

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 117**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 7/10** (2006.01)

**C12N 9/14** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08852244 .6**

96 Fecha de presentación: **19.11.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2222863**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2010**

54 Título: **Procesos de producción de productos de fermentación**

30 Prioridad:  
**19.11.2007 US 988873 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.06.2012**

73 Titular/es:  
**NOVOZYMES A/S  
KROGSHØJVEJ 36  
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:  
**SOONG, Chee-Leong;  
LIU, Jiyin y  
KANG, Zhengfang**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 383 117 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

Procesos de producción de productos de fermentación.

## 5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a procesos de fermentación de material vegetal en productos de fermentación deseados. La invención se refiere también a procesos de producción de un producto de fermentación de material de planeta usando uno o más organismos de fermentación.

10

## Estado de la técnica

[0002] Un gran número de productos comerciales que son difíciles de producir sintéticamente son producidos actualmente por organismos de fermentación. Tales productos incluyendo alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol, 1.3-propanediol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2.5-diketo-D-glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B<sub>12</sub>, beta-caroteno); y hormonas. La fermentación también se usa comúnmente en el alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino), lácteos (p. ej., en la producción de yogur y queso), cuero, e industrias del tabaco.

20

[0003] Se conocen en la técnica un gran número de procesos de producción de productos de fermentación, tal como etanol, por fermentación de azúcares proporcionada por degradación de material con contenido de almidón y/o material con contenido de lignocelulosa.

25

[0004] No obstante, la producción de productos de fermentación, tal como etanol, a partir de tales materiales vegetales sigue siendo demasiado costoso. Por lo tanto, hay una necesidad de proporcionar procesos que puedan aumentar el rendimiento del producto de fermentación y así reducir los costes de producción.

## Resumen de la invención

30

[0005] La presente invención se refiere a procesos de fermentación de material derivado de plantas en un producto de fermentación. La invención también proporciona procesos de producción de productos de fermentación a partir de material derivado de plantas usando un organismo de fermentación.

35

[0006] Según a la invención, el material de partida (es decir, el sustrato para el organismo de fermentación en cuestión) puede ser cualquier material vegetal o material derivado de plantas. El material puede ser tratado o no tratado. El material de partida puede ser material con contenido de almidón. El material de almidón puede ser material con contenido de lignocelulosa.

40

[0007] En el primer aspecto la invención se refiere a procesos de fermentación de material vegetal en un medio de fermentación en un producto de fermentación tal y como se define en la reivindicación 1. Según la invención el nivel de concentración/dosis de pirofosfatasa(s) es(son) aumentado en comparación con cuando no se añade pirofosfatasa antes y/o durante la fermentación.

45

[0008] En el segundo aspecto la invención se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación a partir de material con contenido de almidón comprendiendo los pasos de:

1. i) licuefacción de material con contenido de almidón;
2. ii) sacarificación del material licuado; y
3. iii) fermentación con uno o más organismos de fermentación conforme al proceso de fermentación de la invención .

50

[0009] En el tercer aspecto la invención se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación a partir de material con contenido de almidón, comprendiendo los pasos de:

55

- (a) sacarificación de material con contenido de almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material con contenido de almidón; y
- (b) fermentación usando un organismo de fermentación; donde la fermentación se realiza conforme a un proceso de fermentación de la invención.

60

[0010] En el cuarto aspecto la invención se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación de material

con contenido de lignocelulosa, comprendiendo los pasos de:

- (a) pretratamiento del material con contenido de lignocelulosa;
- (b) hidrolizado del material;
- (c) fermentado usando un organismo de fermentación conforme a un proceso de fermentación de la invención.

Breve descripción de las figuras

[0011]

- Figura 1a. Efecto de la pirofosfatasa en glucosa residual después de 48 horas de fermentación de hidrolizados PCS.
- Figura 1b. Efecto de la pirofosfatasa en xilosa residual después de 48 horas de fermentación de hidrolizados PCS.
- Figura 2. Efecto de la pirofosfatasa en la producción de etanol después de 48 horas de fermentación de hidrolizados PCS.
- Figura 3. Efecto de la pirofosfatasa de levadura de panadería, con o sin magnesio o ión de metal de manganeso en el rendimiento de etanol en un proceso SSF.
- Figura 4. Efecto de la pirofosfatasa de *Bacillus*, con o sin magnesio o ión de metal de manganeso en el rendimiento de etanol en un proceso SSF.
- Figura 5. Efecto de la pirofosfatasa *E. coli* en el rendimiento de etanol en un proceso SSF.
- Figura 6. Efecto de la pirofosfatasa de tabaco en el rendimiento de etanol en un proceso SSF.

Descripción detallada de la invención

[0012] La presente invención se refiere a procesos de fermentación de material vegetal en un producto de fermentación deseado. La invención proporciona además procesos para producir productos de fermentación deseados a partir de material vegetal usando un organismo de fermentación.

