

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 148**

51 Int. Cl.:

<b>A23N 12/00</b>	(2006.01)
<b>C08B 30/02</b>	(2006.01)
<b>C08B 30/04</b>	(2006.01)
<b>C08B 30/08</b>	(2006.01)
<b>C08B 30/12</b>	(2006.01)
<b>C08B 30/16</b>	(2006.01)
<b>A23L 7/10</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2017 PCT/US2017/051701**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018 WO18053220**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2017 E 17769174 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3512358**

54 Título: **Método y sistema de lavado de fibras**

30 Prioridad:

**16.09.2016 US 201662395545 P**  
**28.11.2016 US 201662426711 P**  
**16.01.2017 EP 17151610**  
**08.03.2017 US 201762468704 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2024**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)**  
**Krogshoejvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**VIDAL, BERNARDO;**  
**FERRER, OSCAR PASTOR;**  
**MCLAUGHLIN, SCOTT R.;**  
**DEINHAMMER, RANDALL y**  
**GIBBONS, THOMAS PATRICK**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 990 148 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**

Método y sistema de lavado de fibras

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a un sistema de lavado de fibras, optimizado para el uso de enzimas hidrolíticas en el sistema. Además, la presente invención se refiere a un método para mejorar el rendimiento de almidón y gluten en un procedimiento de molienda en húmedo, que comprende el sistema de lavado de fibras optimizado.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La molienda en húmedo convencional del maíz es un procedimiento diseñado para la recuperación y purificación de almidón y varios coproductos que incluyen germen, gluten y fibra.

10 La fibra es el coproducto menos valioso, de modo que la industria ha dedicado un esfuerzo sustancial en aumentar el rendimiento de los productos más valiosos, tales como almidón y gluten, disminuyendo al mismo tiempo la fracción de fibra. El almidón de alta calidad es valioso ya que puede usarse para una diversidad de fines comerciales después de su procesamiento adicional en productos tales como almidón desecado, almidón modificado, dextrinas, edulcorantes y alcohol. El gluten habitualmente se usa para pienso para animales, como harina de gluten de maíz (aproximadamente un 60 % de proteína) o pienso de gluten de maíz (aproximadamente un 20 % de proteína).

15 El procedimiento de molienda en húmedo puede variar significativamente dependiendo del equipo de molienda específico usado, pero habitualmente el procedimiento incluye: limpieza de los granos, macerado, trituración, separación de germen, una segunda trituración, separación de fibra, separación de gluten y separación de almidón. Después de limpiar los granos de maíz, típicamente se ablandan remojándolos en agua o en una solución de SO<sub>2</sub> diluida en condiciones controladas de tiempo y temperatura. Después, los granos se Trituran para descomponer el pericarpo, y el germen se separa del resto del grano. La suspensión restante, que consiste principalmente en fibra, almidón y gluten, se Tritura finamente y se criba en un procedimiento de lavado de fibras, para separar la fibra del almidón y el gluten, antes de separar el gluten y el almidón, y el almidón puede purificarse en un procedimiento de lavado/filtración.

20 Se ha sugerido el uso de enzimas en varias etapas del procedimiento de molienda en húmedo, tal como el uso de enzimas para la etapa de macerado de los procedimientos de molienda en húmedo. El producto enzimático comercial Steepzyme® (disponible en Novozymes A/S) se ha mostrado adecuado para la primera etapa en procedimientos de molienda en húmedo, es decir, la etapa de macerado en la que los granos de maíz se empapan en agua.

30 Más recientemente, se ha desarrollado la "molienda enzimática", un procedimiento de molienda en húmedo modificado que usa proteasas para reducir significativamente el tiempo de procesamiento total durante la molienda en húmedo del maíz y elimina la necesidad de dióxido de azufre como agente de procesamiento. Johnston et al., *Cereal Chem*, 81, pág. 626-632 (2004).

35 El documento US 2012/288900 describe un sistema y un método para mejorar el rendimiento de almidón y/o el rendimiento de gluten a partir de granos de maíz en un procedimiento de molienda en húmedo, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) empapar los granos en agua para producir granos empapados;
- b) Triturar los granos empapados;
- 40 c) separar los gérmenes de los granos Triturados y empapados para producir una masa de granos de maíz que comprende fibra, almidón y gluten; y
- d) someter la masa de granos de maíz resultante a un procedimiento de lavado de fibras.

El documento US 6.566.125 describe un método para obtener almidón de maíz que implica empapar los granos de maíz en agua para producir granos de maíz empapados, Triturar los granos de maíz empapados para producir una suspensión de maíz Triturado, e incubar la suspensión de maíz Triturado con enzima (por ejemplo, proteasa).

45 El documento US 5.066.218 describe un método para moler granos, especialmente maíz, que comprende limpiar el grano, macerar el grano en agua para ablandarlo, y luego moler el grano con una enzima celular.

El documento WO 2002/000731 describe un procedimiento de tratamiento de granos de cultivo, que comprende empapar los granos en agua durante 1-12 horas, moler en húmedo los granos empapados, y tratar los granos con una o más enzimas que incluyen una proteasa ácida.

50 El documento WO 2002/000911 describe un procedimiento de separación de gluten de almidón, que comprende someter el almidón de molienda a una proteasa ácida.

El documento WO 2002/002644 describe un procedimiento de lavado de una suspensión de almidón obtenida a partir de la etapa de separación de gluten de almidón de un procedimiento de molienda, que comprende lavar la suspensión de almidón con una solución acuosa que comprende una cantidad eficaz de proteasa ácida.

5 Los documentos WO 2014/082566 y WO 2014/082564 describen composiciones celulolíticas para uso en molienda en húmedo.

Aunque la técnica ha investigado el efecto del uso de enzimas en la molienda en húmedo del maíz, durante el macerado/remojo de los granos de maíz, durante la trituration de los granos de maíz y en la separación de gluten de almidón, aún existe una necesidad de tecnología enzimática mejorada que pueda reducir el gasto energético y los costes asociados con la molienda en húmedo del maíz y proporcione un rendimiento aumentado de almidón y gluten.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a un sistema de lavado de fibras que puede usarse en molienda en húmedo del maíz y está optimizado para el uso de enzimas hidrolíticas en el sistema.

15 Además, la presente descripción se refiere a un método para mejorar el rendimiento de almidón y/o el rendimiento de gluten a partir de granos de maíz en un procedimiento de molienda en húmedo.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un sistema de lavado de fibras que comprende una pluralidad de unidades de cribado (S1... S4) que están conectadas de forma fluida en una configuración de lavado a contracorriente;

20 cada unidad de cribado está configurada para separar una corriente de masa de granos de maíz y líquido en dos fracciones:

- una primera fracción (s) y una segunda fracción (f), conteniendo dicha segunda fracción (f) una cantidad mayor medida en % en peso de fibra que la primera fracción (s);

en el que el sistema está configurado para

- introducir masa de grano de maíz y líquido a la unidad de cribado más aguas arriba (S1)
- 25 - dejar salir la primera fracción (s1) de la unidad de cribado más aguas arriba (S1) como una corriente de producto que contiene almidón,

- introducir agua de procedimiento, preferiblemente dispuesta para introducir agua de procedimiento a una unidad de cribado más aguas abajo (S4),

- 30 - dejar salir la segunda fracción (f4) de la unidad de cribado más aguas abajo (S4) como una masa de granos de maíz lavados que contiene una cantidad menor de almidón y gluten que la masa de granos de maíz originales,

- introducir enzimas hidrolíticas en el sistema;

35 caracterizado por que el sistema está configurado para introducir dichas enzimas hidrolíticas en dicha primera fracción (s), y/o en dicha segunda fracción (f), y/o en una primera y segunda fracción mezcladas y/o en la corriente de agua de procedimiento suministrada al sistema; y en el que el sistema comprende una unidad de cribado más aguas arriba (S1... S4), una unidad de cribado más aguas abajo, y una o más unidades de cribado intermedias dispuestas de manera fluida entre las unidades de cribado más aguas arriba y más aguas abajo (S1, S4); y en el que dicha configuración de lavado a contracorriente conectada de manera fluida, que comprende la pluralidad de unidades de cribado (S1... S4), se dispone de una manera tal que: una segunda fracción (f1) producida por una unidad de cribado aguas arriba (S1) se mezcla con una primera fracción (s3) producida por una unidad de cribado aguas abajo (S3), y siendo separadas dichas fracciones mezcladas por una unidad de cribado (S2), que es intermedia entre dichas unidades de cribado aguas arriba y aguas abajo (S1, S3), en una primera fracción (s2) y una segunda fracción (f2); un espacio (V) dispuesto en el sistema y que está conectado de manera fluida para recibir una de dicha primera fracción (s), una de dicha segunda fracción (f), o una primera y segunda fracción (s,f) mezcladas, preferiblemente sólo una segunda fracción (f), y configurado para proporcionar un tiempo de incubación para una o ambas fracciones recibidas en el espacio; y para dejar salir la una o ambas fracciones incubadas de ese modo a una unidad de cribado aguas abajo (S4), y en el que dicho espacio (V) está configurado para proporcionar un tiempo de incubación de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 15 minutos, tal como al menos 30 minutos, preferiblemente al menos 45 minutos, tal como al menos 1 hora, y preferiblemente menos de 12 horas.

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un sistema de molienda en húmedo de granos de cultivo, que comprende un sistema de lavado de fibras como se define según la invención.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para mejorar el rendimiento de almidón y/o el rendimiento de gluten a partir de granos de maíz en un procedimiento de molienda en húmedo, que comprende las etapas de:

- a) empapar los granos en agua para producir granos empapados;
- b) triturar los granos empapados;
- 5 c) separar los gérmenes de los granos triturados y empapados para producir una masa de granos de maíz que comprende fibra, almidón y gluten; y
- d) someter la masa de grano de maíz resultante a un procedimiento de lavado de fibras;

10 en el que, durante la etapa d), una o más fracciones de la masa de granos de maíz se ponen en contacto con una cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas, caracterizado por aplicar un sistema de lavado de fibras según la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La presente invención, y en particular realizaciones preferidas de acuerdo con la invención, se describirán con más detalle con referencia a las figuras adjuntas. Las figuras muestran maneras de implementar la presente invención, y no deben interpretarse como limitativas de otras posibles realizaciones que están dentro del alcance del conjunto de reivindicaciones adjunto.

La figura 1 ilustra esquemáticamente una primera realización de un sistema de lavado de fibras a contracorriente de acuerdo con la presente invención.

La figura 2 ilustra esquemáticamente una realización adicional de un sistema de acuerdo con la presente invención.

20 La figura 3 ilustra esquemáticamente una unidad de cribado con una incubadora incorporada.

La figura 4 ilustra esquemáticamente una unidad de cribado en forma de un hidrociclón.

La figura 5 es un diagrama de flujo de un segmento del procedimiento de molienda en húmedo, que muestra diferentes ubicaciones de dosificación usadas para las simulaciones.

La figura 6 muestra la recuperación de enzimas en el filtrado, durante incubación de fibras en laboratorio.

25 La figura 7 ilustra esquemáticamente una realización preferida de una incubadora de acuerdo con la presente invención; la figura 7 ilustra la incubadora en una vista en sección transversal vertical (lado izquierdo de la fig. 7), detalles sobre los agitadores dispuestos dentro de la incubadora (esquina superior derecha de la fig. 7) y en una vista en sección transversal horizontal a lo largo de A-A (esquina inferior derecha de la fig. 7).

30 La figura 8 proporciona un esquema de un procedimiento para determinar el almidón total, la proteína total, el peso de fibra seca y la cantidad de almidón unido.

La figura 9 muestra la media (% de insolubles liberados de la fibra de partida) y el % de insolubles liberados de la fibra de partida frente al % de sólidos secos (DS).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 Un objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de lavado de fibras optimizado para el uso de enzimas hidrolíticas. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar un método que mejore el rendimiento de almidón y gluten a partir de granos de maíz en un procedimiento de molienda en húmedo. Otros beneficios de la invención incluyen drenaje mejorado de las fibras y un efecto desespumante.

El procedimiento de molienda en húmedo:

40 Los granos de maíz se muelen en húmedo para abrir los granos y separar los granos en sus cuatro constituyentes principales: almidón, germen, fibra y gluten.

El procedimiento de molienda en húmedo puede variar significativamente de una instalación de molienda a otra; sin embargo, la molienda en húmedo convencional habitualmente comprende las siguientes etapas:

- 1. Macerado y separación del germen,
- 2. Lavado de las fibras, prensado y secado,
- 45 3. Separación de almidón/gluten, y

## 4. Lavado del almidón.

## 1. Macerado, trituración y separación del germen

Los granos de maíz se ablandan sumergiéndolos en agua durante entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas, preferiblemente de 30 minutos a aproximadamente 15 horas, tal como de 1 hora a 6 horas aproximadamente a una temperatura de aproximadamente 50 °C, tal como entre aproximadamente 45 °C a 60 °C. Durante el macerado, los granos absorben agua, aumentando sus niveles de humedad del 15 por ciento al 45 por ciento y más del doble de su tamaño. La adición opcional de, por ejemplo, un 0,1 por ciento de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y/o NaHSO<sub>3</sub> al agua evita el crecimiento excesivo de bacterias en el entorno caliente. A medida que el maíz se hincha y se ablanda, la leve acidez del agua de maceración comienza a soltar los enlaces de gluten dentro del maíz y liberar el almidón. Después de que los granos de maíz estén macerados, se rompen para liberar el germen. El germen contiene aceite de maíz. El germen se separa de la mezcla de mayor densidad de almidón, gluten y fibra esencialmente por "flotación" del segmento de germen libre de las otras sustancias en condiciones muy controladas. Este método sirve para eliminar cualquier efecto adverso de las trazas de aceite de maíz en las etapas de procesamiento posteriores.

## 2. Lavado de las fibras, prensado y secado

Para obtener la máxima recuperación de almidón y gluten, aunque se mantiene algo de fibra en el producto final en un mínimo absoluto, es necesario lavar el almidón y el gluten libres de la fibra durante el procesamiento. El almidón y el gluten libres se separan de la fibra durante el cribado (lavado), y se recogen como almidón de molienda. La fibra restante entonces se prensa para disminuir el contenido de agua y se seca.

## 3. Separación del gluten del almidón

La suspensión de gluten del almidón de la etapa de lavado de la fibra, denominada almidón de molienda, se separa en almidón y gluten. El gluten tiene una baja densidad en comparación con el almidón. Pasando el almidón de molienda a través de una centrífuga, el gluten se desprende fácilmente.

## 4. Lavado del almidón

La suspensión de almidón de la etapa de separación del almidón contiene algo de proteína insoluble y gran parte de los solubles. Deben eliminarse antes de que se pueda fabricar un almidón de alta calidad (almidón de alta pureza). El almidón, con sólo el uno o dos por ciento de proteína restante, se diluye, se lava de 8 a 14 veces, se vuelve a diluir, y se lava de nuevo en hidrociclones para eliminar la última traza de proteína y producir almidón de alta calidad, típicamente más del 99,5% de pureza.

Productos de molienda en húmedo: La molienda en húmedo se puede usar para producir, sin limitación, licor de maíz, pienso de gluten de maíz, germen, aceite de maíz, harina de gluten de maíz, almidón de maíz, almidón de maíz modificado, jarabes tales como jarabe de maíz, y etanol de maíz.

## Definición de enzimas:

Arabinofuranosidasas/polipéptido con actividad arabinofuranosidasa: El término "arabinofuranosidasa" significa una alfa L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasa (EC 3.2.1.55) que cataliza la hidrólisis de restos de alfa-L-arabinofuranósido no reductores terminales en alfa-L-arabinósidos. La enzima actúa sobre alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contienen uniones (1,3) y/o (1,2) y/o (1,5), arabinoxilanos, y arabinogalactanos. La alfa-L-arabinofuranosidasa se conoce también como arabinosidasa, alfa-arabinosidasa, alfa-L-arabinosidasa, alfaarabinofuranosidasa, polisacárido alfa-L-arabinofuranosidasa, alfa-L-arabinofuranósido hidrolasa, L-arabinosidasa o alfa-L-arabinanasa. La actividad arabinofuranosidasa puede determinarse usando 5 mg de arabinoxilano de trigo de viscosidad media (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irlanda) por ml de acetato de sodio 100 mM pH 5 en un volumen total de 200 µl durante 30 minutos a 40 °C, seguido de análisis de arabinosa por cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.).

Beta-glucosidasa/polipéptido con actividad beta-glucosidasa: El término "β-glucosidasa" se refiere a una β-D-glucósido-glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de restos de beta-D-glucosa no reductores terminales con la liberación de beta-D-glucosa. La actividad beta-glucosidasa puede determinarse usando p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato de acuerdo con el procedimiento de Venturi et al., 2002, J. Basic Microbiol. 42: 55-66. Una unidad de beta-glucosidasa se define como 1,0 µmol de anión p-nitrofenolato producido por minuto a 25 °C, pH 4,8 a partir de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido 1 mM como sustrato en citrato de sodio 50 mM que contiene TWEEN® 20 al 0,01 %.

Beta-xilosidasa/polipéptido con actividad beta-xilosidasa: El término "β-xilosidasa" se refiere a una β-D-xilósido-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exo-hidrólisis de β-(1→4)-xilooligosacáridos cortos para eliminar restos de D-xilosa sucesivos del extremo no reductor. La actividad beta-xilosidasa puede determinarse usando p-nitrofenil-beta-D-xilósido 1 mM como sustrato en citrato de sodio 100 mM que contiene TWEEN® 20 al 0,01 % a pH 5, 40 °C.

Una unidad de beta-xilosidasa se define como 1,0  $\mu$ mol de anión p15 nitrofenolato producido por minuto a 40 °C, pH 5 a partir de p-nitrofenil-beta-D-xilósido 1 mM en citrato de sodio 100 mM que contiene TWEEN® 20 al 0,01 %.

Celobiohidrolasa/polipéptido con actividad celobiohidrolasa: El término "celobiohidrolasa" se refiere a la 1,4- $\beta$ -D-glucano-celobiohidrolasa (E.C. 3.2.1.91 y E.C. 3.2.1.176) que cataliza la hidrólisis de uniones 1,4-beta-D15 glucosídicas en celulosa, celooligosacáridos o cualquier polímero que contenga glucosa unida por beta-1,4, liberando celobiosa del extremo reductor (celobiohidrolasa I) o el extremo no reductor (celobiohidrolasa II) de la cadena (Teeri, 1997, Trends in Biotechnology 15: 160-167; Teeri et al., 1998, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178). La actividad celobiohidrolasa puede determinarse de acuerdo con los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156; van Tilbeurgh y Claeysens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288; y Tomme et al., 1988, Eur. J. Biochem. 170: 575-581.

