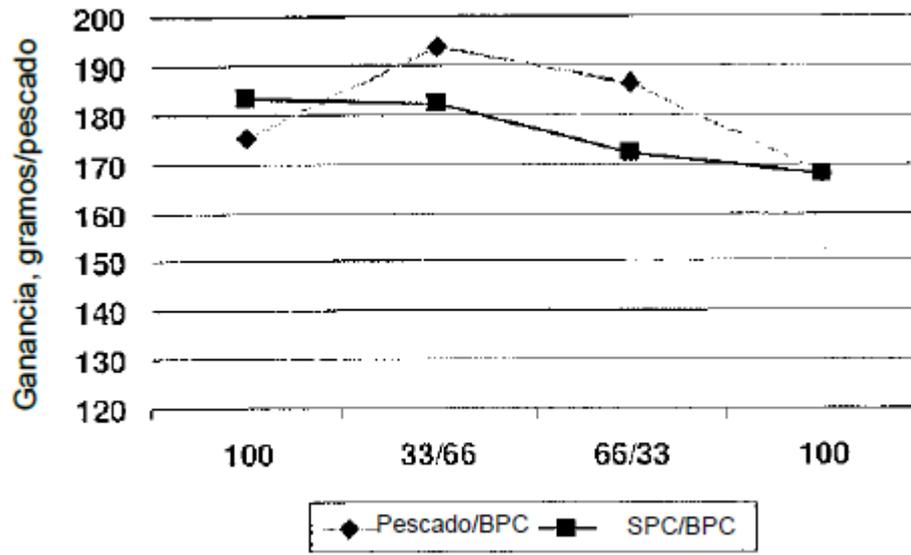


Figura 3