[0013] La levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) experimenta inhibición de crecimiento celular, pérdida de viabilidad celular, pérdida de absorción de nutrientes, flujos de protones disminuidos a través de la membrana citoplásmica, y rendimiento de fermentación perjudicado cuando la concentración de etanol aumenta durante la fermentación de etanol. El etanol se acumula primero en el entorno intracelular y es liberado más tarde en el medio de fermentación. Como resultado, la concentración de etanol experimentada por las enzimas citosólicas puede ser superior que la concentración en el medio de fermentación y por lo tanto potencialmente estresante para las células de levadura. Estudios previos han mostrado que la pirofosfatasa de citosol es inhibida por etanol durante la fermentación de la levadura, lo que en consecuencia impacta en el crecimiento de la levadura y su maquinaria metabólica (Lopes, D. H. J. "Urea increases tolerance of yeast inorganic pyrophosphatase activity to ethanol: The other side of urea interaction with proteins" (2001) Arch. Biochem. Biophys. (394) 61-66; Peres-Castineira, J. R, "Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant. H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatases (2002) PNAS (99) 15914-15919).

[0014] Los inventores han descubierto que niveles aumentados de pirofosfatasa, en comparación con cuando no se añade pirofosfatasa al medio de fermentación, da como resultado un rendimiento de fermentación aumentado y un rendimiento de fermentación posteriormente aumentado.

[0015] Se cree que niveles aumentados de pirofosfatasa en el medio de fermentación mantienen la viabilidad de la levadura; dan sustento a la funcionalidad metabólica; y dan como resultado menos estrés inflingido por el etanol. Otros factores, incluyendo pérdida de absorción de nutrientes reducida también pueden ser logrados.

[0016] Consecuentemente, en el primer aspecto, la invención se refiere a procesos de fermentación de material de planeta en un medio de fermentación en un producto de fermentación tal y como se define en la reivindicación 1. La enzima(s) de pirofosfatasa puede ser adicionada/introducida antes y/o durante la fermentación y/o puede ser producida *in situ* por, por ejemplo, sobreexpresión por los organismos de fermentación, preferiblemente levadura. La pirofosfatasa también puede ser introducida en el medio de fermentación en forma de material vegetal transgénico o pirofosfatasa de expresión.

#### Medio de fermentación

[0017] La frase "medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al entorno en el que se realiza la fermentación y comprende el sustrato de fermentación, que es la fuente de carbohidrato que es metabolizada por el organismo(s) de fermentación, y puede incluir el organismo(s) de fermentación.

[0018] El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el organismo(s) de

fermentación. Los nutrientes y estimuladores de crecimiento se usan mucho en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; vitaminas y minerales, o combinaciones de las mismas.

[0019] Después de la fermentación, los medios de fermentación o medio de fermentación pueden comprender además el producto de fermentación.

#### Organismo de fermentación

[0020] La frase "organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para producir un producto de fermentación deseado. El organismo de fermentación pueden ser organismos de fermentación C6 o C5, o una combinación de los mismos. Ambos, los organismos de fermentación C6 y C5 se conocen bien en la técnica.

[0021] Los organismos de fermentación adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares fermentables, tales como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa y o arabinosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

[0022] Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas del género *Saccharomyces*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis* tal como *Pichia stipitis* CBS 5773 o *Pichia pastoris*; una cepa del género *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, o *Candida boidinii*. Otros organismos de fermentación incluyen cepas de *Hansenula*, en particular *Hansenula polymorpha* o *Hansenula anomala*; *Kluyveromices*, en particular *Kluyveromices fragilis* o *Kluyveromices marxianus*; y *Schizosaccharomices*, en particular *Schizosaccharomices pombe*.

[0023] Organismos bacterianos de fermentación preferidos incluyen cepas de *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*, cepas de *Zimomonas*, en particular *Zimomonas mobilis*, cepas de *Zimobacter*, en particular *Zimobacter palmae*, cepas de *Klebsiella* en particular *Klebsiella oxitoca*, cepas de *Leuconostoc*, en particular *Leuconostoc mesenteroides*, cepas de *Clostridium*, en particular *Clostridium butyricum*, cepas de *Enterobacter*, en particular *Enterobacter aerogenes* y cepas de *Thermoanaerobacter*, en particular *Thermoanaerobacter* BG1L1 (Appl. Microbiol, Biotech. 77: 61-86) y *Thermoanaerobacter etanolicus*, *Thermoanaerobacter termosaccharoliticum*, o *Thermoanaerobacter matranii*. También se prevén cepas de *Lactobacillus* como son las cepas de *Corynebacterium glutamicum R*, *Bacillus termoglucosidasis*, y *Geobacillus termoglucosidasis*.

[0024] En una forma de realización el organismo de fermentación es un organismo de fermentación de azúcar C6, tal como una cepa de, p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*.