Enzima celulolítica o celulasa/polipéptido con actividad celulosa o actividad celulolítica: La expresión "enzima celulolítica" o "celulasa" significa una o más (por ejemplo, varias) enzimas que hidrolizan un material celulósico, que comprende cualquier material que comprenda celulosa, tal como fibra. Las enzimas celulolíticas incluyen endoglucanasa(s) (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasa(s) (E.C. 3.2.1.91 y E.C. 3.2.1.150), beta-glucosidasa(s) (E.C. 3.2.1.21) o combinaciones de las mismas. Las dos estrategias básicas para medir la actividad enzimática celulolítica incluyen: (1) medir la actividad enzimática celulolítica total, y (2) medir las actividades enzimáticas celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas), como se revisa en Zhang et al., 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481. La actividad enzimática celulolítica total puede medirse usando sustratos insolubles, incluyendo papel de filtro Whatman n.º 1, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa algácea, algodón, lignocelulosa pretratada, etc. El ensayo de actividad celulolítica total más común es el ensayo en papel de filtro usando papel de filtro Whatman n.º 1 como sustrato. El ensayo se estableció por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Ghose, 1987, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

La actividad enzimática celulolítica se puede determinar midiendo el incremento de la producción/liberación de azúcares durante la hidrólisis de un material celulósico por parte de una o más enzimas celulolíticas en las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína enzimática celulolítica/g de celulosa en el rastrojo de maíz pretratado (PCS) (u otro material celulósico pretratado) durante 3-7 días a una temperatura adecuada tal como 40 °C-80 °C, por ejemplo 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, o 80 °C, y un pH adecuado, tal como 4-9, por ejemplo 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, o 9,0, en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína enzimática celulolítica. Las condiciones típicas son reacciones de 1 ml, PCS lavado o no lavado, 5 % de sólidos insolubles (peso seco), acetato de sodio 50 mM pH 5, MnSO4 1 mM, 50 °C, 55 °C o 60 °C, 72 horas, análisis de azúcar por cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.).

Enzimas hidrolíticas o hidrolasa/polipéptido con actividad hidrolasa: "Enzimas hidrolíticas" se refiere a cualquier proteína catalítica que usa agua para descomponer sustratos. Las enzimas hidrolíticas incluyen celulasas (EC 3.2.1.4), xilanasas (EC 3.2.1.8), arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55 (alfa-L-arabinofuranosidasas de extremos no reductores); EC 3.2.1.185 (beta-L-arabinofuranosidasas de extremos no reductores), celobiohidrolasa I (EC 3.2.1.150), celobiohidrolasa II (E.C. 3.2.1.91), celobiosidasa (E.C. 3.2.1.176), beta-glucosidasa (E.C. 3.2.1.21), beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37).

Xilanasas/polipéptido con actividad xilanasas: El término "xilanasas" se refiere a la 1,4- $\beta$ -D-xilan-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endohidrólisis de uniones 1,4-beta-D-xilosídicas en xilanos. La actividad xilanasas puede determinarse con AZCL-arabinoxilano al 0,2 % como sustrato en TRITON® X-100 al 0,01 % y fosfato de sodio 200 mM pH 6 a 37 °C. Una unidad de actividad xilanasas se define como 1,0  $\mu$ mol de azurina producido por minuto a 37 °C, pH 6 a partir de AZCL-arabinoxilano al 0,2 % como sustrato en fosfato de sodio 200 mM pH 6.

Otras definiciones:

En el presente contexto, se usan términos de la manera habitual para una persona experta. Algunos de estos términos se explican a continuación:

Efecto desespumante: La formación de espuma es un fenómeno observado ampliamente en la molienda en húmedo. Un "efecto desespumante" se refiere un medio para reducir la formación de espuma.

Tiempo de contacto: Para que una o más enzimas reaccionen con un sustrato, la una o más enzimas tienen que estar en contacto con el sustrato. "Tiempo de contacto" se refiere al periodo de tiempo en que una cantidad eficaz de una o más enzimas está en contacto con al menos un fracción de una masa de sustrato. Las enzimas no tienen que estar en contacto con toda la masa de sustrato durante el tiempo de contacto; sin embargo, mezclar la una o más enzimas con una masa de sustrato permite la posibilidad de hidrólisis catalizada enzimáticamente de una fracción de la masa de sustrato durante el tiempo de contacto.

Grano de maíz: Se conoce una diversidad de granos de maíz, incluyendo, por ejemplo, maíz dentiforme, maíz de pedernal, maíz de vaina, maíz rayado, maíz dulce, maíz ceroso y similares.

Algunos granos de maíz tienen un revestimiento exterior mencionado como "pericarpio" que protege el germen de los granos. Resiste el agua y el vapor de agua, y es indeseable para los insectos y microorganismos. La única área de los granos no cubierta por el "pericarpio" es la "tapa de la punta", que es el punto de unión del grano a la mazorca.

5 Masa de granos de maíz: se usa preferiblemente para hacer referencia a una masa que comprende fibra, gluten y almidón, se consigue preferiblemente por cocción al vapor y trituración de los granos de cultivo y separación de una masa que comprende fibra, gluten y almidón del germen. Como la masa de granos de maíz se mueve a través del lavado de fibras, se separa en varias fracciones, incluyendo la primera (s) y segunda (f) fracción. Por tanto, "las fracciones de la masa de granos de maíz" y "una o más fracciones de la masa de granos de maíz" se refieren a estas fracciones primera (s) y segunda (f).

10 Drenaje: "Drenaje" se refiere a cualquier procedimiento en que se elimina el exceso de agua de la fibra de maíz.

Expresión: El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido que incluye, aunque sin limitación, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

15 Germen: El "germen" es la única parte viva del grano de maíz. Contiene la información genética esencial, enzimas, vitaminas y minerales para el crecimiento del grano en una planta de maíz. En el maíz dentiforme amarillo, aproximadamente el 25 por ciento del germen es aceite de maíz. El endospermo cubierto o rodeado por el germen comprende aproximadamente el 82 por ciento del peso seco del grano y es la fuente de energía (almidón) y proteína para la semilla en germinación. Hay dos tipos de endospermo, blando y duro. En el endospermo duro, el almidón se empaqueta herméticamente. En el endospermo blando, el almidón está suelto.

20 Polipéptido GH10: se refiere a un polipéptido con actividad enzimática, clasificándose el polipéptido como miembro de la familia 10 de glucósido hidrolasa en la base de datos de Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes) disponible en <http://www.cazy.org/>. (Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. (21 de noviembre de 2013). "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013". *Nucleic Acids Research*. 42 (D1): D490–D495; Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (enero de 2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics". *Nucleic Acids Res*. 37 (edición de la base de datos): D233–8).

Polipéptido GH11: se refiere a un polipéptido con actividad enzimática, clasificándose el polipéptido como miembro de la familia 11 de glucósido hidrolasa en la base de datos de Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes).

30 Polipéptido GH62: se refiere a un polipéptido con actividad enzimática, clasificándose el polipéptido como miembro de la familia 62 de glucósido hidrolasa en la base de datos de Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes).

Gluten: El gluten es una proteína, compuesta de dos proteínas más pequeñas, glutenina y gliadina. En este documento, "gluten" se refiere a la mayoría de proteínas encontradas en granos de maíz. Los productos principales del gluten a partir de molienda en húmedo de maíz es harina de gluten de maíz (aproximadamente un 60 % de proteína) y pienso de gluten de maíz (aproximadamente un 20 % de proteína).

35 Triturar o trituración: El término "trituración" se refiere a descomponer los granos de maíz en componentes más pequeños.

40 Tiempo de incubación: Tiempo en que la una o más fracciones de la masa de granos de maíz está o están en contacto con enzima hidrolítica durante el lavado de fibras, sin cribarse. En muchas realizaciones preferidas, un sistema y método de acuerdo con la presente invención utiliza una incubadora en cuyo interior el material se "deja para que se vea afectado" por las enzimas y, en dichas situaciones, puede determinarse el tiempo de incubación por:

$$t_{it} = \frac{\text{volumen de incubadora [m}^3\text{]} * \text{densidad de flujo entrante a la incubadora [kg/m}^3\text{]}}{\text{masa del flujo entrante por unidad de tiempo a la incubadora [kg/s]}}$$

Como alternativa, si el flujo entrante a la incubadora se expresa en términos de volumen por unidad de tiempo:

$$t_{it} = \frac{\text{volumen de la incubadora [m}^3\text{]}}{\text{volumen de flujo entrante por unidad de tiempo a la incubadora [m}^3\text{/s]}}$$

45 Insolubles: En el presente contexto, "insolubles" se usa indistintamente con "sólidos insolubles"; se define como materiales que pueden pasar a través de un tamiz de 75 µm y no pueden disolverse en agua.

Equipo de molienda: "Equipo de molienda" se refiere a todo el equipo usado en una instalación de molienda. El procedimiento de molienda en húmedo variará dependiendo del equipo de molienda disponible. Ejemplos de equipo

de mollienda pueden ser tanques de macerado, evaporador, prensa de husillo, secadora giratoria, criba de drenaje, centrífuga, hidrociclón, etc. El tamaño, y el número de cada equipo de mollienda/líneas de mollienda pueden variar en diferentes instalaciones de mollienda, que afectará al procedimiento de mollienda. Por ejemplo, el número de unidades de cribado de lavado de fibras puede variar y por tanto el tamaño de una centrífuga.

- 5 Tiempo de retención: El tiempo de retención total es el periodo de tiempo en que la masa de granos de maíz, recibida en la primera unidad de cribado (S1), y una o más fracciones de la misma se ponen en contacto con una cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas antes de abandonar el sistema de lavado de fibras de nuevo. Durante el tiempo de retención, la una o más fracciones de masa de granos de maíz se incuban con una o más enzimas hidrolíticas en un espacio (V), antes de que abandone el sistema de lavado de fibras, como parte de una primera fracción (s1) desde la unidad de cribado más aguas arriba (S1) o como parte de una segunda fracción (f4) desde la unidad de cribado más aguas abajo (S4). El tiempo de retención puede estimarse preferiblemente como la duración promedio del tiempo que pasa una materia sólida en un sistema de acuerdo con la presente invención. Este puede estimarse por la siguiente relación:

$$t_{rt} = \frac{\text{volumen del sistema: [m}^3\text{]} \cdot \text{densidad de masa de flujo entrante [kg/m}^3\text{]}}{\text{masa de flujo entrante por unidad de tiempo al sistema [kg/s]}}$$

- 15 Como alternativa, si el flujo entrante al sistema se expresa en términos de volumen por unidad de tiempo:

$$t_{rt} = \frac{\text{volumen del sistema [m}^3\text{]}}{\text{volumen de flujo entrante por unidad de tiempo al sistema [m}^3\text{/s]}}$$

El volumen del sistema se establece típicamente igual a la suma de los volúmenes de todos los espacios en el sistema; sin embargo, como los conductos del sistema típicamente se hacen pequeños, por tanto, puede preferirse descartar el volumen de los conductos en la determinación del tiempo de retención.

- 20 Cribado: El término "cribado" se refiere al procedimiento de separar la masa de granos de maíz en una primera fracción s y una segunda fracción f, y el movimiento de estas fracciones de una unidad de cribado a otra. Una unidad de cribado puede ser, por ejemplo, una criba alimentada a presión/criba a presión de alimentación donde el material se alimenta a través de una boquilla, o una criba giratoria, donde el material se fuerza a través de la criba por gravedad. Ejemplos de dichas cribas podrían ser la criba DSM y cribas ICM, respectivamente.
- 25 Un periodo sin cribado es un periodo sin separación proporcionado para la incubación de masa de granos de maíz o fracciones de la misma con enzimas.

Identidad de secuencia: El grado de relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

- 30 Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o versiones posteriores. Se usó la versión 6.1.0.

- 35 Los parámetros opcionales usados son penalización por abertura de hueco de 10, penalización por extensión de hueco de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). El resultado de Needle marcado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -no corto) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula del siguiente modo: (Residuos idénticos x 100)/(Longitud de la alineación - Número total de espacios en la alineación).

- 40 Almidón: El término "almidón" significa cualquier material compuesto de polisacáridos complejos de plantas, compuestos de unidades de glucosa que se producen ampliamente en tejidos vegetales en forma de gránulos de almacenamiento, que consisten en amilosa y amilopectina, y representados como (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>, donde n es cualquier número.

Macerado o remojo: El término "macerar" significa remojar el grano de maíz con agua y opcionalmente SO<sub>2</sub>.

- 45 Viscosidad: La viscosidad de un fluido es una medida de su resistencia a la deformación gradual por esfuerzo de corte o esfuerzo de tracción. En la presente solicitud, "viscosidad" también se refiere al concepto informal de "espesor".

Descripción de la invención:

En procedimientos para la molienda en húmedo de maíz convencional, se han optimizado los procedimientos de lavado de fibras y secado para conseguir la producción máxima de suspensión de fibras. Por tanto, aunque el procedimiento de lavado de fibras varía de una instalación de molienda a otra, típicamente tarda menos de 30 minutos, lo que lo hace poco atractivo para dosificar las enzimas durante el lavado de fibras.

5 Los autores de la presente invención han observado que dosificar las enzimas en el lavado de fibras tiene un potencial sorprendentemente grande: Cuando se dosifican correctamente y con el tiempo de retención apropiado, las enzimas proporcionan no solamente drenaje de la fracción de fibras; las enzimas también liberan cantidades considerables de almidón valioso y gluten unido en la fibra. Además, los autores de la invención han observado que con la aplicación correcta de enzimas en el procedimiento de lavado de fibras, las enzimas también reducen la formación de espuma, lo que reduce o puede incluso obviar la necesidad de agentes químicos desespumantes. Por tanto, la presente invención proporciona un medio para la dosificación apropiada de enzimas y un medio para aumentar el tiempo de contacto entre las enzimas y la masa de granos de maíz en el procedimiento de lavado de fibras.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a un sistema de lavado de fibras que comprende una pluralidad de unidades de cribado (S1...S4) que están conectadas de forma fluida en una configuración de lavado a contracorriente;

cada unidad de cribado está configurada para separar una corriente de masa de granos de maíz y líquido en dos fracciones:

20 - una primera fracción (s) y una segunda fracción (f), conteniendo dicha segunda fracción (f) una cantidad mayor medida en % en peso de fibra que la primera fracción (s);

en el que el sistema está configurado para

- introducir masa de grano de maíz y líquido a la unidad de cribado más aguas arriba (S1)
- dejar salir la primera fracción (s1) de la unidad de cribado más aguas arriba (S1) como una corriente de producto que contiene almidón,
- 25 - introducir agua de procedimiento, preferiblemente dispuesta para introducir agua de procedimiento a una unidad de cribado más aguas abajo (S4),
- dejar salir la segunda fracción (f4) de la unidad de cribado más aguas abajo (S4) como una masa de granos de maíz lavados que contiene una cantidad menor de almidón y gluten que la masa de granos de maíz originales,
- introducir enzimas hidrolíticas en el sistema;

30 caracterizado por que el sistema está configurado para introducir dichas enzimas hidrolíticas en dicha primera fracción (s), y/o en dicha segunda fracción (f), y/o en una primera y segunda fracción mezcladas y/o en la corriente de agua de procedimiento suministrada al sistema; y en el que el sistema comprende una unidad de cribado más aguas arriba (S1... S4), una unidad de cribado más aguas abajo, y una o más unidades de cribado intermedias dispuestas de manera fluida entre las unidades de cribado más aguas arriba y más aguas abajo (S1, S4); y en el que dicha configuración de lavado a contracorriente conectada de manera fluida, que comprende la pluralidad de unidades de cribado (S1... S4), se dispone de una manera tal que: una segunda fracción (f1) producida por una unidad de cribado aguas arriba (S1) se mezcla con una primera fracción (s3) producida por una unidad de cribado aguas abajo (S3), y siendo separadas dichas fracciones mezcladas por una unidad de cribado (S2), que es intermedia entre dichas unidades de cribado aguas arriba y aguas abajo (S1, S3), en una primera fracción (s2) y una segunda fracción (f2); un espacio (V) dispuesto en el sistema y que está conectado de manera fluida para recibir una de dicha primera fracción (s), una de dicha segunda fracción (f), o una primera y segunda fracción (s,f) mezcladas, preferiblemente sólo una segunda fracción (f), y configurado para proporcionar un tiempo de incubación para una o ambas fracciones recibidas en el espacio; y para dejar salir la una o ambas fracciones incubadas de ese modo a una unidad de cribado aguas abajo (S4), y en el que dicho espacio (V) está configurado para proporcionar un tiempo de incubación de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 15 minutos, tal como al menos 30 minutos, preferiblemente al menos 45 minutos, tal como al menos 1 hora, y preferiblemente menos de 12 horas.

La figura 1 ilustra esquemáticamente un sistema de lavado de fibras que no está de acuerdo con la presente invención. Como se ilustra en la figura 1, el sistema de lavado de fibras comprende una pluralidad de unidades de cribado S1, S2, S3, S4 que están conectadas de forma fluida en una configuración de lavado a contracorriente. Por conectadas de forma fluida típicamente significa que las unidades de cribado están conectadas mediante el uso de líneas de flujo, tales como tuberías para transportar materia entre las unidades de cribado. Cada una de las unidades de cribado S1-S4 está configurada para separar una corriente de masa de granos de maíz y líquido en dos fracciones: una primera fracción s (s1, s2, s3, s4) y una segunda fracción f (f1, f2, f3, f4). Como entenderá los expertos en la materia, el número de primeras fracciones producidas en el sistema de lavado de fibras depende del número de unidades de cribado incluidas en el sistema. El número de unidades de cribado en el sistema es

preferiblemente entre 2-8, y en dichas realizaciones el número de primeras y segundas fracciones será también entre 2-8. Las unidades de cribado se configuran típicamente de modo que la materia sólida se separe en una corriente diferente por lo que la segunda fracción f contiene una cantidad mayor medida en % en peso de fibra que la primera fracción s. En la figura, la anotación "s" preferiblemente se refiere a una corriente sin fibra (que contiene almidón) y la anotación "f" preferiblemente se refiere a una corriente que contiene fibra. La cifra en f y s se refiere al origen de la corriente. Se aprecia que aunque se prefiere las primeras fracciones s no contengan ninguna fibra, esta puede ser una configuración práctica difícil de conseguir.

El flujo en el sistema tiene una dirección descendente y una dirección ascendente: cada unidad de cribado; por ejemplo, la unidad de cribado S3, recibe una corriente; por ejemplo f2, desde una unidad de cribado anterior, por ejemplo, S2 y suministra una corriente; por ejemplo s3, a la unidad de cribado anterior; por ejemplo S2. Asimismo, la unidad de cribado S3 recibe una corriente s4 de una unidad de cribado posterior S4 y suministra una corriente f3 a la unidad de cribado posterior S4.