[0025] En relación con la fermentación de materiales derivados de lignocelulosa, se contemplan organismos de fermentación de azúcar C5. Muchos organismos de fermentación de azúcar C5 también fermentan azúcares C6. Ejemplos de organismos de fermentación de azúcar C5 incluyen cepas de *Pichia*, tales como de la especie *Pichia stipitis*. También se conocen bacterias de fermentación de azúcar C5. También algunas cepas de *Saccharomices cerevisiae* fermentan azúcares C5 (y C6). Ejemplos son cepas genéticamente modificadas de *Saccharomices spp.* que son capaces de fermentar azúcares C5 incluyen a las que se hace referencia en, p. ej., Ho y colaboradores, 1998, *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1852-1859 y Karhumaa y colaboradores., 2006, *Microbial Cell Factories* 5:18, y Kuyper y colaboradores, 2005, *FEMS Yeast Research* 5: 925-934.

[0026] En una forma de realización el organismo de fermentación se añade al medio de fermentación de modo que el organismo de fermentación viable, tal como levadura, contado por mL de medio de fermentación está en el intervalo de  $10^5$  a  $10^{12}$ , preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{10}$ , especialmente aproximadamente  $5 \times 10^7$ .

[0027] La levadura disponible comercialmente incluye, p.ej., RED STAR™ y Levadura ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EEUU), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, EEUU), SUPERSTART y levadura fresca THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EEUU), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EEUU), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia), y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

[0028] El organismo de fermentación capaz de producir un producto de fermentación deseado a partir de azúcares fermentables, tales como, p. ej., glucosa, maltosa de fructosa, xilosa y/o arabinosa, se cultiva preferiblemente en condiciones precisas con un índice de crecimiento particular. Cuando el organismo de fermentación es introducido en/adicionado al medio de fermentación, el organismo de fermentación inoculado pasa por un número de fases. Inicialmente el crecimiento no ocurre. A este periodo se hace referencia como "fase lag" y se puede considerar un periodo de adaptación.

Durante la siguiente fase a la que se hace referencia como la "fase exponencial", el índice de crecimiento aumenta gradualmente. Después de un periodo de crecimiento máximo, el índice cesa y el organismo de fermentación entra en "fase estacionaria". Después de otro periodo de tiempo, el organismo de fermentación entra en la "fase de muerte" en la que el número de células viables desciende.

5

[0029] En una forma de realización, la pirofosfatasa(s) es(son) añadida al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase de lag.

10

[0030] En una forma de realización, la pirofosfatasa(s) es añadida al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase exponencial.

[0031] En una forma de realización, la pirofosfatasa(s) es(son) añadida al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase estacionaria.

15

#### Iones metálicos

20

[0032] Según la invención uno o más iones metálicos. Según son agregados antes y/o durante la fermentación. Los iones metálicos se pueden adicionar simultáneamente con o separadamente de la adición de la enzima(s) de pirofosfatasa. Los iones metálicos, tales como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , puede tener un efecto de refuerzo en la actividad de enzima(s) de pirofosfatasa. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las cantidades adecuadas a añadir. En una forma de realización, iones metálicos, tales como  $Mg^{2+}$ , se añaden en una cantidad en el intervalo de por encima de cero a 10 mM. En una forma de realización preferida los iones metálicos son  $Mn^{2+}$ .

25

#### Productos de fermentación

30

[0033] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación usando un organismo de fermentación. Los productos de fermentación contemplados incluyen alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej.,  $H_2$  y  $CO_2$ ); antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina,  $B_{12}$ , beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida el producto de fermentación es etanol, p. ej., etanol de combustible; etanol potable, es decir, licores potables neutros; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino), industria de lácteos (p. ej., productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos comprenden ales, de malta, porters, largers, amargas, licores de malta, happoushu, cerveza de alto grado alcohólico, cerveza de bajo grado alcohólico, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación de alcohol. El producto de fermentación, tal como etanol, obtenido según la invención, puede ser usado preferiblemente como combustible. No obstante, en el caso del etanol, éste también puede ser usado como etanol potable.

40

#### Fermentación

[0034] La fermentación se puede llevar a cabo en condiciones convencionalmente usadas. Los procesos de fermentación preferidos son procesos anaeróbicos.

45

[0035] Por ejemplo, para la producción de etanol la fermentación puede seguir en una forma de realización durante 6 a 120 horas, en particular 24 a 96 horas. En una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura entre 25°C y 40°C, preferiblemente 28°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, y en particular alrededor de 32° C. En una forma de realización el pH al iniciar la fermentación está en el intervalo de pH 3 a 6 (para fermentaciones basadas en material derivado de lignocelulosa o material derivado de almidón), preferiblemente alrededor de pH 4 a 5 (para fermentaciones basadas en material derivado de almidón).

50

[0036] Se contempla la hidrólisis/sacarificación y fermentación simultánea, lo que significa que la enzima(s) de hidrólisis/sacarificación, el organismo de fermentación y la enzima(s) de pirofosfatasa se pueden añadir juntas. No obstante, debe entenderse que, p. ej., la enzima(s) de pirofosfatasa también puede ser adicionada separadamente. Cuando la fermentación se realiza simultáneamente con la hidrólisis/sacarificación la temperatura está preferiblemente entre de 25°C a 40°C, preferiblemente de 28°C a 35°C, tal como de 30°C a 34°C, en particular alrededor de 32°C, cuando el organismo de fermentación es una levadura, tal como una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, y el producto de fermentación deseado es etanol.

60

[0037] Otros productos de fermentación se pueden fermentar en condiciones y temperaturas bien conocidos por el experto en la técnica, adecuadas para el organismo de fermentación en cuestión.

[0038] El proceso se puede realizar como un proceso en lote o continuo. El proceso de fermentación se puede conducir en un sistema de ultrafiltración en el que el retenido se mantiene en recirculación en presencia de sólidos, agua, y el organismo de fermentación, y en el que el permeado es el producto de fermentación deseado con contenido de líquido. También se contempla si el proceso se conduce en un reactor de membrana continua con membranas de ultrafiltración y en el que el retenido se mantiene en recirculación en presencia de sólidos, agua, el organismo de fermentación, y en el que el permeado es el producto de fermentación con contenido de líquido.

[0039] Después de la fermentación el organismo de fermentación puede ser separado del lodo fermentado y reciclado al medio de fermentación.

#### Recuperación

[0040] Después de la fermentación, el producto de fermentación puede ser separado del medio de fermentación. El lodo se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado puede ser extraído del medio de fermentación por técnicas de micro filtración o filtración de membrana. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por desorción. Métodos para la recuperación se conocen bien en la técnica.

#### **Producción de productos de fermentación de material con contenido de almidón**

##### Procesos para producir productos de fermentación de material gelatinizado con contenido de almidón

[0041] En este aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material con contenido de almidón, este proceso incluye un paso de licuefacción y pasos de sacarificación y fermentación realizados consecutivamente o simultáneamente.

[0042] La invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material con contenido de almidón comprendiendo los pasos de:

1. i) licuefacción de material con contenido de almidón;
2. ii) sacarificado del material licuado,
3. iii) fermentación usando uno o más organismos de fermentación, donde la fermentación se realiza conforme a un proceso de fermentación de la invención, es decir, según la reivindicación 1.

[0043] El paso de sacarificación ii) y el paso de fermentación iii) se pueden llevar a cabo bien consecutivamente o simultáneamente. La enzima(s) de pirofosfatasa puede ser adicionada antes (p. ej., durante el paso de licuefacción i) o por separado, paso de sacarificación separada ii)) y/o durante el paso de fermentación iii) o paso de sacarificación y de fermentación simultáneo.

[0044] El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, puede ser recuperado opcionalmente después de la fermentación, p. ej., por destilación. Materias primas adecuadas con contenido de almidón se recogen en la sección "materiales con contenido de almidón" que aparece más abajo. Enzimas contempladas se recogen en la sección "enzimas" que aparece más abajo. La licuefacción se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana o alfa-amilasa ácida fúngica. El organismo de fermentación es preferiblemente levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Organismos de fermentación adecuados se recogen en la sección "organismos de fermentación" que aparece más arriba.

[0045] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes del paso (i), los pasos de:

- x) reducir el tamaño de partícula del material con contenido de almidón, preferiblemente por molidura;
- y) formar un lodo comprendiendo el material con contenido de almidón y agua.

[0046] El lodo acuoso puede contener de 10-55 % en peso de sólidos secos (SS), preferiblemente de 25-45 % en peso de sólidos secos (SS), más preferiblemente de 30-40 % de sólidos secos (SS) de material con contenido de almidón. El lodo se calienta a por encima de la temperatura de gelatinización y alfa-amilasa, preferiblemente alfa-amilasa bacteriana y/o ácida fúngica se puede adicionar para iniciar licuefacción (fluidificación). El lodo en una forma de realización puede ser cocido por chorro para gelatinizar además el lodo antes de ser sometido a una alfa-amilasa en la fase (i) de la invención.

[0047] La licuefacción se puede llevar a cabo como un proceso de lodo caliente de tres pasos. El lodo se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se añade alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (fluidificación). Entonces, el lodo se puede cocer por chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante aproximadamente 1-15

minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos. El lodo se enfría a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente con pH 4.5-6.5, en particular con un pH de 5 a 6.

5 [0048] El paso de sacarificación (ii) se puede llevar a cabo usando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, no obstante, es común hacer sólo una presacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguido de sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo (proceso SSF). La sacarificación se lleva a cabo típicamente a temperaturas de 20-75°C, preferiblemente de 40-70°C, típicamente alrededor de 60°C, y con un pH entre 4 y 5, normalmente aproximadamente con pH 4.5.