Como se ilustra en la figura 1, el agua de procedimiento, que es típicamente agua que se usa como agua de lavado en el sistema, se proporciona a la unidad de cribado más aguas abajo S4, y el agua de procedimiento es típicamente agua que no contiene fibra. La masa de granos de maíz es típicamente una suspensión líquida (típicamente una suspensión en agua), proporcionada a la unidad de cribado más aguas arriba S1. Esto se indica en la fig. 1 por la flecha marcada "de la molienda". De esta manera, y mediante la conexión de fluidos entre las unidades de cribado, la masa de granos de maíz y las fracciones f de la misma fluyen en dirección descendente en el sistema y el agua de procedimiento se mueve en dirección ascendente en el sistema. Por tanto, la configuración de fluidos en el sistema puede verse según la masa de granos de maíz se lava en la unidad de cribado más aguas arriba S1 por un fluido que contiene una alta cantidad de almidón y en la unidad de cribado más aguas abajo S4 se lava por un fluido que contiene una baja cantidad de almidón. Además, la masa de granos de maíz en la unidad de cribado más aguas arriba S1 contiene una mayor cantidad de almidón que la fracción f de la masa de granos de maíz en la unidad de cribado más aguas abajo S4.

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar un tiempo de contacto entre la masa de granos de maíz o las fracciones de la misma y las enzimas en el sistema, para aumentar la eficacia de la retirada del almidón de la fibra. El tiempo de contacto entre las enzimas y la masa de granos de maíz o fracciones de la misma en el sistema también se menciona como tiempo de retención. Añadiendo las enzimas en un punto óptimo en el sistema de lavado de fibras, el tiempo de retención puede prolongarse, lo que puede aumentar la eficacia de la retirada o separación del almidón de la fibra. Para proporcionar un tiempo de retención más largo que el proporcionado por una instalación de molienda típica, un espacio V (no mostrado en la fig. 1) puede estar dispuesto en el sistema y que está conectado de forma fluida para recibir una de dichas primeras fracciones s, una de dichas segundas fracciones f o una primera y segunda fracción mixta s, f, preferiblemente únicamente una segunda fracción, y configurado para proporcionar un tiempo de incubación para una o ambas fracciones recibidas en el espacio; y que descarga la fracción o fracciones incubadas de esta manera a una unidad de cribado posterior S4. Se aprecia que aunque puede preferirse tener una unidad de incubadora diferente dispuesta en el sistema, las líneas de flujo que conectan las unidades de cribado también pueden usarse para proporcionar el espacio.

Además y como se presenta en este documento, se ha descubierto que es ventajoso añadir enzimas en una posición que es aguas abajo de una unidad de cribado más aguas arriba S1 y aguas arriba de a una unidad de cribado más aguas abajo S4; en la realización de la fig. 1, la adición de enzimas se ilustra en la posición de fluido de la unidad de cribado S3 (ilustrada por la flecha en la fig. 1 marcada "enzimas").

De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 2 unidades de cribado, se prefiere la dosificación entre la primera y la segunda unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 2.

De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 3 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 3, mucho más preferido en la unidad de cribado 2 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 2 y 3.

De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 4 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda o tercera unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 4, mucho más preferido en la unidad de cribado 2 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 2 y 3.

De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 5 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera o cuarta unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 5, mucho más preferido en la unidad de cribado 3 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 3 y 4.

De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 6 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera, cuarta o quinta unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad

de cribado 1 y la unidad de cribado 6, mucho más preferido en la unidad de cribado 4 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 4 y 5.

5 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 7 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera, cuarta, quinta o sexta unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 7, mucho más preferido en la unidad de cribado 4 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 4 y 5.

10 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 8 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta o séptima unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 8, mucho más preferido en la unidad de cribado 5 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 5 y 6.

Por tanto, un sistema de acuerdo con la descripción está configurado para

- introducir la masa de granos de maíz y líquido a la unidad de cribado más aguas arriba S1, preferiblemente comprendiendo una entrada en el sistema que alimenta la materia a la unidad de cribado más aguas arriba S1;
- 15 - dejar salir la primera fracción s1 de la unidad de cribado más aguas arriba S1 como una corriente de producto que contiene almidón, preferiblemente comprendiendo una salida desde la unidad de cribado más aguas arriba que alimenta una corriente sin fibra desde el sistema;
- introducir agua de procedimiento, preferiblemente dispuesto para introducir agua de procedimiento a una unidad de cribado más aguas abajo S4; la entrada de agua de procedimiento es preferiblemente una entrada a la unidad de cribado más aguas abajo S4;
- 20 - dejar salir la segunda fracción f4 de la unidad de cribado más aguas abajo S4 como una masa de granos de maíz lavados que contiene una cantidad inferior de almidón y gluten que la masa de granos de maíz original; preferiblemente comprendiendo una salida desde la unidad de cribado más aguas abajo.

25 El sistema también está configurado para introducir enzimas hidrolíticas en el sistema, que puede ser una entrada dispuesta en una posición preferida para permitir el contacto entre la masa de granos de maíz o fracciones de la misma y la una o más enzimas hidrolíticas.

30 Se hace referencia a la fig. 2 que ilustra esquemáticamente una realización de un sistema de acuerdo con la presente invención. Se usa la misma anotación en fig. 2 que la usada en la fig. 1. Como se presenta en la fig. 2, las unidades de cribado S1 a S4 comprenden todas un elemento de cribado (criba) indicado por una línea discontinua oblicua dentro de las unidades de cribado. Esta línea discontinua oblicua ilustra un dispositivo configurado para separar una fracción f que contiene fibra y una fracción que preferiblemente no contiene ninguna fibra; esto podría proporcionarse, por ejemplo, mediante un filtro de banda o un filtro en general dispuesto dentro de las partes de pared que definen un espacio interior de una unidad de cribado.

En la realización mostrada en la fig. 2, las diversas fracciones a mezclar se ilustran mezcladas fuera de las unidades de cribado S1-S4. Sin embargo, pueden mezclarse dentro de las unidades de cribado.

35 Como también se ilustra en la fig. 2, el espacio V es un recipiente diferente que está conectado de forma fluida a la unidad de cribado S3 de modo que la unidad de cribado S3 recibe fluido con fibra y enzimas después de que el fluido con fibra y enzimas haya pasado un tiempo de incubación en el espacio V. Como se ilustra esquemáticamente en la fig. 2, el espacio V puede tener placas deflectoras para asegurar que el fluido no fluye en una línea recta desde la entrada hasta la salida del recipiente, que de lo contrario podría acortar el flujo para proporcionar un tiempo de incubación.

40 La fig. 2 también ilustra que las enzimas se aplican a las corrientes f2 y s4 que penetran en el espacio V. En la realización mostrada, las enzimas se dosifican por una bomba de dosificación 10 ilustrada esquemáticamente por una bomba de pistones accionada por un cigüeñal, donde la cantidad de enzimas dosificada se controla mediante la rotación del cigüeñal (hay válvulas de entrada y salida unidireccionales presentes en el cilindro o cabezal del cilindro, pero no se ilustran).

45 Por tanto, un sistema de acuerdo con la presente invención está configurado preferiblemente para introducir enzimas hidrolíticas en dicha primera fracción (s), y/o en dicha segunda fracción (f), y/o en una primera y segunda fracción mixta y/o en la corriente de agua de procedimiento aportada al sistema.

50 El número de unidades de cribado S puede seleccionarse de acuerdo con, por ejemplo, la capacidad volumétrica para separar en dos corrientes y/o los otros objetivos del diseño. Sin embargo, un sistema de acuerdo con la presente invención en general tendrá una unidad de cribado más aguas arriba, una unidad de cribado más aguas abajo y preferiblemente una o más unidades de cribado intermedio dispuestas de forma fluida entremedias de las unidades de cribado más aguas arriba y más aguas abajo. Es decir, con referencia a las fig. 1 y 2, un sistema preferido comprenderá una unidad de cribado más aguas arriba S1 y una unidad de cribado más aguas abajo S4 y

varias unidades de cribado (por ejemplo, 2) dispuestas entremedias, donde dispuestas entremedias se refiere conectadas de forma fluida como se ilustra en las fig. 1 y 2.

En detalle, la configuración de lavado a contracorriente conectada de forma fluida, como se describe en las fig. 1 y 2, que típicamente comprende la pluralidad de unidades de cribado S1...S4, está dispuesta de manera que:

5 una segunda fracción f1 producida por una unidad de cribado anterior S1 se mezcla con una primera fracción s3 producida por una unidad de cribado posterior S3, y dichas fracciones mixtas se separan por una unidad de cribado S2, que es intermedia entre dichas unidades de cribado anterior y posterior S1, S3, en una primera fracción s2 y una segunda fracción f2.

10 Aunque esta descripción se hace con referencia a la unidad de cribado S3, puede aplicarse la misma descripción para cualquier unidad de cribado intermedia, tal como la criba S2, u otras unidades de cribado intermedias donde la unidad de cribado intermedia se refiere a una unidad de cribado que está dispuesta aguas arriba de la unidad de cribado más aguas arriba y aguas abajo de la unidad de cribado más aguas abajo.

15 Como se ilustra en la fig. 2, en algunas realizaciones se prefiere que la mezcla de una segunda fracción f1 y una primera fracción s3 se produzca antes de entrar en una unidad de cribado intermedia S2. Dicha mezcla puede proporcionarse introduciendo las dos fracciones en una cámara de mezcla que comprende un medio de agitación que proporciona típicamente una agitación vigorosa del fluido o la mezcla puede proporcionarse mediante un colector que tiene una entrada para cada corriente y una salida para la corriente mezclada.

20 Como alternativa a la mezcla antes de entrar en una unidad de cribado, la mezcla de una segunda fracción f1 y unas primeras fracciones 3 puede producirse dentro de la unidad de cribado intermedia S2. Esto puede conseguirse, por ejemplo, porque el interior de la unidad de cribado está equipado con un medio de agitación que proporciona típicamente una agitación vigorosa del fluido dentro de la unidad de cribado.

Aunque las realizaciones descritas en las fig. 1 y 2 se muestran comprendiendo más de dos unidades de cribado, un sistema se considera completamente funcional con tan solo dos unidades de cribado. Por tanto, en general se prefiere que el sistema comprenda 2-8 unidades de cribado típicamente dispuestas como se ilustra en fig. 1 o 2.

25 Un sistema de acuerdo con la presente invención puede configurarse preferiblemente para proporcionar un tiempo de retención total en dicho sistema de lavado de fibras de al menos 35 minutos, tal como al menos 40 minutos, al menos 45 minutos, al menos 50 minutos, al menos 55 minutos, al menos 60 minutos, al menos 65 minutos, al menos 70 minutos, al menos 75 minutos, al menos 80 minutos, al menos 90 minutos, al menos 100 minutos, al menos 105 minutos, al menos 110 minutos, al menos 115 minutos, al menos 120 minutos, durante el que la una o más enzimas hidrolíticas están en contacto con dicha masa de granos de maíz y/o una o más fracciones de la misma, donde una o más fracciones de la masa de granos de maíz preferiblemente se refiere a cualquier fracción de masa de granos de maíz que contenga fibra y/o almidón y/o gluten, incluyendo cualquiera de las fracciones s y f. En esta ocasión, el tiempo de retención se refiere al tiempo que un elemento fluido está presente en el sistema, calculado a partir del momento en que entra en la unidad de cribado S1 y hasta el momento en que abandona la unidad de cribado S4.

30 Esto se determina típicamente basándose en, por ejemplo, el volumen total en m3 del sistema (volumen de unidades de cribado, líneas de flujo y espacio (V) dividido por el volumen total de flujo de producto sin fibra desde la unidad de cribado S1 en m3/h). En esta estrategia práctica, el volumen total de flujo de producto sin fibra es un parámetro de diseño predeterminado, y el volumen total del sistema entonces se selecciona basándose en este parámetro de diseño.

40 El tiempo de retención total en el sistema de lavado de fibras puede ser entre 35 minutos y 5 horas, tal como entre 35 minutos y 4 horas, 35 minutos y 3 horas, 35 minutos y 2.5 horas, 35 minutos y 2 horas, 35 minutos y 1.5 horas, 45 minutos y 5 horas, 45 minutos y 4 horas, 45 minutos y 3 horas, 45 minutos y 2.5 horas, 45 minutos y 2 horas, 1 hora y 5 horas, 1 hora y 4 horas, 1 hora y 3 horas, 1 hora y 2.5 horas, 1 hora y 2 horas, 70 minutos y 5 horas, 70 minutos y 4 horas, 70 minutos y 3 horas, 70 minutos y 2.5 horas, 70 minutos y 2 horas, 75 minutos y 5 horas, 75 minutos y 4 horas, 75 minutos y 3 horas, 75 minutos y 2.5 horas, 75 minutos y 2 horas, 80 minutos y 5 horas, 80 minutos y 4 horas, 80 minutos y 3 horas, 80 minutos y 2.5 horas, 80 minutos y 2 horas, 85 minutos y 5 horas, 85 minutos y 4 horas, 85 minutos y 3 horas, 85 minutos y 2.5 horas, 85 minutos y 2 horas, 90 minutos y 5 horas, 90 minutos y 4 horas, 90 minutos y 3 horas, 90 minutos y 2.5 horas, 90 minutos y 2 horas.

50 Además, la dimensión del espacio (en m3) se configura para proporcionar un tiempo de incubación de al menos 5 minutos, tal como al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 25 minutos, al menos 30 minutos, al menos 35 minutos, al menos 40 minutos, al menos 45 minutos, al menos 50 minutos, al menos 55 minutos, al menos 60 minutos. El tiempo de incubación en el espacio (V) configurado en el procedimiento de lavado de fibras es menos de 12 horas, menos de 8 horas, menos de 5 horas, menos de 3 horas, menos de 2.5 horas, menos de 2 horas, menos de 1.5 horas, menos de 1 hora.

55 Preferiblemente, el tiempo de incubación en dicho espacio (V) está en el intervalo de 0.5-3 horas, tal como 1-3 horas, 1-2 horas o tal como 85-95 minutos.

De nuevo, el flujo de producto sin fibra puede ser el parámetro de diseño y la disposición del sistema junto con un tiempo de incubación deseado puede usarse para determinar el volumen del espacio V.

5 El espacio V diseñado para la incubación preferiblemente tiene un volumen de al menos 30 m<sup>3</sup>, al menos 40 m<sup>3</sup>, al menos 50 m<sup>3</sup>, al menos 60 m<sup>3</sup>, al menos 70 m<sup>3</sup>, al menos 80 m<sup>3</sup>, al menos 90 m<sup>3</sup>, al menos 100 m<sup>3</sup>, al menos 110 m<sup>3</sup>, al menos 120 m<sup>3</sup>, al menos 130 m<sup>3</sup>, al menos 140 m<sup>3</sup>, al menos 150 m<sup>3</sup>, al menos 160 m<sup>3</sup>, al menos 170 m<sup>3</sup>, al menos 180 m<sup>3</sup>, al menos 190 m<sup>3</sup>, al menos 200 m<sup>3</sup>, al menos 210 m<sup>3</sup>, al menos 220 m<sup>3</sup>, al menos 230 m<sup>3</sup>, al menos 240 m<sup>3</sup>, al menos 250 m<sup>3</sup>, al menos 260 m<sup>3</sup>, al menos 270 m<sup>3</sup>, al menos 280 m<sup>3</sup>, al menos 290 m<sup>3</sup>, al menos 300 m<sup>3</sup>, al menos 400 m<sup>3</sup> o al menos 500 m<sup>3</sup>. El tiempo de incubación también puede ser en más de un espacio V con un volumen total o combinado de al menos 100 m<sup>3</sup>, al menos 110 m<sup>3</sup>, al menos 120 m<sup>3</sup>, al menos 130 m<sup>3</sup>, al menos 140 m<sup>3</sup>, al menos 150 m<sup>3</sup>, al menos 160 m<sup>3</sup>, al menos 170 m<sup>3</sup>, al menos 180 m<sup>3</sup>, al menos 190 m<sup>3</sup>, al menos 200 m<sup>3</sup>, al menos 210 m<sup>3</sup>, al menos 220 m<sup>3</sup>, al menos 230 m<sup>3</sup>, al menos 240 m<sup>3</sup>, al menos 250 m<sup>3</sup>, al menos 260 m<sup>3</sup>, al menos 270 m<sup>3</sup>, al menos 280 m<sup>3</sup>, al menos 290 m<sup>3</sup>, al menos 300 m<sup>3</sup>, al menos 400 m<sup>3</sup>, al menos 500 m<sup>3</sup>.

15 Durante el tiempo de incubación, se prefiere que el fluido recibido en el espacio V no se criba. Por tanto, el fluido que abandona el espacio V tiene la misma composición, por ejemplo, de almidón y fibra, que el fluido recibido en el espacio V, aunque preferiblemente contiene una mayor proporción de almidón que se ha liberado de las fibras.

Para asegurar el contacto íntimo entre las enzimas y la fibra, puede preferirse configurar el espacio V para la agitación de la materia contenida en el espacio V, tal como comprendiendo un rotor o hélice.

20 Como se ilustra en la fig. 2, se prefiere disponer el espacio V aguas abajo de la unidad de cribado más aguas arriba S1 y aguas arriba de dicha unidad de cribado más aguas abajo S4; en particular, la realización de la fig. 2 ilustra que el espacio V está dispuesto para alimentar fluido en la segunda unidad de cribado más aguas abajo S3.

25 Como se describe en este documento, el espacio puede proporcionarse de diferentes maneras y, como se ilustra en la fig. 2, el espacio V puede proporcionarse preferiblemente como una unidad de incubadora diferente. La unidad de incubadora puede configurarse mediante líneas de fluido adecuadas para recibir una primera fracción s, una segunda fracción f o una combinación de una primera y una segunda fracción s,f, preferiblemente únicamente una segunda fracción f, y suministrar el material incubado de esta manera a una unidad de cribado posterior S3.

Se hace referencia a la figura 7 que ilustra esquemáticamente una realización preferida de una incubadora de acuerdo con la presente invención; la figura 7 ilustra la incubadora en una vista en sección transversal vertical (lado izquierdo de la fig. 7), detalles sobre los agitadores dispuestos dentro de la incubadora (esquina superior derecha de la fig. 7) y en una vista en sección transversal horizontal a lo largo de A-A (esquina inferior derecha de la fig. 7).

30 Como se ilustra en la fig. 7, la incubadora 14 comprende varias cámaras 30 conectadas en serie de forma fluida (se muestran cuatro). Las cámaras 30 se conectan en serie mediante una abertura 32 que forma un paso entre dos cámaras adyacentes 30, que es una abertura 32 a través de la que puede fluir material desde una cámara aguas arriba hasta una aguas abajo 30. Se aprecia que la dirección de flujo " aguas arriba hasta aguas abajo " es en la figura en dirección descendente en la vertical y esta dirección de flujo está dictaminada típicamente por una bomba (no mostrada) y/o como se explica a continuación, mediante el uso de hélices dispuestas dentro de la incubadora 14.

35 Como se ilustra en la fig. 7, la cámara más aguas arriba 30 está conectada para recibir una primera fracción s, una segunda fracción f o una combinación de una primera y una segunda fracción s,f. En la fig. 7 la primera y la segunda fracción s, f se mezclan fuera de la incubadora 14 y se alimentan a la cámara más aguas arriba 30.

40 La cámara más aguas abajo 30 de la incubadora tiene una conexión de salida 26 adaptada para suministrar material incubado desde la incubadora 14.

45 Además, la incubadora de la fig. 7 comprende uno o más agitadores 20 (se muestran cuatro en la fig. 7) configurados para evitar la decantación de sólidos en la incubadora 14. La decantación puede ser una cuestión a considerar, ya que el material a incubar en la incubadora comprende material sólido contenido en un líquido (típicamente agua) y el material típicamente tiene una densidad que es diferente del líquido, por lo que si la mezcla de materia sólida y líquido se deja sin agitación, la materia sólida (dependiendo de la densidad) puede sedimentar en el fondo de una cámara o flotar en la superficie del líquido. Para evitar esto, la incubadora comprende los agitadores 20 para proporcionar agitación.

La incubadora 14 preferiblemente tiene una forma cilíndrica para proporcionar secciones transversales circulares como se ilustra en la vista en sección transversal a lo largo de la línea A-A.

50 Como se ilustra en la fig. 7, la incubadora 14 puede tener varias paredes, preferiblemente paredes en forma de embudo 28 (en la fig. 7, se muestran tres de estas paredes en forma de embudo), dispuestas horizontalmente distanciadas dentro de la incubadora 14 para dividir el interior de la incubadora 14 en las cámaras 30. Las paredes en forma de embudo 28 están dispuestas de modo que canalicen el material en dirección descendente desde una cámara hasta una cámara posterior 30. Es decir, el ángulo  $\alpha$  en la fig. 7 es mayor de 90 grados. Típicamente el ángulo  $\alpha$  está entre 90 y 110, tal como entre 90 y 100, preferiblemente entre 90 y 95 grados.

Como se ilustra en la vista en sección transversal a lo largo de la línea A-A en la fig. 7, las paredes en forma de embudo 28 tienen cada una su abertura 32 con el centro geométrico en la sección transversal más pequeña de cada una de las paredes con forma de embudo.

5 Como la cámara más aguas abajo 30 de la incubadora 14 no está conectada en serie de forma fluida a una cámara posterior 30, la pared del fondo de dicha cámara más aguas abajo 30 es una pared de fondo inclinada 36 que se inclina hacia una entrada de dicha conexión de salida 26. El ángulo de la inclinación se selecciona típicamente como el ángulo  $\alpha$  de las paredes en forma de embudo 28. Dicha pared inclinada en un lado tiene la ventaja de que el material contenido en la cámara se guiará por la pared hacia la conexión de salida 26.

10 La conexión de salida 26 está dispuesta para descargar material de la incubadora 14 en el fondo de la misma. Esto puede materializarse como un tubo de prolongación horizontal que se prolonga a través de la pared de la incubadora 14 en una posición cerca de la pared del fondo 36.

En la realización mostrada en la figura 7, la conexión de salida 26 está en forma de un tubo que se prolonga internamente dentro de la incubadora 14 desde una posición en la parte aguas arriba y fuera de la incubadora 14 y hasta el fondo de la cámara 30 ubicada en la parte más aguas abajo.

15 Como se ilustra en la fig. 7, véase en particular la esquina superior derecha de la fig. 7, los agitadores 20 son preferiblemente hélices que comprenden una pluralidad de palas propulsión 34. Además, la incubadora 14 comprende además un eje 18 y un motor 22 configurado para girar el eje 14; y como las hélices están dispuestas sobre dicha eje 14, la rotación del eje 14 proporciona una rotación de las hélices.

20 Como las hélices además de evitar la decantación de sólidos (por agitación) también pueden proporcionar una acción de bombeo, las hélices pueden configurarse para proporcionar una acción de bombeo que bombea material a través de la incubadora 14.

25 La combinación de bombeo y decantación puede diseñarse considerando la posición vertical de las hélices en las aberturas 32. Esto se ilustra en la fig. 7 mediante la vista aumentada (indicada por el círculo de línea discontinua) que ilustra que cada una de las hélices dispuesta en una de dichas aberturas 32 está dispuesta en una posición donde un extremo inferior de la hélice se sitúa a una distancia  $h$  por debajo del borde 32 de la abertura 32. La distancia  $h$  es preferiblemente más pequeña que la altura de la pala propulsora 34, medida en la abertura 32. Si, por ejemplo, las hélices se disponen de modo que la altura  $h$  sea igual a cero, no se produce sustancialmente acción de bombeo (hacia una cámara posterior) y la hélice sustancialmente proporciona únicamente una acción de agitación.

30 También se aprecia que, en la realización ejemplificada de la fig. 7, la pared en forma de embudo 28 se ilustra sin grosor sustancial (en comparación con la altura de la pala propulsora 34); sin embargo, si la pared 28 se diseña con un grosor sustancial, definiendo de ese modo un borde superior e inferior, se considera que la altura  $h$  es la altura de la pala propulsora 34 en el borde inferior de la pared 28. Se aprecia que aunque se prefiere que todas estas hélices estén dispuestas idénticas en cada una de las aberturas 32, las hélices pueden estar dispuestas a diferentes alturas verticales  $h$  en cada abertura 32.

35 Se aprecia que la fig. 7 en la vista aumentada también indica una zona despejada  $c$ . Esta zona despejada se selecciona típicamente para permitir que la hélice evite el contacto mecánico con la pared en forma de embudo 28.

Por tanto, uno o más de los agitadores 20/hélices se disponen cada uno preferiblemente en una de dichas aberturas 32, para proporcionar una agitación de material que fluye desde una cámara 30 hasta una cámara posterior 30 a través de la abertura 32.

40 Típicamente, una incubadora de acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, tiene un volumen total mayor de  $50 \text{ m}^3$ , tal como mayor de  $100 \text{ m}^3$ , preferiblemente mayor de  $150 \text{ m}^3$ , tal como mayor de  $200 \text{ m}^3$ .

La incubadora puede fabricarse preferiblemente, de forma parcial o completa, de acero inoxidable, pero también pueden usarse otros materiales, tales como acero recubierto, acero inoxidable recubierto, polímeros y polímeros reforzados con fibra en la construcción de la incubadora.

45 Si la incubadora se fabrica parcial o completamente de metal recubierto, el recubrimiento pueden incluir vidrio fundido, flouropolímeros fundidos o un sistema de recubrimiento termoestable basado en epoxi, poliuretano, éster de vinilo o poliéster.

Si la incubadora se fabrica de un polímero, el polímero es preferiblemente una poliolefina preferiblemente elegida de polipropileno o polietileno.

50 Si la incubadora se fabrica parcial o completamente de un polímero reforzado con fibra, las fibras de refuerzo son preferiblemente vidrio o basalto, y el material de matriz se elige preferiblemente del grupo de epoxis, ésteres de vinilo o poliésteres.

Preferiblemente, una incubadora de acuerdo con la presente invención puede comprender varias cámaras 30 conectadas en serie de forma fluida, que son dos, tales como tres, preferiblemente cuatro, tal como cinco e incluso preferiblemente seis cámaras 30 conectadas en serie de forma fluida.

Preferiblemente, todas las cámaras 30 conectadas en serie de forma fluida tienen el mismo volumen.

5 Se hace referencia a la fig. 3 que ilustra esquemáticamente una unidad de cribado con una incubadora incorporada/espacio V. Como se ilustra, la unidad de cribado/incubadora comprende en el extremo inferior un elemento de cribado 14 y por encima de este un espacio V. Dentro del espacio, las palas deflectoras están dispuestas para evitar el recorte en el flujo de fluido desde el extremo superior (que recibe, en la realización descrita de la fig. 3, las fracciones f1 y s3) hacia el elemento de cribado 14. Como también se ilustra, la corriente sin fibra s2 se criba proporcionando una fracción que contiene fibra f2.

10 La enzima usada en la liberación del almidón de la masa de granos de maíz típicamente tiene una ventana térmica dentro de la cual la liberación de enzima es más eficaz y, por lo tanto, puede ser ventajoso poder controlar la temperatura en posiciones seleccionadas en el sistema, tal como en el espacio V. Para esto, un sistema de acuerdo con la presente invención puede comprender preferiblemente termoelementos para proporcionar una temperatura de incubación del fluido dentro de dicho espacio (V), preferiblemente en el intervalo de 35-70 °C, tal como de 40-60 °C, tal como en el intervalo de 46-48 °C, tal como en el intervalo de 45-49 °C, tal como en el intervalo de 45-48 °C, tal como 47 °C. En la realización en la que el espacio se proporciona como una unidad de incubación diferente (como en la fig. 2), los termoelementos pueden estar dispuestos dentro de la unidad de incubación y/o en una carcasa que define el confinamiento de la unidad de incubación.

15 Los termoelementos son preferiblemente elementos de calentamiento/enfriamiento termoestabilizables que están adaptados para medir la temperatura y cambiar el flujo de calor hacia/desde el espacio para controlar la temperatura del material contenido en el espacio para que esté dentro de un intervalo predefinido.

20 En algunas realizaciones preferidas, los elementos de calentamiento termoestabilizables comprenden elementos eléctricos de calentamiento/enfriamiento o elementos líquidos de calentamiento/enfriamiento y detectores de temperatura.

25 Como se presenta en este documento, la unidad de cribado proporciona una separación del fluido en dos fracciones s y f y la unidad de cribado típicamente criba de una manera mecánica donde una o más, tal como todas las unidades de cribado, comprenden uno o más elementos de cribado que tienen aberturas (como se ilustra, por ejemplo, en la fig. 2 con líneas discontinuas oblicuas) configuradas para permitir el paso de materia sólida por debajo de un tamaño predefinido. El tamaño predefinido puede definirse de acuerdo con varios criterios de diseño. Sin embargo, típicamente se prefiere que no se permita el peso de ninguna fibra a través de la abertura. Por otro lado, una abertura pequeña puede tener tendencia a quedar bloqueada y, en muchos casos, el tamaño real de las aberturas se selecciona teniendo en consideración el aspecto de bloqueo y el aspecto de cribado, lo que puede provocar que se permita el peso de cantidades más de pequeñas de fibras a través.

30 En algunas realizaciones preferidas, una o más, tal como todas las unidades de cribado comprenden palas de rotor y/o tamices configurados para proporcionar dichas dos fracciones s, f. Como alternativa a los elementos de cribado hechos de aberturas, una o más, tal como todas las unidades de cribado pueden ser hidrociclones 16 como se ilustra esquemáticamente en la fig. 4.

35 Como se describe anteriormente, el sistema está configurado para introducir enzimas hidrolíticas en dicha primera fracción s y/o en dicha segunda fracción f y/o en una primera y segunda fracción mixta y/o en el agua de procedimiento, mediante un dispositivo de dosificación 10, véase la fig. 2.

40 Dicho dispositivo de dosificación 10 está adaptado típicamente para proporcionar una cantidad de dosificación controlable de enzimas, preferiblemente de acuerdo con una relación específica predeterminada entre la cantidad de enzimas y la alimentación entrante de masa de granos de maíz al sistema. Para conseguir esto, el dispositivo de dosificación 10 podría ser una bomba reguladora como se ilustra por una bomba de pistones en la fig. 2.

45 Como alternativa, el dispositivo de dosificación 10 puede ser un dispensador de flujo por gravedad que tiene una válvula de flujo saliente controlable para controlar la cantidad de enzima que fluye a través de la válvula de flujo.

50 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para mejorar el rendimiento de almidón y/o el rendimiento de gluten a partir de granos de maíz en un procedimiento de molienda en húmedo, que comprende las etapas de:

- a) remojar los granos en agua para producir granos remojados;
- b) triturar los granos remojados;
- c) separar el germen de los granos triturados y remojados para producir una masa de granos de maíz que comprende fibra, almidón y gluten; y

d) someter la masa de granos de maíz resultante a un procedimiento de lavado de fibras;

donde, durante la etapa d), una o más fracciones de la masa de granos de maíz se ponen en contacto con una cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas, caracterizado por aplicar un sistema de lavado de fibras según la invención reivindicada.

5 El tiempo de retención total en el procedimiento de lavado de fibras puede ser entre 35 minutos y 5 horas, tal como entre 35 minutos y 4 horas, 35 minutos y 3 horas, 35 minutos y 2,5 horas, 35 minutos y 2 horas, 35 minutos y 1,5 horas, 45 minutos y 5 horas, 45 minutos y 4 horas, 45 minutos y 3 horas, 45 minutos y 2,5 horas, 45 minutos y 2 horas, 1 hora y 5 horas, 1 hora y 4 horas, 1 hora y 3 horas, 1 hora y 2,5 horas, 1 hora y 2 horas, 70 minutos y 5 horas, 70 minutos y 4 horas, 70 minutos y 3 horas, 70 minutos y 2,5 horas, 70 minutos y 2 horas, 75 minutos y 5 horas, 75 minutos y 4 horas, 75 minutos y 3 horas, 75 minutos y 2,5 horas, 75 minutos y 2 horas, 80 minutos y 5 horas, 80 minutos y 4 horas, 80 minutos y 3 horas, 80 minutos y 2,5 horas, 80 minutos y 2 horas, 85 minutos y 5 horas, 85 minutos y 4 horas, 85 minutos y 3 horas, 85 minutos y 2,5 horas, 85 minutos y 2 horas, 90 minutos y 5 horas, 90 minutos y 4 horas, 90 minutos y 3 horas, 90 minutos y 2,5 horas, 90 minutos y 2 horas.

10 La una o más fracciones de la masa de granos de maíz pueden ser una primera fracción (s), una segunda fracción (f) o una primera y segunda fracción mixta como se define anteriormente.

15 En el procedimiento de lavado de fibras conocido en la técnica, puede ser difícil obtener un tiempo de retención que permita que la una o más enzimas hidrolíticas funcionen de forma óptima. Por tanto, en una realización, un espacio (V) se configura en el procedimiento de lavado de fibras, para proporcionar dicho tiempo de retención total de al menos 45 minutos, tal como al menos 50 minutos, al menos 55 minutos, al menos 60 minutos, al menos 65 minutos, 20 al menos 70 minutos, al menos 75 minutos, al menos 80 minutos, al menos 90 minutos, al menos 100 minutos, al menos 105 minutos, al menos 110 minutos, al menos 115 minutos, al menos 120 minutos, en que dicha una o más enzimas hidrolíticas están en contacto con una o más fracciones de dicha masa de granos de maíz.

25 El tiempo de retención total en el procedimiento de lavado de fibras puede ser entre 35 minutos y 5 horas, tal como entre 35 minutos y 4 horas, 35 minutos y 3 horas, 35 minutos y 2,5 horas, 35 minutos y 2 horas, 35 minutos y 1,5 horas, 45 minutos y 5 horas, 45 minutos y 4 horas, 45 minutos y 3 horas, 45 minutos y 2,5 horas, 45 minutos y 2 horas, 1 hora y 5 horas, 1 hora y 4 horas, 1 hora y 3 horas, 1 hora y 2,5 horas, 1 hora y 2 horas, 70 minutos y 5 horas, 70 minutos y 4 horas, 70 minutos y 3 horas, 70 minutos y 2,5 horas, 70 minutos y 2 horas, 75 minutos y 5 horas, 75 minutos y 4 horas, 75 minutos y 3 horas, 75 minutos y 2,5 horas, 75 minutos y 2 horas, 80 minutos y 5 horas, 80 minutos y 4 horas, 80 minutos y 3 horas, 80 minutos y 2,5 horas, 80 minutos y 2 horas, 85 minutos y 5 horas, 85 minutos y 4 horas, 85 minutos y 3 horas, 85 minutos y 2,5 horas, 85 minutos y 2 horas, 90 minutos y 5 horas, 90 minutos y 4 horas, 90 minutos y 3 horas, 90 minutos y 2,5 horas, 90 minutos y 2 horas.

30 El tiempo de retención total es el periodo de tiempo en que la masa de granos de maíz, recibida en la primera unidad de cribado (S1) y una o más fracciones de la misma, se ponen en contacto con una cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas antes de abandonar el sistema de lavado de fibras de nuevo. Durante el tiempo de retención, la una o más fracciones de masa de granos de maíz se incuban con una o más enzimas hidrolíticas en un espacio (V), antes de que abandone el sistema de lavado de fibras, como parte de una primera fracción (s1) desde la unidad de cribado más aguas arriba (S1) o como parte de una segunda fracción (f4) desde la unidad de cribado más aguas abajo (S4).

35 Preferiblemente, todas las segundas fracciones estarán en contacto con la una o más enzimas hidrolíticas a través del procedimiento completo de lavado de fibras, pero la concentración de enzima variará en las diferentes fracciones (f).

40 En una realización, el tiempo de incubación en dicho espacio configurado en el procedimiento de lavado de fibras es de al menos 5 minutos, tal como al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 25 minutos, al menos 30 minutos, al menos 35 minutos, al menos 40 minutos, al menos 45 minutos, al menos 50 minutos, al menos 55 minutos, al menos 60 minutos.

45 El tiempo de incubación en el espacio (V) configurado en el procedimiento de lavado de fibras es de menos de 12 horas, menos de 8 horas, menos de 5 horas, menos de 3 horas, menos de 2,5 horas, menos de 2 horas, menos de 1,5 horas, menos de 1 hora.

50 Preferiblemente, el tiempo de incubación en dicho espacio (V) está en el intervalo de 0,5-3 horas, tal como 1-3 horas, 1-2 horas o tal como 85-95 minutos.

55 Las enzimas pueden dosificarse a una unidad de cribado, en un punto de conexión entre dos unidades de cribado, en un espacio (V) configurado en el sistema de lavado de fibras o en el agua de procedimiento. Preferiblemente, la una o más enzimas hidrolíticas se dosifican de forma continuada, aguas arriba de la unidad de cribado más aguas abajo y aguas debajo de la unidad de cribado más aguas arriba, usando un dispositivo de dosificación con un caudal controlable.