15 [0049] El proceso más ampliamente usado en el producto de fermentación, especialmente en la producción de etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación (SSF) simultánea, en el que no hay fase de retención para la sacarificación, significando que el organismo de fermentación, tal como levadura, y enzima(s), incluyendo enzima(s) de pirofosfatasa, se pueden añadir juntos. El SSF puede llevarse a cabo típicamente a una temperatura de 25°C a 40°C, tal como de 28°C a 35°C, tal como de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de 32°C. La temperatura se puede ajustar arriba o abajo durante la fermentación.

20 [0050] El paso de fermentación (iii) incluye, sin limitación, procesos de fermentación de la invención, usados para producir productos de fermentación como se ha ejemplificado arriba en la sección "productos de fermentación".

Procesos para producir productos de fermentación de material no gelatinizado con contenido de almidón

25 [0051] En este aspecto, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material con contenido de almidón sin gelatinización (al que frecuentemente se hace referencia como "sin cocer" ) del material con contenido de almidón. Según la invención, el producto de fermentación deseado, tal como etanol, puede ser producido sin licuefacción del lodo acuoso con el material con contenido de almidón. En una forma de realización, un proceso incluye la sacarificación de (p. ej.; molido) material con contenido de almidón, p. ej., almidón granulado, por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, preferiblemente en presencia de alfa-amilasa y/o enzima(s) generadora de fuente de carbohidrato para producir azúcares que se pueden fermentar en el producto de fermentación deseado por un organismo de fermentación adecuado.

35 [0052] En esta forma de realización, el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol, se produce a partir de granos de cereal no gelatinizados (es decir.; crudos), preferiblemente molidos, tales como maíz.

[0053] Por consiguiente, en este aspecto, la invención se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material con contenido de almidón, comprendiendo los pasos de:

- 40 (a) sacarificación de material con contenido de almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material con contenido de almidón;  
(b) fermentación usando un organismo de fermentación;

45 en el que la fermentación se realiza conforme a un proceso de fermentación de la invención, es decir, según la reivindicación 1.

[0054] En una forma de realización preferida, los pasos (a) y (b) se llevan a cabo simultáneamente (es decir, fermentación de un paso) o consecutivamente.

50 [0055] El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, puede ser recuperado opcionalmente después de la fermentación, p. ej., por destilación. Materias primas adecuadas con contenido de almidón se recogen en la sección "materiales con contenido de almidón" de la sección que aparece más abajo. Las enzimas contempladas se recogen en la sección "enzimas" que aparece más abajo. Típicamente la amilasa(s), tal como glucoamilasa(s) y/u otras enzimas generadoras de fuente de carbohidrato y/o alfa-amilasa(s), está (están) presentes durante la fermentación.

55 [0056] Ejemplos de glucoamilasas y otras enzimas generadoras de fuentes de carbohidrato se pueden encontrar más abajo e incluyen glucoamilasas de hidrolizado de almidón crudas.

[0057] Ejemplos de alfa-amilasa(s) incluyen alfa-amilasas ácidas, preferiblemente alfa-amilasas ácidas fúngicas.

60 [0058] Ejemplos de organismos de fermentación incluyen levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros organismos de fermentación adecuados se recogen en la sección "organismos de fermentación" que aparece anteriormente.

5 [0059] El término "temperatura inicial de gelatinización" significa la temperatura mínima a la que comienza la gelatinización del almidón. En general, el almidón calentado en agua comienza a gelatinizarse entre aproximadamente 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y puede determinarse fácilmente por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según las especies de planta, la variedad particular de las especies de planta al igual que a las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención la temperatura inicial de gelatinización de un material con contenido de almidón dado se puede determinar como la temperatura a la que se pierde la birrefringencia en 5% de los gránulos de almidón usando el método descrito por Gorinstein y Lii, 1992, *Starch/Stärke*, Vol. 44 (12): 461-466.

10 [0060] Antes del paso (a) se puede preparar un lodo de material con contenido de almidón, tal como almidón granulado, con 10-55 % en peso de sólidos secos (SS), preferiblemente 25-45 % en peso de sólidos secos, más preferiblemente 30-40% de sólidos secos de material con contenido de almidón. El lodo puede incluir agua y/o aguas de proceso, tales como vinaza (posos), agua de depuración, condensado o destilado por evaporador, agua decapante de destilación, o agua de proceso de otras plantas de fermentación de producto. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización inicial y así no tiene lugar ningún aumento de viscosidad significativo, se pueden usar niveles de vinaza altos si se desea. En una forma de realización el lodo acuoso contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70% de vol., preferiblemente 15-60 % de vol., especialmente de aproximadamente 30 a 50 % de vol., de agua y/o aguas de proceso, tales como vinaza (posos), agua de depuración, condensado o destilado por evaporador, agua de decapante de lado de destilación, agua decapante de destilación, o agua de proceso de otras plantas de fermentación de producto, o combinaciones de las mismas, o similares.