- De acuerdo con realizaciones preferidas de la invención, el tiempo de incubación en dicho espacio V y/o el tiempo de retención total en el procedimiento de lavado de fibras proporciona formación de espuma reducida en el procedimiento de lavado de fibras. Preferiblemente, la formación de espuma se reduce en al menos un 90 % (v/v), tal como en al menos un 80 % (v/v), tal como en al menos un 70 % (v/v), tal como en al menos un 60 % (v/v), tal como en al menos un 50 % (v/v), tal como en al menos un 30 % (v/v) o tal como en al menos un 20 % (v/v).
- 5 En una realización, el procedimiento de lavado de fibras comprende 2-8 etapas de lavado de fibras.
- De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 2 unidades de cribado, se prefiere la dosificación entre la primera y la segunda unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 2.
- 10 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 3 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 3, mucho más preferido en la unidad de cribado 2 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 2 y 3.
- 15 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 4 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda o tercera unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 4, mucho más preferido en la unidad de cribado 2 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 2 y 3.
- 20 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 5 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera o cuarta unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 5, mucho más preferido en la unidad de cribado 3 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 3 y 4.
- 25 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 6 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera, cuarta o quinta unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 6, mucho más preferido en la unidad de cribado 4 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 4 y 5.
- 30 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 7 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera, cuarta, quinta o sexta unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 7, mucho más preferido en la unidad de cribado 4 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 4 y 5.
- 35 De acuerdo con realizaciones donde el sistema de lavado de fibras comprende 8 unidades de cribado, se prefiere la dosificación en la segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta o séptima unidad de cribado o en un espacio configurado entre la unidad de cribado 1 y la unidad de cribado 8, mucho más preferido en la unidad de cribado 5 o un espacio configurado entre la unidad de cribado 5 y 6.
- En una realización, una etapa de lavado de fibras comprende pasar una corriente de masa de granos de maíz y líquido/una suspensión líquida, tal como una suspensión acuosa, de masa de granos de maíz a través de una unidad de cribado configurada para separar dicha corriente de masa de granos de maíz y líquido en dos fracciones: una primera fracción s y una segunda fracción f, conteniendo dicha segunda fracción f una cantidad mayor de % en peso de fibra que la primera fracción.
- 40 Algo de material de la masa de granos de maíz recibida en la primera unidad de cribado (S1) pasará a través de todas las unidades de cribado en el sistema de lavado de fibras, dependiendo el número de unidades de cribado de la instalación de molienda específica y, por tanto, puede ser parte de más de una segunda fracción y/o llegar a ser parte de más de una primera fracción, mientras que otro material de la masa de granos de maíz no pasará a través de todas las unidades de cribado. Estas fracciones llegarán a ser parte de una o más de una primera fracción y/o una o más de una segunda fracción, pero no todas las segundas fracciones.
- 45 Preferiblemente, el material de la masa de granos de maíz que pasa a través de todas las unidades de cribado en el procedimiento de lavado de fibras comprende principalmente fibra.
- Preferiblemente, el material de la masa de granos de maíz que no pasa a través de todas las unidades de cribado en el procedimiento de lavado de fibras comprende principalmente almidón y/o gluten.
- 50 En una realización, el % en peso de almidón y/o gluten está reducido en una segunda fracción posterior (f4) en comparación con una segunda fracción anterior (f1).
- El % en peso de almidón y/o gluten puede ser mayor en una primera fracción anterior (s1) en comparación con una primera fracción posterior (s4).
- Además de observar los beneficios de las enzimas dosificadas correctamente en el procedimiento de lavado de fibras y con el tiempo de retención apropiado, los autores de la invención también observaron que la liberación de

insolubles desde las fibras: Como se muestra en la figura 9 en este documento, la liberación más eficaz de insolubles se consiguió cuando la cantidad relativa de fibra en la reacción correspondía a aproximadamente un 7,5-10 % de sólidos secos (DS).

5 Por tanto, la invención proporciona, en realizaciones particulares, un método como se describe anteriormente, donde una fracción de la masa de granos de maíz se pone en contacto con una cantidad eficaz de dicha una o más enzimas hidrolíticas, conteniendo dicha fracción una cantidad de fibra, que corresponde a un 2-15 % (p/p) de sólidos secos (DS), tal como un 5-15 % (p/p) de DS, hasta un 5-12 % (p/p) de sólidos secos (DS), hasta un 5-10 % (p/p) de sólidos secos (DS), hasta un 7.5-12.5 % (p/p) de DS, hasta un 8-12 % (p/p) de DS o hasta un 9-11 % de sólidos secos (DS).

10 La cantidad de sólidos secos puede determinarse, en particular, en una muestra de dicha una o más fracciones de la masa de granos de maíz, recogidas de un espacio (V) o unidad de incubadora como se define anteriormente, o de una entrada en dicho espacio (V) o unidad de incubadora, tal como a través de una abertura en el espacio (V) o unidad de incubadora o en dicha entrada.

15 La entrada puede ser una entrada que conecta el espacio (V) o dicha unidad de incubadora con una unidad de cribado anterior (S), que es la unidad de cribado anterior más cercana al espacio (V) o a dicha incubadora. Por tanto, se entiende que, preferiblemente, la muestra se recoge preferiblemente de la fracción o fracciones que se suministran al espacio (V) o unidad de incubadora descrita anteriormente de tal manera que el contenido de sólidos secos determinado en la muestra es una medida directa de la cantidad de sólidos secos presente en la fracción o fracciones que entran en el espacio (V) o incubadora y se ponen en contacto con la una o más enzimas hidrolíticas.

20 En particular, la cantidad de sólidos secos puede determinarse por:

- i) Proporcionando una muestra como se define anteriormente, que tiene un peso húmedo de 100 g;
- ii) Lavando la muestra en 5 l de agua destilada y pasándola a través de un tamiz de 250 µm;
- iii) Secando los sólidos, que se retienen por el tamiz, durante una noche a 50 °C;
- iv) Determinando el peso de los sólidos secados y calculando el % de sólidos secos (DS) de acuerdo con la

25 fórmula:

$$\% \text{ de DS} = \left( \frac{\text{peso de sólidos secados}}{\text{peso húmedo de la muestra}} \right) \times 100$$

30 En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas se seleccionan del grupo que consiste en celulasas (EC 3.2.1.4), xilanasas (EC 3.2.1.8), arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55 (alfa-L-arabinofuranosidasas de extremos no reductores); celobiohidrolasa I (EC 3.2.1.150), celobiohidrolasa II (E.C. 3.2.1.91), celobiosidasa (E.C. 3.2.1.176), beta-glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) y beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37).

En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas se expresan en un organismo con un fondo de celulasa, tal como *Trichoderma reesei*.

Un organismo con un fondo de celulasa, debe entenderse como un organismo que expresa de forma natural una o más enzimas celulíticas.

35 En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden una xilanasas, que es una xilanasas GH10.

En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden una xilanasas, que es una xilanasas GH11.

40 En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden una arabinofuranosidasa, que es una arabinofuranosidasa GH62.

En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden un polipéptido GH10 con actividad xilanasas, que se selecciona del grupo que consiste en

- i) Una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-26
- ii) Una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, tal como un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-26; y
- iii) Una subsecuencia de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de i) y ii).

45

En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden un polipéptido GH11 con actividad xilanasas, que se selecciona del grupo que consiste en

- i) Una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-35
- ii) Una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, tal como un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-35; y
- iii) Una subsecuencia de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de i) y ii).

5 En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden un polipéptido GH62 con actividad arabinofuranosidasa, que se selecciona del grupo que consiste en:

- iv) Una secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-21
- v) Una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, tal como un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% de identidad con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 1-21; y
- vi) Una subsecuencia de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de iv) y v).

Las subsecuencias definidas anteriormente pueden ser subsecuencias en que se han eliminado 30 restos de aminoácido o menos, tal como 25 restos de aminoácido o menos, 20 restos de aminoácido o menos, 15 restos de aminoácido o menos, 10 restos de aminoácido o menos, o 5 restos de aminoácido o menos.

15 En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos de los puntos ii) y/o v) anteriores tienen una longitud, que en un 75 % o más, tal como un 80 % o más, un 90 % o más, un 95 % o más, o un 98 % o más de la longitud de la secuencia expuesta en la respectiva SEQ ID NO.

En una realización, la una o más de dichas enzimas hidrolíticas se expresan en *Trichoderma reesei* y comprenden una xilanasa, que es una xilanasa GH10 o una xilanasa GH11 y una arabinofuranosidasa, que es una arabinofuranosidasa GH62.

En una realización, la cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas en contacto con una o más fracciones de la masa de granos de maíz no excede de 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 kg de proteína enzimática/tonelada métrica (MT) de masa de granos de maíz.

25 En una realización, la cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas en contacto con una o más fracciones de dicha masa de granos de maíz es entre 0,010-0,5 kg/MT de masa de granos de maíz, tal como entre 0,05-0,5 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,075-0,5 kg/MT o 0,1-0,5 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,01-0,4 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,05-0,4 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,075-0,4 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,1-0,4 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,01-0,3 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,05-0,3 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,075-0,3 kg/MT o 0,1-0,3 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,010-0,2 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,05-0,2 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,075-0,2 kg/MT o 0,1-0,2 kg/MT de masa de granos de maíz o tal como 0,075-0,10 kg/MT de masa de granos de maíz o 0,075-0,11 kg/MT de masa de granos de maíz.

35 En un aspecto, la invención es un procedimiento de molienda en húmedo, que comprende el uso de un procedimiento de lavado de fibras como se define anteriormente en aspectos y realizaciones de la invención. Por tanto, el procedimiento de molienda puede comprender someter la masa de granos de maíz a un procedimiento de lavado de fibras donde, durante la etapa d), una o más fracciones de la masa de granos de maíz se ponen en contacto con una cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas, y la etapa d) tiene un tiempo de retención total de al menos 35 minutos, tal como al menos 40 minutos, al menos 45 minutos, al menos 50 minutos, al menos 55 minutos, al menos 60 minutos, al menos 65 minutos, al menos 70 minutos, al menos 75 minutos, al menos 80 minutos, al menos 90 minutos, al menos 100 minutos, al menos 105 minutos, al menos 110 minutos, al menos 115 minutos, al menos 120 minutos.

45 En particular, el tiempo de retención total en el procedimiento de lavado de fibras puede ser entre 35 minutos y 5 horas, tal como entre 35 minutos y 4 horas, 35 minutos y 3 horas, 35 minutos y 2,5 horas, 35 minutos y 2 horas, 35 minutos y 1,5 horas, 45 minutos y 5 horas, 45 minutos y 4 horas, 45 minutos y 3 horas, 45 minutos y 2,5 horas, 45 minutos y 2 horas, 1 hora y 5 horas, 1 hora y 4 horas, 1 hora y 3 horas, 1 hora y 2,5 horas, 1 hora y 2 horas, 70 minutos y 5 horas, 70 minutos y 4 horas, 70 minutos y 3 horas, 70 minutos y 2,5 horas, 70 minutos y 2 horas, 75 minutos y 5 horas, 75 minutos y 4 horas, 75 minutos y 3 horas, 75 minutos y 2,5 horas, 75 minutos y 2 horas, 80 minutos y 5 horas, 80 minutos y 4 horas, 80 minutos y 3 horas, 80 minutos y 2,5 horas, 80 minutos y 2 horas, 85 minutos y 5 horas, 85 minutos y 4 horas, 85 minutos y 3 horas, 85 minutos y 2,5 horas, 85 minutos y 2 horas, 90 minutos y 5 horas, 90 minutos y 4 horas, 90 minutos y 3 horas, 90 minutos y 2,5 horas, 90 minutos y 2 horas.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: El punto de dosificación óptimo de enzimas en molienda en húmedo

A causa de los tiempos de residencia cortos en el procedimiento de molienda en húmedo, la selección de la ubicación óptima para dosificar las enzimas es crítica para maximizar el contacto entre la enzima y el sustrato. Esto significa conseguir la máxima concentración de enzima a una tasa de dosis dada dentro de las secciones del procedimiento donde el sustrato está más disponible. Sin embargo, esta determinación no se hace fácilmente a causa de las numerosas divisiones y reciclados de las corrientes en el procedimiento. Para ayudar a proporcionar una respuesta para el punto de dosificación óptimo, se realizó una simulación del procedimiento.

Método:

1. La simulación de modelo se hizo en SuperPro Designer V.9 (versión de evaluación). El modelo USDA representa una planta de molienda en húmedo de 100,000 bu/día, incluyendo todas las operaciones de la unidad. No se hicieron cambios al modelo, excepto introducir la enzima en cuatro puntos diferentes en el procedimiento, ilustrados en la figura 5. Estos puntos de dosis, mencionados como casos, son (1) después de la 2.<sup>a</sup> trituración, (2) después de la 3.<sup>a</sup> trituración, (3) después de la 4.<sup>a</sup> etapa de lavado de fibras, y (4) después de la 6.<sup>a</sup> etapa de lavado de fibras (última fase de lavado antes del prensado de las fibras). La tasa de alimentación de enzima se vinculó a una dosis de 0,20 kg/MT de maíz.

2. Un parámetro determinante para la simulación es la característica de reparto de la enzima. En este caso, se adoptó la suposición simple de que la enzima se comporta exactamente como un sólido soluble. Esta suposición está apoyada por los datos de la figura 6 que muestra cerca de un 100 % de recuperación de enzima en el filtrado, durante incubación de fibras en el laboratorio.

3. El reparto de componentes solubles en el modelo se basaba principalmente en datos empíricos sobre solubles y la humedad de algunas de las corrientes que provienen de unidades de separación, tales como centrífugas y cribas (Referencia: Ramirez et al. 2008; Industrial Crops and Products 27; 91-97), con el resto aproximado usando el modelo.

4. Tomando los parámetros anteriores tal cual del modelo USDA, se resolvió el equilibrio de masas usando Superpro (se ignoró el equilibrio energético en este caso). Los resultados del equilibrio de masas se comprobaron para la precisión después de la convergencia, como se muestra en la tabla 1 para uno de los casos simulados. Una vez resuelto el equilibrio de masas, se obtienen los caudales de masa (en fase estacionaria) de las diferentes corrientes intermedias como un resultado. Estos caudales de masa son los datos necesarios para calcular una dosis eficaz de enzima (o relación de enzima a sólidos de fibra) en las diferentes fases del segmento de lavado de fibras.

Tabla 1: Balance total de componentes (kg/h)

Componente	ENTRANTE	SALIENTE	ENTRANTE-SALIENTE
Esep	18.000	18.000	0.000
Fibra	11.172.400	11.172.400	0.000
Germen	6.8847.600	6.847.600	0.000
Gluten	5.586.200	5.586.200	0.000
Nitrógeno	94.997.522	94.997.522	0.000
Oxígeno	28.839.407	28.766.839	72.569
Sólidos solubles	6.577.300	6.577.300	0.000
Almidón	59.916.500	59.916.500	0.000
Azúfre	72.718	0.000	72.718
Ácido sulfuroso	0.000	186.139	-186.139
Agua	151.028.444	150.987.579	40.865
TOTAL	365.056.092	365.056.078	0.014

5. Como la fibra se considera el sustrato diana, la dosis eficaz se tomó como la relación de enzima a fibra dentro del segmento pertinente del procedimiento. Por motivos de simplicidad, se acepta que este segmento empieza en la segunda trituración y acaba en la última etapa de lavado de fibras exactamente antes del prensado de las fibras. Esto incluiría cada etapa del procedimiento donde se espera que tenga lugar el contacto de sustrato-enzima pertinente. Se determina una dosis promediada ponderada para el segmento completo calculando los tiempos de residencia de los tanques de recepción, colocados después de cada criba para la dosis eficaz individual en cada

etapa del procedimiento incluida. El segmento completo en este caso tuvo un tiempo de residencia total de 1.28 h. Sin embargo, debe apreciarse que el tiempo de residencia se debe al uso de tanques de recepción, que algunas plantas pueden tener o no. Además, el tamaño del tanque puede variar de una planta a otra. Sin embargo, independientemente del tamaño del tanque, no deben cambiar las conclusiones a las que se ha llegado.

5 Resultados:

La tabla 2 a continuación representa el promedio de las dosis de enzima eficaces ponderadas (calculando los tiempos de residencia) en diversas fases del procedimiento de molienda en húmedo, para cada uno de los casos de dosificación simulado. A partir de esto parece que la dosificación en el lavado de fibras produce niveles mayores de enzima en comparación con la 2.<sup>a</sup> trituración o la 3.<sup>a</sup> trituración. El mejor caso sugiere la dosificación hacia el final de las etapas de lavado de fibras, pero no en la última etapa de lavado.

10

Tabla 2: Conc. de enzima promedio ponderada para los diferentes casos (pesos basados en los tiempos de residencia de las operaciones incluidas).

Caso	Ubicación de dosis	Conc. eficaz promedio ponderada (% p/p fibra)
1	2. <sup>a</sup> trituración	0,51
2	3. <sup>a</sup> trituración	0,53
3	Etapas de lavado de fibras 4	0,72
4	Etapas de lavado de fibras 6	0,64

Las concentraciones de enzima residual (ppm basado en el peso del producto total) en los diferentes casos de dosificación se dan en la tabla 3 a continuación. En general, los niveles son muy similares para los diferentes casos. Los niveles máximos se encuentran en el pienso de gluten seco (DGF), ya que la mayoría de las enzimas (>85 %) terminan con el licor de macerado que se añade de nuevo al DGF. La suspensión de almidón tiene lo mínimo, menos de una décima de una ppm, a causa del lavado de almidón extensivo que tiene lugar. Esto es importante, ya que la corriente de almidón es el lugar más probable para que la enzima retenga alguna actividad; todo lo demás pasará a través de secado a alta temperatura, que desactivaría potencialmente las enzimas.

15

20

Tabla 3: Concentraciones de enzima residual (base de peso total) en las corrientes de producto final.

Productos finales	Enzima residual (ppm)			
	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4
Suspensión de almidón	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Harina de gluten seco	218	218	207	170
Pienso de gluten seco	814	814	821	844
Germen seco	169	168	160	131

**Ejemplo 2. El efecto de la enzima sobre la viscosidad de la suspensión de fibras**

En este ejemplo, se midió el perfil de viscosidad de la suspensión de fibras a lo largo del tiempo usando un RVA (viscoanalizador rápido). La suspensión de fibras se recogió del excedente de la 5.<sup>a</sup> fase de lavado de fibras que contenía un 12 % de sólidos secos. En un tratamiento, se añadieron enzimas hidrolíticas a una dosis de 1 mg de proteínas BCA/g de sólidos secos. En otro, se añadió únicamente agua de volumen equivalente, para que sirviera como control negativo. El tiempo total de la ejecución del RVA fue 90 minutos, y la temperatura se estableció a 48 °C. Los número de viscosidad absoluta son muy sensibles a la consistencia de las muestras, y debido a la falta de homogeneidad de la suspensión, es difícil asegurar que los valores de partida son similares. Se establecieron las rpm de la hélice del RVA a diferentes valores para mantener la viscosidad de partida lo más cerca posible entre los dos tratamientos. Sin embargo, debe apreciarse que más importante que el valor absoluto de los resultados es el cambio en la viscosidad a lo largo del tiempo.

25

30

El cambio en la viscosidad es una manera conveniente de seguir el cambio en la concentración de agua de la suspensión debido al tratamiento enzimático. En un caso ideal de una suspensión newtoniana, la viscosidad eficaz es una función positiva de la fracción volumétrica de sólidos (Bailey, J.E. y Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals 2.<sup>a</sup> ed*, 1986, McGraw-Hill, Inc. Página 502). Aunque muy probablemente la suspensión se comporta

35

de forma no newtoniana, no cambiar la generalidad de que según aumenta la fracción volumétrica de sólidos (o de forma equivalente, disminuye la fracción volumétrica acuosa), aumenta la viscosidad, y viceversa. De modo que si se produce drenaje durante la reacción enzimática, esto debe provocar que la fracción volumétrica de sólidos descienda (o de forma equivalente, la fracción volumétrica acuosa asciende) y, por consiguiente, la viscosidad desciende con esta.

Las medidas de RVA se tomaron de forma continua, y para resumir los resultados, se calculó un promedio de ejecución por cada 10 minutos de duración. Cada promedio y desviación típica calculados consistían en >300 puntos de datos. Las tablas 4 y 5 a continuación muestran los resultados para las muestras tratadas con enzima y de control, respectivamente

10 Tabla 4: Viscosidad promedio (en centipoise) medida en duraciones de tiempo de 10 min durante la prueba de RVA de 90 min. Con adición de enzimas hidrolíticas

Intervalo de tiempo (min)	Promedio (cP)	Des. típ.	% cambio del valor de partida
0,10	6404	2671	0%
10,20	5774	1970	-10%
20,30	4891	1182	-24%
30,40	4144	1073	-35%
40,50	3181	661	-50%
50,60	3143	749	-51%
60,70	2938	607	-54%
70,80	2803	585	-56%
80,90	2753	612	-57%

Tabla 5. Viscosidad promedio (en centipoise) medida en duraciones de tiempo de 10 min sobre la ejecución de RVA de 90 min. Sin adición de enzimas hidrolíticas.

Intervalo de tiempo (min)	Promedio (cP)	Des. típ.	% de cambio desde el valor de partida
0,10	5733	378	0%
10,20	5719	409	0%
20,30	5803	407	1%
30,40	5661	379	-1%
40,50	5610	357	-2%
50,60	5527	327	-4%
60,70	5644	355	-2%
70,80	5741	393	0%
80,90	5645	405	-2%

15 Surgieron diferencias muy claras en el perfil de viscosidad entre la suspensión de fibras tratada con enzima y no tratada. Se observó reducción significativa (en más de un 50 %) de la viscosidad durante el tiempo de reacción de 90 min cuando se añadió enzima. Por el contrario, no se observó cambio de la viscosidad sin adición de enzima en la suspensión de fibra durante el mismo periodo. Además, la mayor parte del cambio de viscosidad en la suspensión tratada con enzima se producía en los primeros 40 min, y después tiene lugar una disminución más gradual de ahí en adelante. (No está tan claro en los promedios discretizados anteriores, pero en los datos de viscosidad continuos, el punto de inflexión se produce cerca del punto temporal de 40 min). Otra característica sobresaliente es los valores de viscosidad más erráticos obtenidos en la suspensión tratada con enzima, especialmente en los primeros 10 a 20 min, como se describe por las elevadas desviaciones típicas observadas durante este periodo, y que gradualmente desaparecen después de 40 min. Esto no se observó en el caso del control negativo. Esta observación sorprendente

probablemente se debe a que tiene lugar una eliminación durante el primer periodo de tiempo, donde agua que se acaba de liberar de estar unida por la fibra aún no se ha equilibrado con la fase acuosa, provocando de este modo una ausencia de homogeneidad transitoria que contribuye a la variación de la viscosidad. Estas observaciones señalan la noción de una rápida fase de drenaje que se produce durante la reacción enzimática.

5 **Ejemplo 3. El efecto del tiempo de incubación y la dosis de enzima sobre el rendimiento de almidón y gluten.**

En este ejemplo, se midió el almidón y el gluten separados de la fibra después de incubación con y sin enzima hidrolítica (polipéptidos maduros de la SEQ ID NO: 7 y 22, expresados en *Trichoderma reesei*), mientras se variaba el tiempo de incubación y la dosis de enzima. La muestra de fibras se obtuvo de una planta de molienda en húmedo después de prensar la fibra con un contenido de materia seca total de un 41 %. La muestra se resuspendió en tampón (pH 4, acetato de Na 0.02 M) hasta una suspensión de 100 g que contenía un 5 % de sólidos secos. A esta suspensión se añadió enzima a una relación final de 0, 2, 6, y 10 mg de concentrado de enzima por g de sólidos secos de sustrato (un gramo de concentrado de enzima contiene aproximadamente 280 mg proteínas). La incubación se hizo a 50 °C en una incubadora calentada por aire con agitación constante, variando el tiempo de incubación a 10, 50 y 90 min. Después de la incubación, las muestras se enfriaron rápidamente en agua con hielo (5 °C) antes del procesamiento. La suspensión se transfirió a un tamiz de 100 micrómetros, mientras se recogía el filtrado que pasaba a través. La fibra que se retuvo sobre el tamiz se prensó usando una espátula para recuperar la mayor cantidad de filtrado posible. La fibra prensada entonces se transfirió a un vaso de precipitados que contenía 200 ml de agua y se agitó. Esta suspensión se pasó de nuevo a través del tamiz de 100 micrómetros, y el filtrado recogido se combinó con el primero. Las etapas de prensado, lavado y filtración se repitieron una vez más, de modo que se recuperó un filtrado final y se combinó con los dos primeros. El filtrado combinado entonces se filtró al vacío, esta vez a través de un papel de microfiltro de vidrio (Whatman) que retuvo los sólidos insolubles que se liberaron de la fibra y pasaron a través de la criba de 100 micrómetros. Después de pasar 200 ml de agua sobre el papel de filtro para retirar cualquier resto de solubles, los sólidos insolubles totales retenidos en el papel de filtro se secaron y pesaron. El peso seco se presentó como almidón+gluten liberado como el porcentaje de materia seca de fibra del sustrato de partida. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento de almidón y gluten liberado de fibra a diferente dosis de enzima y tiempo de incubación.

Tiempo de incubación (min)	Dosis (mg/g fibra)	Almidón+gluten liberado (% de fibra)
10	0	4,98%
	2	7,49%
	6	8,54%
	10	8,13%
50	0	6,16%
	2	9,04%
	6	12,29%
	10	13,29%
90	0	5,04%
	2	10,44%
	6	14,02%
	10	15,11%

El efecto de la adición de enzima es evidente por el aumento en los rendimientos de almidón y gluten para todos los tiempos de incubación. Sin embargo, la respuesta a la dosis es plana para un tiempo de incubación de 10 minutos, mientras que hay una respuesta abrupta a la dosis en la incubación de 50 min, y especialmente en la incubación de 90 min. Con estos tiempos de residencia más largos, una dosis inferior puede conseguir los rendimientos que únicamente una dosis mucho mayor puede para un tiempo de residencia más corto. Por ejemplo, una dosis de 6 mg a 90 min pudo conseguir un rendimiento mayor que una dosis de 10 mg a 50 min. Esto también subraya la importancia de tener un tiempo de incubación suficiente mínimo para que la enzima funcione, como por ejemplo, una incubación de 10 min, independientemente de la dosis, no podría obtener rendimientos de incluso la dosis más baja (es decir, 2 mg) con una incubación más larga.

**Ejemplo 4: Efecto de tiempo de retención aumentado sobre los rendimientos de almidón y gluten en molienda en húmedo**

Sistema de lavado de fibras:

5 El diseño de lavado de fibras de la instalación de ensayo consiste en cuatro unidades de cribado. Se instaló un tanque de incubación (250 m<sup>3</sup>) entre la segunda y la tercera unidad de cribado para permitir un tiempo de retención adicional de la masa de granos de maíz o fracciones de la misma. Las enzimas (polipéptidos maduros de la SEQ ID NO: 7 y 22, expresados en *Trichoderma reesei*) se dosificaron en la segunda criba, antes del tanque de almacenamiento. Sin el tanque de incubación adicional, el tiempo de retención (RT) en el sistema de lavado de fibras se estimó en aproximadamente 10 min (basado en la capacidad total de los tanques de recepción preexistentes). El efecto del tiempo de retención se evaluó aumentando la capacidad de utilización del tanque adicional de un 0 %, a un 40 % (100 m<sup>3</sup>, añadiendo 40 min de RT), y después finalmente hasta un 80 % (200 m<sup>3</sup>, añadiendo 80 min de RT).

Método:

15 La fibra se lavó en un sistema de lavado de fibras como se describe anteriormente. El ensayo sin enzimas y tanque de incubación se ejecutó durante 3 meses. El ensayo sin tanque de incubación (10 min de RT), pero con enzimas, se ejecutó durante 4 semanas a una dosis de enzima de 0.5 kg/MT de maíz. El experimento con tanque de incubación (100 m<sup>3</sup>), 50 min de RT (40 min de tiempo de incubación) y enzimas se ejecutó durante 1 semana a una dosis de enzima de 0.5 kg/MT de maíz. El experimento con tanque de incubación (200 m<sup>3</sup>), 90 min de RT (80 min de tiempo de incubación) y enzimas se ejecutó durante 2 semanas a una dosis de enzima de 0.5 kg/MT de maíz.

20 Después del lavado de las fibras, la fibra se prensó para disminuir el contenido de agua antes del secado.

Una muestra de fibra húmeda se pesó antes de determinar el almidón total (%) y la proteína total (%) en la fibra húmeda. El almidón total (%) se determinó mediante un método enzimático establecido para medir el almidón total en productos de cereal (Método 76-13, AACC International 2000). La proteína total (%) se determinó por el micrométodo de Kjeldahl de medición de proteína cruda (AACCI Método 46-13.01).

25 Una muestra de fibra húmeda se secó después y se determinó el peso de fibra seca, para permitir el cálculo de almidón total y proteína total (%) en fibra seca.

30 El almidón total puede dividirse en almidón extraíble (almidón que puede retirarse por lavado) y almidón unido (almidón que está atrapado con la fibra, incluso lavando). La cantidad de almidón que queda en una muestra después de una etapa de lavado adicional en agua limpia (almidón unido) se usó como control, para asegurar que el almidón y la proteína se liberaban de la fibra. La muestra se lavó con 10 l de agua y se filtró a través de un tamiz de 50 micrómetros para eliminar por lavado el almidón extraíble antes de medir el almidón unido. El procedimiento se ilustra en el diagrama de flujo de la figura 8.

35 El almidón (% en peso) y la proteína (% en peso) totales de fibra seca refleja la cantidad de almidón y proteína aún presente en la fibra después del lavado de las fibras, prensado y secado. Esta cantidad de almidón y proteína en teoría debe disminuir según aumenta el tiempo de retención, ya que la hipótesis es que las enzimas catalizan la liberación de almidón y proteína en la corriente del procedimiento. El efecto sobre el almidón total (% en peso) y la proteína total (% en peso) de la fibra seca, mediante cambio en el tiempo de retención se da en la tabla 7 a continuación. Como se muestra, hay un efecto significativo sobre la retirada de almidón y proteína mediante la adición de la enzima, incluso al tiempo de retención original de 10 min. Con un tiempo de retención aumentado (+80 min de RT) puede observarse una disminución tanto en el almidón total como en la proteína total, lo que refleja que un tiempo de retención aumentado en el lavado de las fibras puede aumentar, de hecho, los rendimientos de almidón y proteína total en molienda en húmedo de maíz.

45 La humedad total (% en peso) de la fibra húmeda prensada se calculó como: el peso de fibra húmeda menos el peso de fibra seca. El contenido de humedad disminuye en la fibra húmeda (drenaje) con la adición de enzimas, pero no parece verse afectado por el tiempo de retención.

Tabla 7:

Fibra húmeda (Después de prensado de fibras)	Valor inicial <sup>a</sup>	Enzima (10 min de RT) <sup>b</sup>	Enzima (50 min de RT) <sup>c</sup>	Enzima (90 min de RT) <sup>d</sup>
Fibra seca (%) de fibra húmeda	38,5	42,0	43,7	33,05
Humedad (%) de fibra húmeda	61,5	58,0	56,3	56,95
Almidón total (%) de fibra seca	25,85	21,85	21,2	19,25
Proteína (%) de fibra seca	11,44	10,68	11,16	10,35
Almidón unido (%) de fibra seca	20,37	17,54	17,3	15,35
<sup>a</sup> Promedio del valor inicial a lo largo de 3 meses sin enzima <sup>b</sup> Promedio a lo largo de 4 semanas a dosis de 0,5 kg/MT (<1 semana a 1,2 kg/MT) <sup>c</sup> Promedio a lo largo de 1 semana a dosis de 0,5 kg/MT <sup>d</sup> Promedio a lo largo de 2 semanas a dosis de 0,5 kg/MT				

**Ejemplo 5: Efecto de la cantidad de sólidos secos sobre los insolubles liberados de la fibra de partida en reacción enzimática.**

5 En este ejemplo, se midieron los sólidos insolubles que se separan de la fibra después de la incubación con enzima (Frontia® Fiberwash, disponible en el mercado de Novozymes A/S) a % variables de sólidos secos.

La muestra de fibras se obtuvo de una planta de molienda en húmedo después de la prensa Vetter con un contenido de materia seca total de un 42.80 %. La muestra se resuspendió en tampón (pH 4, acetato de Na 0.02 M) hasta una suspensión que contenía diversos sólidos secos. A esta suspensión se añadió la enzima a 0.9 kg/MT de maíz húmedo.

10 El % de DS se ajustó con diversas cantidades de agua como se muestra en la tabla a continuación para conseguir un intervalo de % de DS.

*(Sólidos secos de fibra / % de sólidos secados) – Peso de fibra = Agua añadida*

% de DS	Tiempo incubado (min)	N.º de tubo	Peso de fibra (g)	DS de fibra (g)	Enzima	Amortiguador	Añadir agua (ml)
2,00 %	2	1	8,08	3,46	73	1,00	165
2,00 %	2	2	8,14	3,48	74	1,00	166
2,00 %	2	3	8,36	3,58	76	1,00	171
8,00 %	2	4	13,54	5,80	123	1,00	59
8,00 %	2	5	13,21	5,65	120	1,00	57
8,00 %	2	6	13,34	5,71	121	1,00	58
12,00 %	2	7	13,14	5,62	119	1,00	34
12,00 %	2	8	13,23	5,66	120	1,00	34
12,00 %	2	9	13,06	5,59	118	1,00	34

## ES 2 990 148 T3

% de DS	Tiempo incubado (min)	N.º de tubo	Peso de fibra (g)	DS de fibra (g)	Enzima	Amortiguador	Añadir agua (ml)
15,00 %	2	10	13,01	5,57	118	1,00	24
15,00 %	2	11	13,06	5,59	118	1,00	24
15,00 %	2	12	13,08	5,60	119	1,00	24
18,00 %	2	13	13,20	5,65	120	1,00	18
18,00 %	2	14	13,10	5,61	119	1,00	18
18,00 %	2	15	13,03	5,58	118	1,00	18

La incubación se hizo a 48 °C en un reactor Werner Mathis AG Labomat con mezcla constante durante 120 minutos. Después de la incubación, las muestras se enfriaron rápidamente en agua con hielo (5 °C) antes del procesamiento.

5 La suspensión después se vertió en un exprimidor Omega 1000 y el autotransformador variable se ajustó a un 30 % de potencia durante 1 minuto. El filtrado se cogió con una criba de 75 µm y bandeja de recogida. Los sólidos insolubles en la bandeja de recogida se transfirieron a un frasco Nalgene de 500 ml. La fibra se raspó de la cesta del exprimidor Omega 1000 y se lavó con 200 ml de agua DI en un vaso de precipitados con una espátula. La suspensión de fibras entonces se vertió de nuevo en el exprimidor y se procesó durante 1 minuto a un 30 % de potencia. De nuevo el filtrado se vertió sobre un tamiz de 75 µm y bandeja de recogida, los sólidos insolubles se transfirieron al mismo frasco Nalgene. La cesta de jugo se sacó del exprimidor y el cuerpo del exprimidor se aclaró con un frasco de pulverización de agua para aclarar todos y cada uno de los insolubles sobre el tamiz de 75 µm y bandeja de recogida y se transfirieron al frasco Nalgene de 500 ml.

15 El frasco entonces se tapó y los sólidos insolubles se separaron usando filtración por vacío. La configuración de filtración por vacío utilizó un embudo con papel de filtro (Whatman), la suspensión de sólidos insolubles se vertió sobre el papel de filtro al vacío. Se tomó el peso del papel de filtro antes de la filtración y el papel de filtro se puso en un horno a 50 °C para secarlo y se tomó el peso después de 24 horas en el horno.

Los sólidos insolubles se presentan en la tabla a continuación y también se muestran en la figura 9.