15 [0061] El material con contenido de almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molido seco o húmedo, de 0.05 a 3.0 mm, preferiblemente 0.1-0.5 mm. Después de ser sometido a un proceso de la invención al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o preferiblemente al menos 99% de los sólidos secos en el material con contenido de almidón se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

20 [0062] Un proceso de la invención se conduce a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, que significa que la temperatura a la que se lleva a cabo el paso (a) se encuentra típicamente en el intervalo entre 30-75°C, preferiblemente entre 45-60°C.

25 [0063] En una forma de realización preferida, los pasos (a) y (b) se llevan a cabo como una sacarificación y proceso de fermentación simultáneos. En tal forma de realización preferida, el proceso se lleva a cabo típicamente a una temperatura de 25°C a 40°C, tal como de 28°C a 35°C, tal como de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de 32°C.

30 [0064] En una forma de realización la fermentación se realiza de modo que el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se mantiene a un nivel bajo, tal como por debajo de 6 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 3 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 2 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 1 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0.5 % en peso, o por debajo de 0.25 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0.1 % en peso. Unos niveles tan bajos de azúcar pueden lograrse utilizando simplemente cantidades ajustadas de enzima y organismo de fermentación. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué dosis/cantidades de enzima y organismo de fermentación usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo de fermentación también pueden ser seleccionadas para mantener concentraciones bajas de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa puede mantenerse por debajo de aproximadamente 0.5 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0.2 % en peso.

35 [0065] El proceso de la invención se puede llevar a cabo con un pH de aproximadamente 3 y 7, preferiblemente de pH 3.5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

#### 40 Materiales con contenido de almidón

45 [0066] Se puede utilizar cualquier materia prima con contenido de almidón adecuada, incluyendo almidón granulado (almidón crudo no cocido), según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente en base al producto de fermentación deseado. Ejemplos de materias primas con contenido de almidón, adecuadas para uso en un proceso de la presente invención, incluye tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, granos de arroz, alubias, o patatas dulces, o mezclas de los mismos, o cereales. También se contemplan tipos de maíz y cebada cerosos y no cerosos.

[0067] El término "almidón granulado" significa almidón crudo no cocido, es decir, almidón en su forma natural como se encuentra en el cereal, tubérculos o granos. El almidón se forma en las células vegetales como gránulos ínfimos insolubles en agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50°C a 75°C el hinchamiento puede ser reversible. No obstante, con temperaturas más altas se inicia un hinchamiento irreversible llamado "gelatinización". El almidón granulado a ser procesado puede ser de una calidad de almidón altamente refinado, preferiblemente de al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99.5% de pureza o éste puede ser un material más crudo con contenido de almidón comprendiendo granos enteros (p. ej.; molidos) incluyendo fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras. La materia cruda, tal como granos enteros, se puede reducir en tamaño de partícula, p. ej., por molturación, para abrir la estructura y permitir el tratamiento posterior. Se prefieren dos procesos, molturación húmeda y en seco. En la molturación en seco se muelen y usan granos enteros. La molturación húmeda da una buena separación de germen y harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica frecuentemente en lugares donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de, p. ej., jarabes. Ambas, molturación en seco y húmeda se conocen bien en la técnica del procesamiento de almidón y se contemplan igualmente para un proceso de la invención. En una forma de realización, el tamaño de partícula se reduce a entre 0.05 a 3.0 mm, preferiblemente 0.1-0.5 mm, o de modo que al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, incluso más preferiblemente al menos el 90% de material con contenido de almidón pase a través de una criba con una criba de 0.05 a 3.0 mm, preferiblemente una criba de 0.1-0.5 mm.

### **Producción de productos de fermentación a partir de material con contenido de lignocelulosa**

[0068] En este aspecto, la invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación a partir material con contenido de lignocelulosa. La conversión de material con contenido de lignocelulosa en productos de fermentación, tal como etanol, tiene las ventajas de la disponibilidad al alcance de grandes cantidades de materia prima, incluyendo madera, residuos agrícolas, brotes herbáceos, desperdicios sólidos municipales, etc. Los materiales con contenido de lignocelulosa consisten típicamente principalmente en celulosa, hemicelulosa, y lignina, y se hace referencia a ellos frecuentemente como "biomasa".

[0069] La estructura de la lignocelulosa no es directamente accesible a hidrólisis enzimática. Por lo tanto, el material con contenido de lignocelulosa tiene que ser pretratado, p. ej., por hidrólisis ácida en condiciones adecuadas de presión y temperatura, para romper el sello de lignina y disgregar la estructura cristalina de la celulosa. Esto causa la solubilización de la hemicelulosa y fracciones de celulosa. La celulosa y hemicelulosas pueden ser entonces hidrolizadas enzimáticamente, p. ej., por enzimas celulolíticas, para convertir los polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables que se pueden fermentar en productos de fermentación deseados, tal como etanol. Opcionalmente el producto de fermentación puede ser recuperado, p. ej., por destilación.