% de DS	% de sólidos insolubles liberados de la fibra de partida
2,00 %	11,74 %
2,00 %	16,65 %
2,00 %	13,25 %
8,00 %	23,94 %
8,00 %	21,47 %
8,00 %	21,91 %
12,00 %	18,57 %
12,00 %	20,52 %
12,00 %	19,10 %
15,00 %	17,55 %
15,00 %	15,14 %
15,00 %	16,53 %

## ES 2 990 148 T3

% de DS	% de sólidos insolubles liberados de la fibra de partida
18,00 %	9,44 %
18,00 %	10,68 %

Lista de símbolos de referencia usados:

	S	Criba
	f	Fracción producida por una criba
	V	Hueco/espacio
5	c	Zona despejada
	h	Altura
	10	Dispositivo de dosificación
	12	Elemento de cribado
	14	Incubadora
10	16	Hidrociclón
	18	Eje
	20	Medio de agitación; agitador
	22	Motor
	26	Conexión de salida
15	28	Pared en forma de embudo
	30	Cámara
	32	Abertura
	34	Palas propulsoras
	36	Pared de fondo inclinada
20	32	Borde de abertura

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema de lavado de fibras que comprende una pluralidad de unidades de cribado (S1...S4) que están conectadas de forma fluida en una configuración de lavado a contracorriente; cada unidad de cribado está configurada para separar una corriente de masa de granos de maíz y líquido en dos fracciones:
- 5       - una primera fracción (s) y una segunda fracción (f), conteniendo dicha segunda fracción (f) una cantidad mayor medida en % en peso de fibra que la primera fracción (s);
- en el que el sistema está configurado para
- introducir masa de grano de maíz y líquido a la unidad de cribado más aguas arriba (S1)
- 10       - dejar salir la primera fracción (s1) de la unidad de cribado más aguas arriba (S1) como una corriente de producto que contiene almidón,
- introducir agua de procedimiento, preferiblemente dispuesta para introducir agua de procedimiento a una unidad de cribado más aguas abajo (S4),
- dejar salir la segunda fracción (f4) de la unidad de cribado más aguas abajo (S4) como una masa de granos de maíz lavados que contiene una cantidad menor de almidón y gluten que la masa de granos de maíz originales,
- 15       - introducir enzimas hidrolíticas en el sistema;
- caracterizado por que el sistema está configurado para introducir dichas enzimas hidrolíticas en dicha primera fracción (s), y/o en dicha segunda fracción (f), y/o en una primera y segunda fracción mezcladas y/o en la corriente de agua de procedimiento suministrada al sistema; y en el que el sistema comprende una unidad de cribado más aguas arriba (S1... S4), una unidad de cribado más aguas abajo, y una o más unidades de cribado
- 20       intermedias dispuestas de manera fluida entre las unidades de cribado más aguas arriba y más aguas abajo (S1, S4); y en el que dicha configuración de lavado a contracorriente conectada de manera fluida, que comprende la pluralidad de unidades de cribado (S1... S4), se dispone de una manera tal que: una segunda fracción (f1) producida por una unidad de cribado aguas arriba (S1) se mezcla con una primera fracción (s3) producida por una unidad de cribado aguas abajo (S3), y siendo separadas dichas fracciones mezcladas por una unidad de cribado
- 25       de cribado (S2), que es intermedia entre dichas unidades de cribado aguas arriba y aguas abajo (S1, S3), en una primera fracción (s2) y una segunda fracción (f2); un espacio (V) dispuesto en el sistema y que está conectado de manera fluida para recibir una de dicha primera fracción (s), una de dicha segunda fracción (f), o una primera y segunda fracción (s,f) mezcladas, preferiblemente sólo una segunda fracción (f), y configurado para proporcionar un tiempo de incubación para una o ambas fracciones recibidas en el espacio; y para dejar salir la una o ambas fracciones incubadas de ese modo a una unidad de cribado aguas abajo (S4), y en el que dicho espacio (V) está configurado para proporcionar un tiempo de incubación de al menos 5 minutos, preferiblemente al menos 15 minutos, tal como al menos 30 minutos, preferiblemente al menos 45 minutos, tal como al menos 1 hora, y preferiblemente menos de 12 horas.
- 30
- 35       2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que una o más, tal como todas las unidades de cribado son hidrociclones (16).
3. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sistema está configurado para introducir enzimas hidrolíticas en dicha primera fracción (s) y/o en dicha segunda fracción (f) y/o en una primera y segunda fracción mixta y/o en el agua de procedimiento, mediante un dispositivo de dosificación (10).
- 40       4. El sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho dispositivo de dosificación (10) está adaptado para proporcionar una cantidad de dosificación controlable de enzimas, preferiblemente de acuerdo con una relación específica predeterminada entre la cantidad de enzimas y la alimentación entrante de masa de granos de maíz al sistema.
5. El sistema de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que el dispositivo de dosificación (10) es una bomba reguladora.
- 45       6. El sistema de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en el que el dispositivo de dosificación (10) es un dispensador de flujo por gravedad que tiene una válvula de flujo saliente controlable para controlar la cantidad de enzima que fluye a través de la válvula de flujo.
7. Un sistema de molienda en húmedo de granos de maíz que comprende un sistema de lavado de fibras como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 50       8. Un método para mejorar el rendimiento de almidón y/o el rendimiento de gluten a partir de granos de maíz en un procedimiento de molienda en húmedo, que comprende las etapas de:
- a) empapar los granos en agua para producir granos empapados s;

- b) triturar los granos empapados;
- c) separar el germen de los granos triturados y empapados para producir una masa de granos de maíz que comprende fibra, almidón y gluten; y
- d) someter la masa de granos de maíz resultante a un procedimiento de lavado de fibras;
- 5 en el que, durante la etapa d), una o más fracciones de la masa de granos de maíz se pone en contacto con una cantidad eficaz de una o más enzimas hidrolíticas, caracterizado por aplicar un sistema de lavado de fibras según la reivindicación 1.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho espacio (V) está configurado para proporcionar un tiempo de incubación de enzima en el espacio (V) de 0,5 a 3 horas, y un tiempo de retención total en el sistema de lavado de fibras de 35 minutos a 5 horas.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que la segunda fracción (f) de la masa de grano de maíz puesta en contacto con una o más enzimas hidrolíticas en el espacio (V), tiene un contenido de fibra, que corresponde a 2-15 % (p/p) de sólidos secos (DS), a 5-15 % (p/p) de DS, a 5-12 % (p/p) de sólidos secos (DS), a 5-10 % (p/p) de sólidos secos (DS), a 7,5-12,5 % (p/p) de DS, a 8-12 % (p/p) de DS o a 9-11 % de sólidos secos (DS).
11. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que una o más de dichas enzimas hidrolíticas se selecciona/seleccionan del grupo que consiste en celulasas (EC 3.2.1.4), xilanasas (EC 3.2.1.8) arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55 (alfa-L-arabinofuranosidasas de extremo no reductor); EC 3.2.1.185 (beta-L-arabinofuranosidasas de extremo no reductor) celobiohidrolasa I (EC 3.2.1.150), celobiohidrolasa II (E.C. 3.2.1.91), celobiosidasa (E.C. 3.2.1.176), beta-glucosidasa (E.C. 3.2.1.21), beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37).
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que la una o más de dichas enzimas hidrolíticas se expresan en un organismo con un fondo de celulasa, tal como *Trichoderma reesei*.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden una xilanasas, que es una xilanasas GH10.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en el que la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden una arabinofuranosidasa, que es una arabinofuranosidasa GH62.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-14, en el que la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden un polipéptido GH10 con actividad xilanasas, que se selecciona del grupo que consiste en
- i) Una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-26;
- ii) Una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-26; y
- iii) Una subsecuencia de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos en i) y ii).
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden un polipéptido GH11 con actividad xilanasas, que se selecciona del grupo que consiste en
- i) Una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-35
- ii) Una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 27-35; y
- iii) Una subsecuencia de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos en i) y ii).
17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-16, en el que la una o más de dichas enzimas hidrolíticas comprenden un polipéptido GH62 con actividad arabinofuranosidasa, que se selecciona del grupo que consiste en:
- i) Una secuencia de aminoácidos como se expone en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-21
- ii) Una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 1-21; y
- iii) Una subsecuencia de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos en iv) y v).
18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en el que la una o más de dichas enzimas hidrolíticas se expresa en *Trichoderma reesei*, y comprenden una xilanasas, que es una xilanasas GH10, y una arabinofuranosidasa, que es una arabinofuranosidasa GH62.

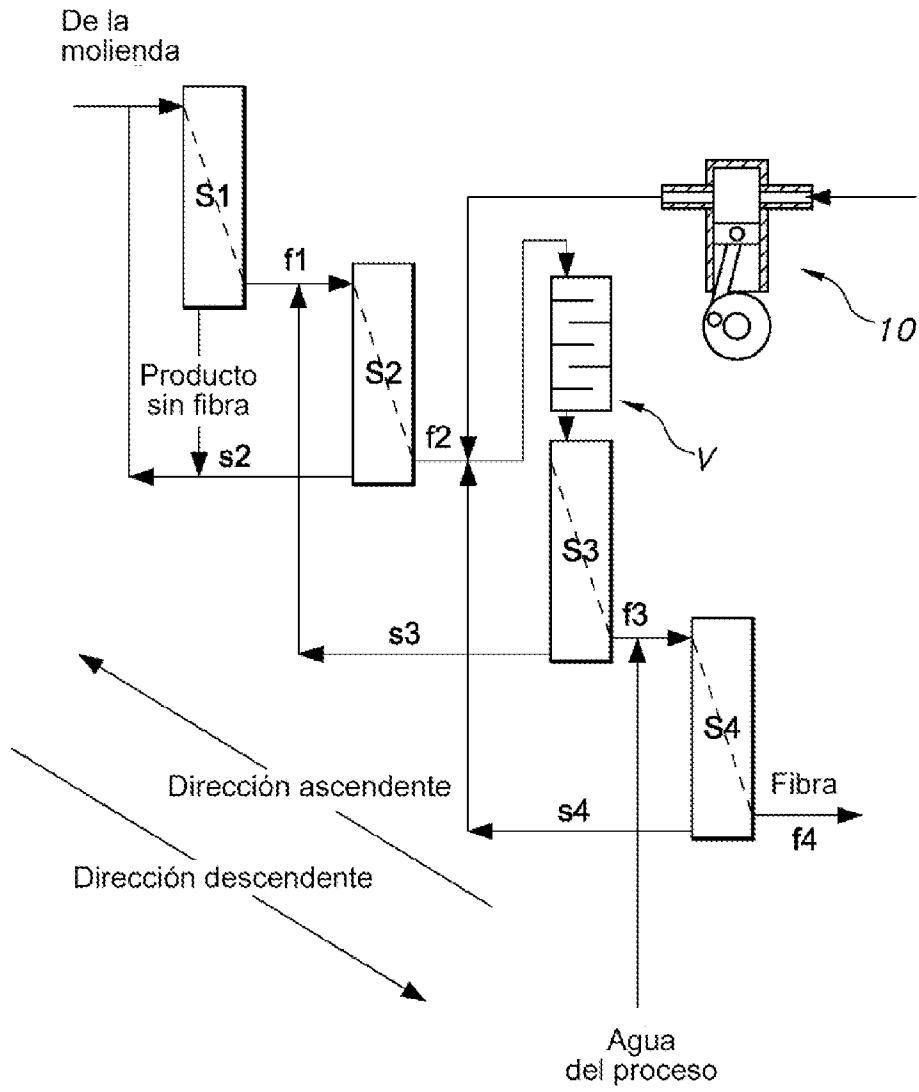
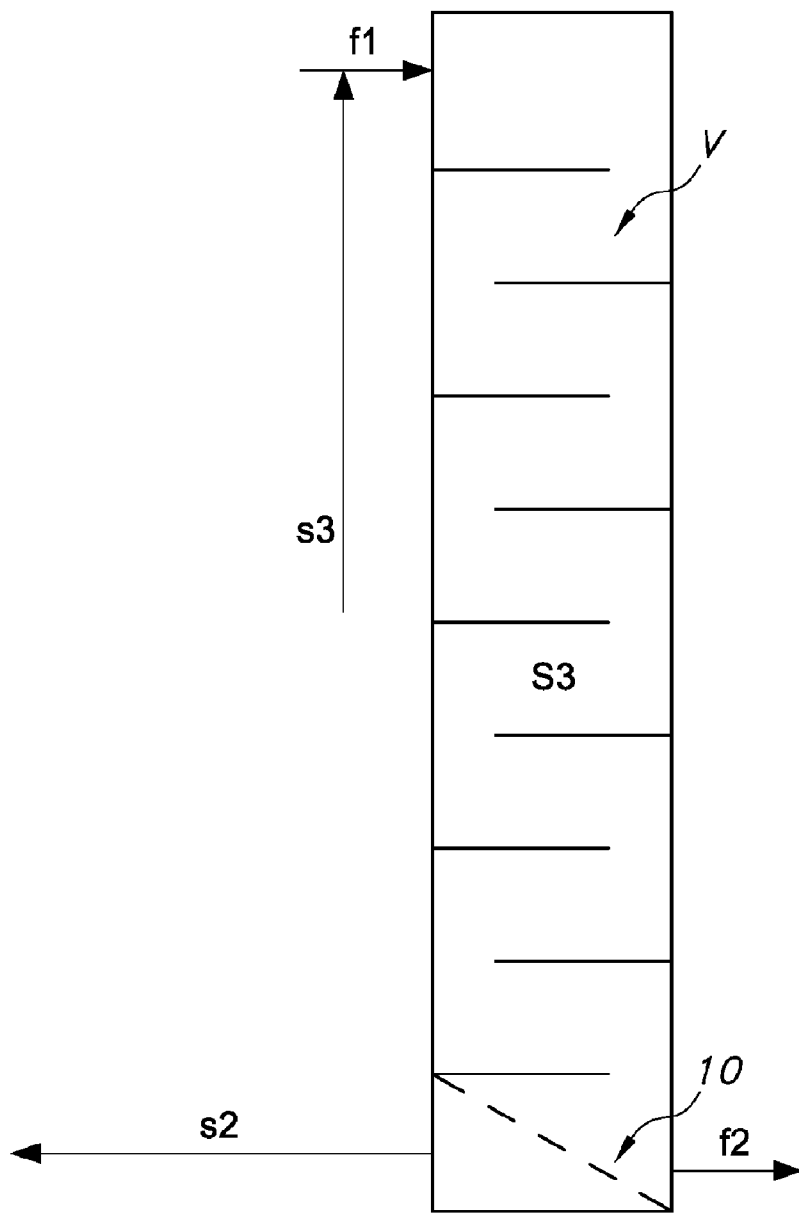