[0070] En este aspecto, la invención se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación de material con contenido de lignocelulosa, comprendiendo los pasos de:

- (a) pretratamiento del material con contenido de lignocelulosa;
- (b) hidrolizado del material;
- (c) fermentación con un organismo de fermentación conforme a un proceso de fermentación de la invención, es decir, según la reivindicación 1.

[0071] La pirofosfatasa(s) puede ser adicionada antes y/o durante la fermentación. El paso de hidrólisis (b) y el paso de fermentación (c) se pueden llevar a cabo consecutivamente o simultáneamente. En formas de realización preferidas los pasos se llevan a cabo como pasos de procesos SSF, HHF, o SHF que se describirán más detalladamente por debajo.

### **Pretratamiento**

[0072] El material con contenido de lignocelulosa se trata previamente antes de ser hidrolizado y fermentado. En una forma de realización preferida, el material pretratado es hidrolizado, preferiblemente enzimáticamente, antes y/o durante la fermentación. El objetivo del pretratamiento es separar y/o liberar celulosa, hemicelulosa y/o lignina, y de esta manera mejorar el índice de hidrólisis enzimática.

[0073] El paso de pretratamiento (a) puede ser un paso de pretratamiento convencional conocido en la técnica. El pretratamiento puede ocurrir en lodo acuoso. El material con contenido de lignocelulosa puede estar presente durante el pretratamiento en una cantidad entre 10-80 % en peso, preferiblemente entre 20-50 % en peso.

Pretratamiento químico, mecánico y/o biológico

[0074] El material con contenido de lignocelulosa puede ser químicamente, mecánicamente y/o biológicamente pretratado

antes de la hidrólisis y/o fermentación. El tratamiento mecánico (frecuentemente se hace referencia a él como pretratamiento físico) puede ser utilizado solo o en combinación con hidrólisis posterior o simultánea, especialmente hidrólisis enzimática, para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

5 [0075] Preferiblemente, el pretratamiento químico, mecánico y/o biológico se realiza antes de la hidrólisis y/o fermentación. Alternativamente, el pretratamiento químico, mecánico y/o biológico se realiza simultáneamente con la hidrólisis, así como simultáneamente con adición de una o más enzimas celulolíticas, u otras actividades enzimáticas mencionadas en lo sucesivo, para liberar azúcares fermentables, tales como glucosa y/o maltosa.

10 [0076] El material con contenido de lignocelulosa pretratado puede ser lavado y/o destoxificado antes o después del paso de hidrólisis (b). Esto puede mejorar la fermentabilidad de, p. ej., material con contenido de lignocelulosa de ácido diluido, tal como tallo de maíz. La detoxificación se puede llevar a cabo de cualquier forma adecuada, p. ej., por extracción de vapor, evaporación, intercambio iónico, tratamiento de resina o carbón de la fracción líquida o lavado del material pretratado.

15 Pretratamiento químico

[0077] "Pretratamiento químico" se refiere a cualquier tratamiento químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina. Ejemplos de pasos de pretratamiento químico adecuados incluyen tratamiento con; por ejemplo, ácido diluido, cal, solvente alcalino orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono. Además, la oxidación húmeda y la hidrotermólisis de pH controlado son también pretratamientos químicos contemplados.

[0078] Preferiblemente, el pretratamiento químico es tratamiento ácido, más preferiblemente, un tratamiento continuo de ácido diluido y/o suave, tal como, tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, o mezclas de los mismos. También pueden usarse otros ácidos. Tratamiento de ácido suave significa que el pH del tratamiento se encuentra en el intervalo de 1-5, preferiblemente de pH 1-3. En una forma de realización específica, la concentración de ácido está en el intervalo de 0.1 a 2.0 % en peso, preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido puede ser mezclado o contactado según la invención con el material a ser fermentado, y la mezcla se puede mantener a una temperatura en el intervalo de 160-220°C, tal como 165-195°C, para períodos que varían de minutos a segundos, p. ej., 1-60 minutos, tal como 2-30 minutos o 3-12 minutos. La adición de ácidos fuertes, tal como ácido sulfúrico, se puede aplicar para eliminar hemicelulosa. Esto realza la digestibilidad de la celulosa.

[0079] El tratamiento de solvente de celulosa, también contemplado, ha demostrado convertir aproximadamente el 90% de celulosa en glucosa. También ha sido demostrado que la hidrólisis enzimática podría mejorarse en gran medida cuando la estructura lignocelulósica es interrumpida. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alcalino, ozono, organosolv (usa ácidos de Lewis, FeCl<sub>2</sub>, (Al)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, fenol, o etilenglicol están entre los solventes conocidos que disgregan la estructura de celulosa y promueven la hidrólisis (Mosier y colaboradores, 2005, *Bioresource Technology* 96: 673-686).