FIG. 2



**FIG. 3**

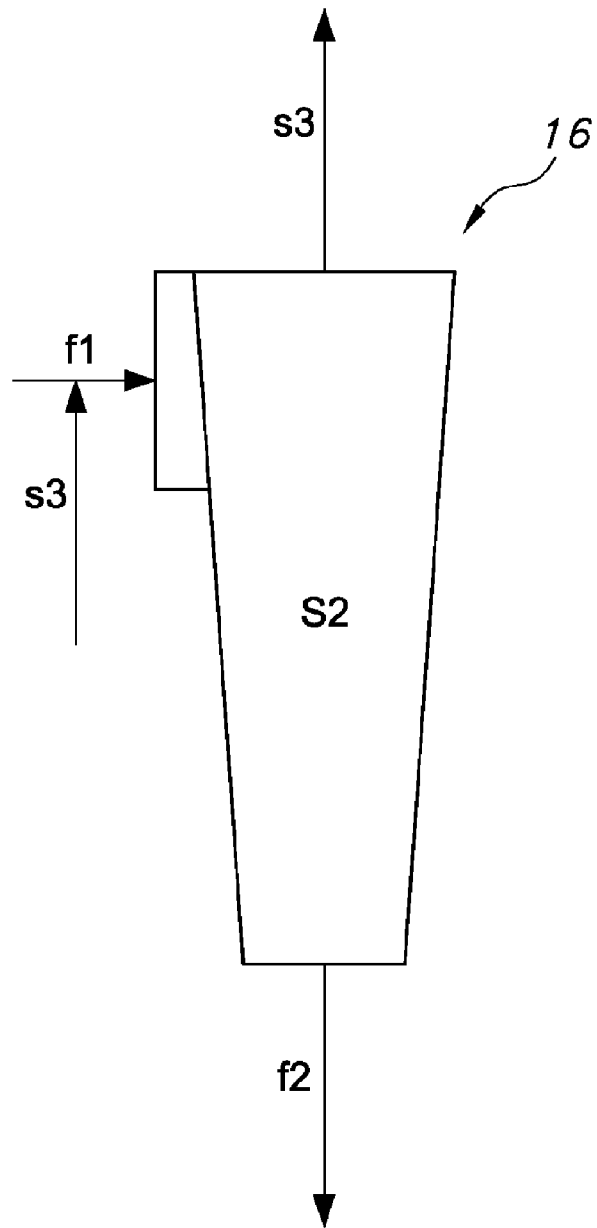


FIG. 4

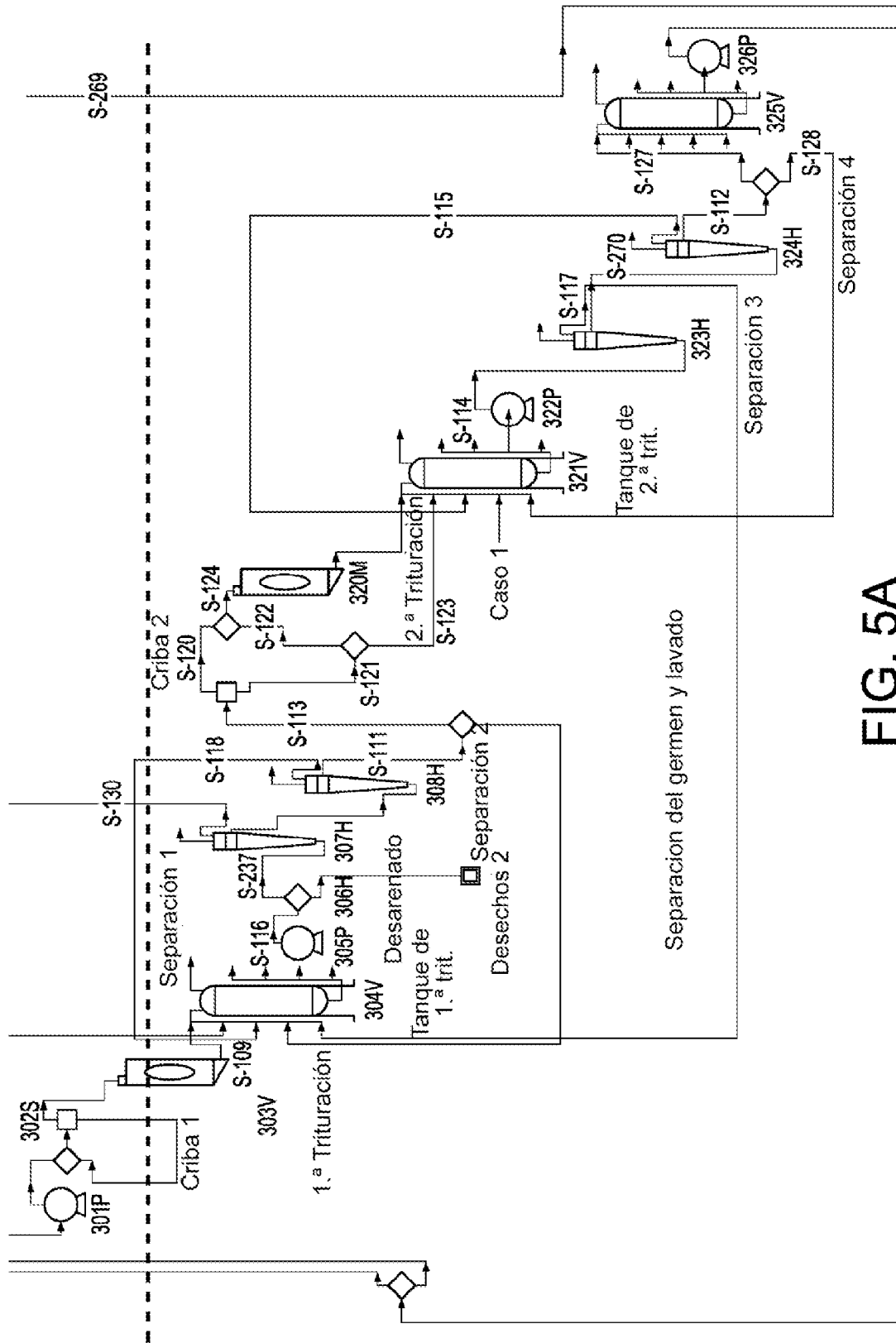


FIG. 5A

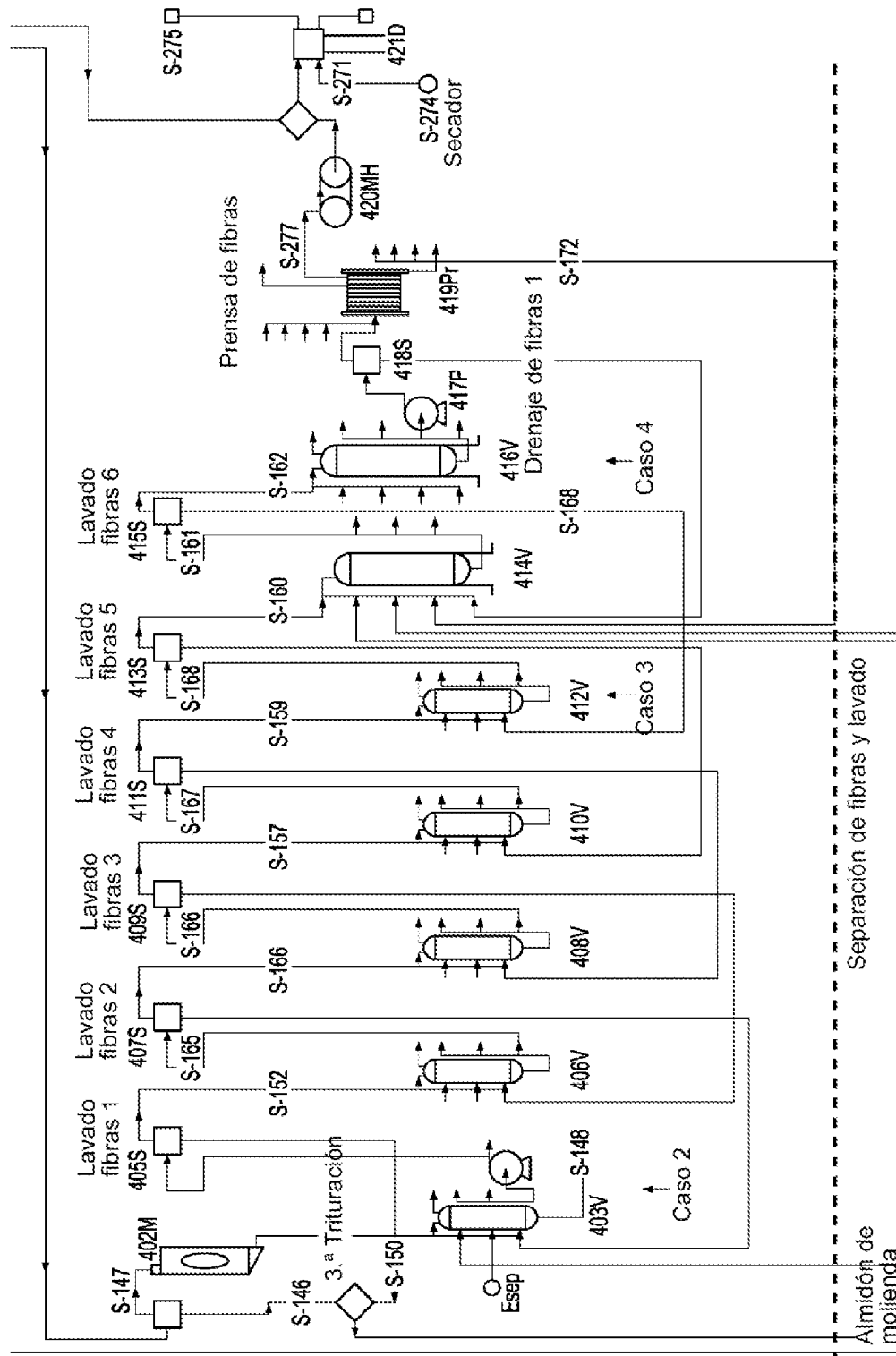


FIG. 5B

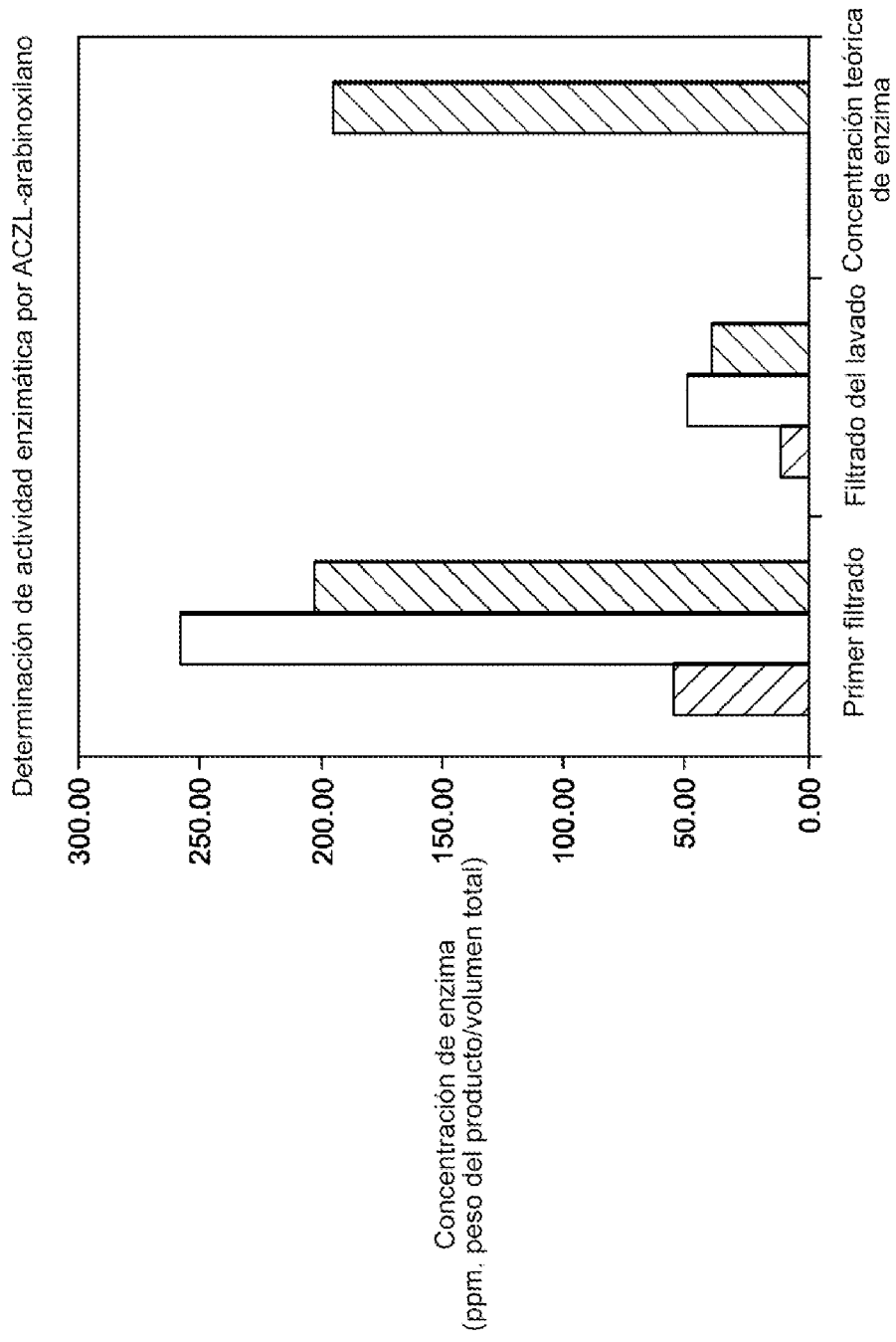


FIG. 6

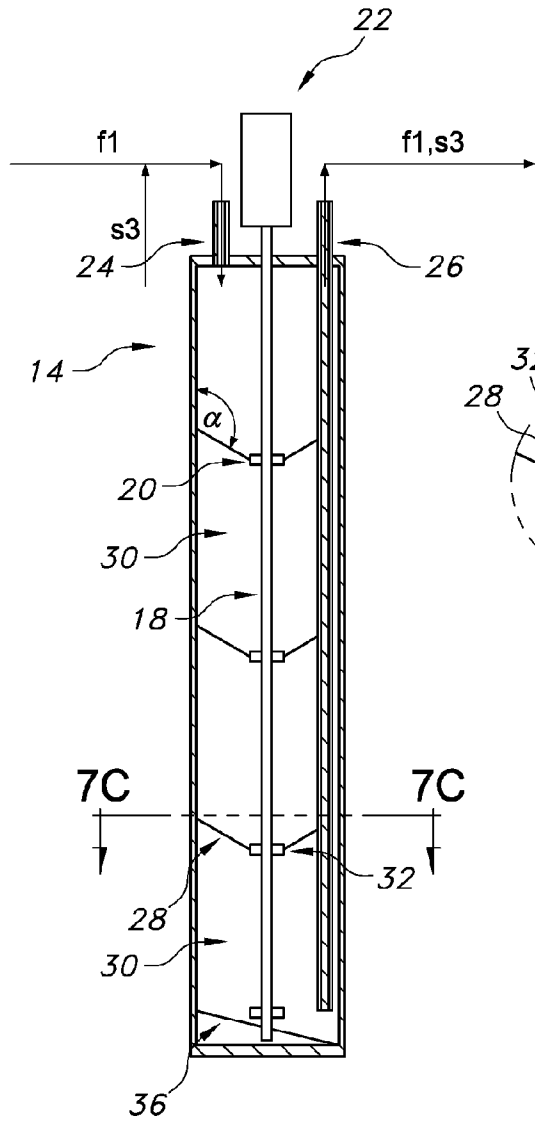


FIG. 7A

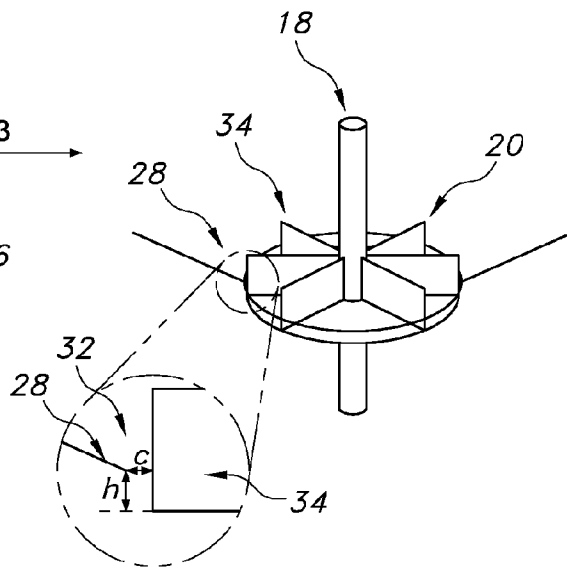


FIG. 7B

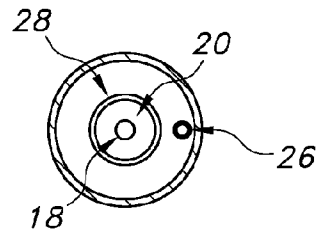


FIG. 7C

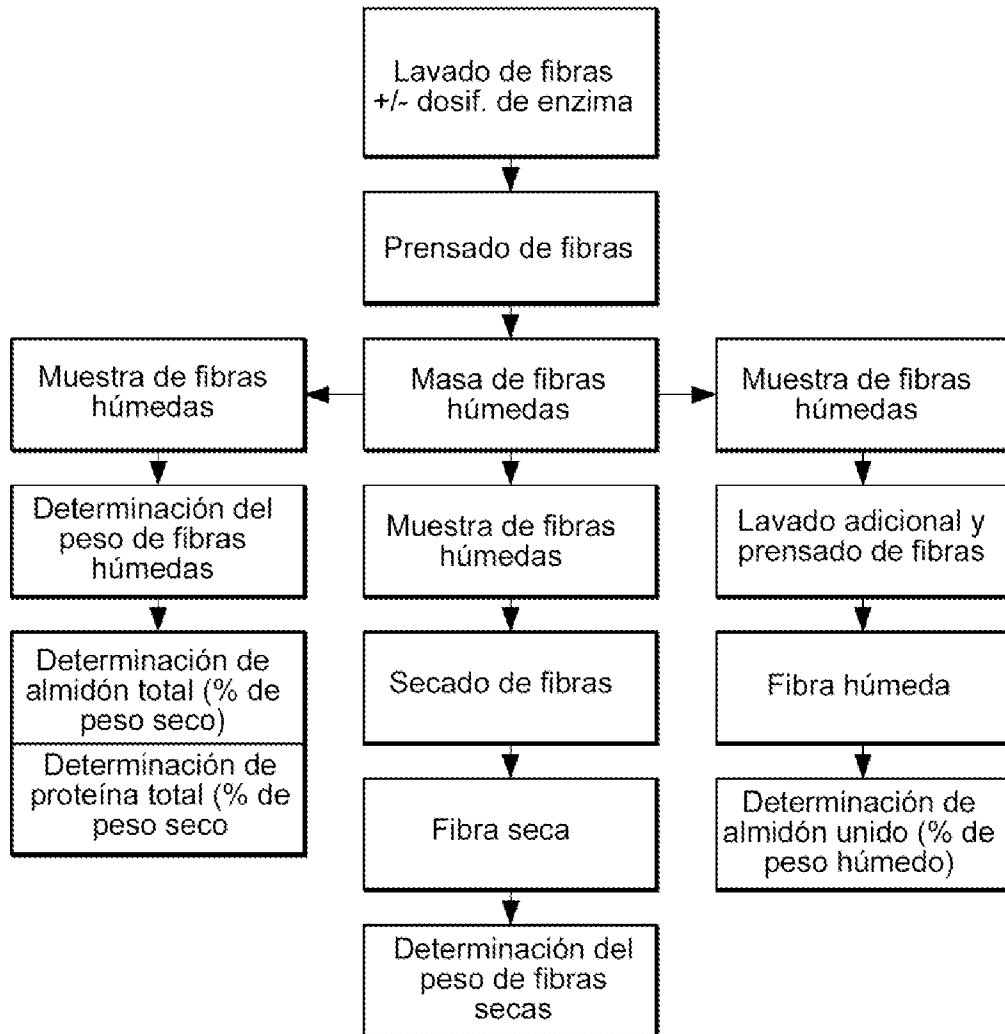


FIG. 8

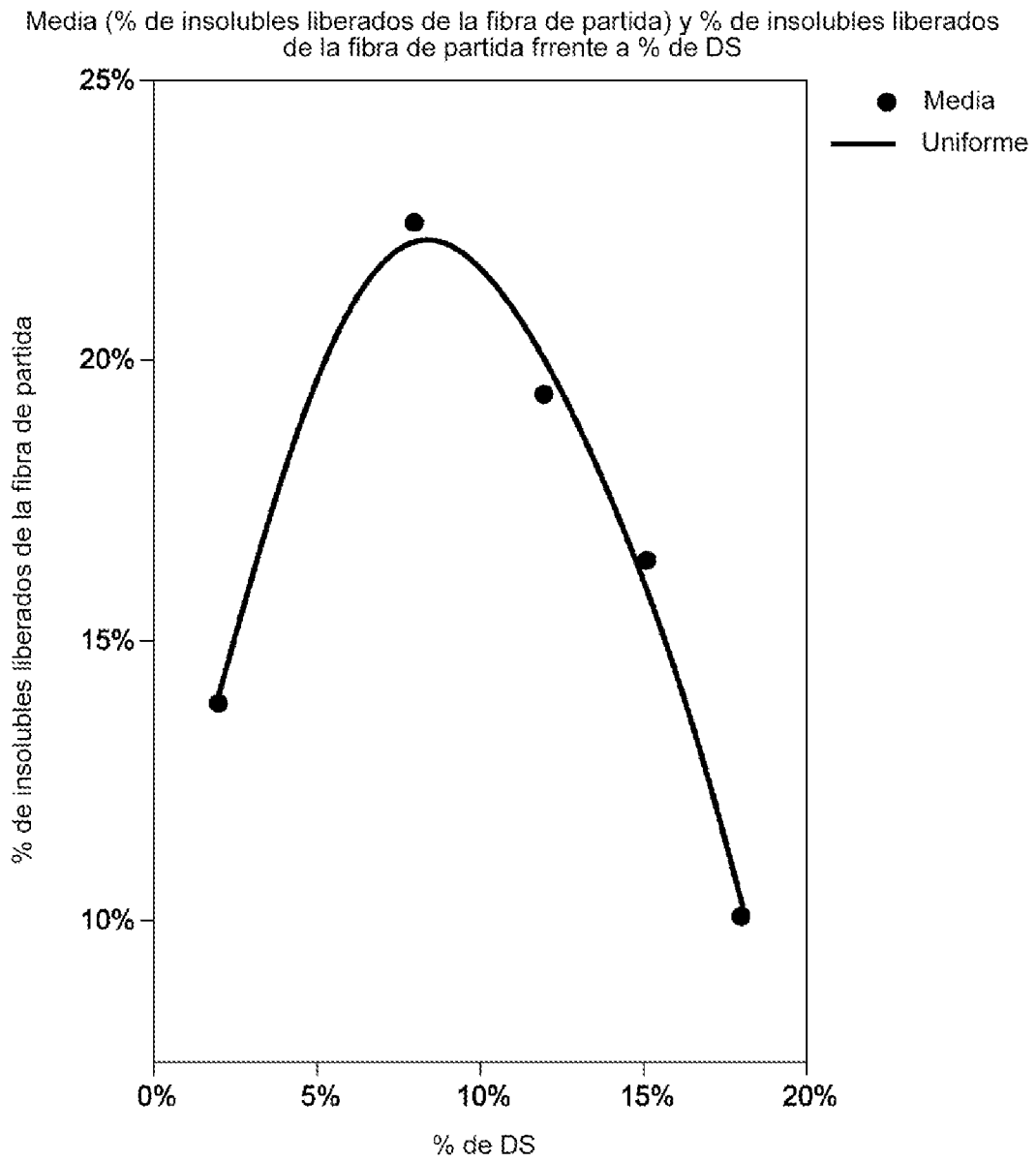


FIG. 9