[0080] El pretratamiento alcalino químico con base, p. ej., NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y/o amoníaco o similar, también está dentro del campo de la presente divulgación. Los métodos de pretratamiento que usan amoníaco se describen en, p. ej., los documentos WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900. WO 2006/110901.

[0081] Las técnicas de oxidación húmeda implican el uso de agentes oxidantes tales como: agentes oxidantes basados en sulfito o similares. Ejemplos de pretratamientos de solvente incluyen tratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido) o similar. El pretratamiento químico se lleva a cabo generalmente durante 1 a 60 minutos, tal como de 5 a 30 minutos, pero puede realizarse en períodos más cortos o más largos de tiempo dependiendo del material a ser pretratado.

[0082] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados son descritos por Schell y colaboradores., 2003, *Appl. Biochem and Biotechn.* Vol. 105-108, p. 69-85, y Mosier y colaboradores, 2005. *Bioresource Technology* 96: 673-686, y la publicación estadounidense nº. 2002/0164730.

50 Pretratamiento mecánico

[0083] Como se usa en el contexto de la presente divulgación el término "pretratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento mecánico o físico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina de material con contenido de lignocelulosa. Por ejemplo, el pretratamiento mecánico incluye varios tipos de molturación, irradiación, explosión humeante/de vapor, e hidrotermólisis.

[0084] El pretratamiento mecánico incluye conminución (reducción mecánica del tamaño de partícula). La conminución incluye molturación en seco, molturación húmeda y molturación de bola vibratoria. El pretratamiento mecánico puede implicar presión alta y/o temperatura alta (explosión por vapor). Presión alta significa presión en el intervalo de 300 a 600 psi, preferiblemente 400 a 500 psi, tal como alrededor de 450 psi. Temperaturas altas significa temperaturas en el intervalo

de aproximadamente 100 a 300°C, preferiblemente de aproximadamente 140 a 235°C. En una forma de realización preferida el pretratamiento mecánico es un proceso de lote, sistema hidrolizador de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura tal como se ha definido anteriormente. Se puede utilizar para esto un hidrolizador Sunds (disponible de Sunds Defibrator AB (Suecia).

5

Pretratamiento químico y mecánico combinado

[0085] En una forma de realización, ambos pretratamientos, químico y mecánico se llevan a cabo implicando, por ejemplo, ambos, pretratamiento de ácido diluido o suave y tratamiento de temperatura y presión alta. El pretratamiento químico y mecánico se puede llevar a cabo consecutivamente o simultáneamente, como se desee.

10

[0086] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el material con contenido de lignocelulosa está sujeto a ambos, pretratamiento químico y mecánico para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

15

[0087] En una forma de realización preferida, el pretratamiento se realiza como un paso de pretratamiento de ácido diluido o suave. En otra forma de realización preferida, el pretratamiento se realiza como un paso de explosión de fibra de amoníaco (o paso de pretratamiento AFEX).

Pretratamiento biológico

20

[0088] Como se usa en la presente divulgación el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material con contenido de lignocelulosa. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación de microorganismos de solubilización de lignina (véase, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, *Pretreatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212 ; Ghosh, P., y Singh, A., 1993, *Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass*, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333 ; McMillan, J. D., 1994, *Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15 ; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, *Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlín Heidelberg, Alemania, 65: 207-241 ; Olsson, L., y Hahn-Hagerdal, B., 1996, *Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production*, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; y Vallander, L., y Eriksson, K.-E. L., 1990, *Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art*, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

25

30

35

### Hidrólisis

[0089] Antes y/o durante la fermentación el material con contenido de lignocelulosa pretratado puede ser hidrolizado para romper el sello de lignina y disgregar la estructura cristalina de la celulosa. En una forma de realización preferida se lleva a cabo la hidrólisis enzimáticamente.

40

[0090] El material con contenido de lignocelulosa pretratado a ser fermentado puede ser hidrolizado por una o más hidrolasas (clase E.C. 3 según la nomenclatura enzimática), preferiblemente una o más carbohidrasas incluyendo enzimas celulolíticas y enzimas hemicelulolíticas, o combinaciones de las mismas. Además, también pueden estar presentes durante la hidrólisis y/o fermentación proteasa, alfa-amilasa, glucoamilasa y/o similares, ya que el material con contenido de lignocelulosa puede incluir algún, p. ej., material amiláceo y/o proteínico .

45

[0091] La enzima(s) usada para la hidrólisis puede ser capaz de convertir directa o indirectamente polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables, tal como glucosa y/o maltosa, que se pueden fermentar en un producto de fermentación deseado, tal como etanol.

50

[0092] En una forma de realización preferida la carbohidrasa(s) tiene(tienen) actividad enzimática celulolítica y/o hemicelulolítica.

[0093] En una forma de realización preferida la hidrólisis se realiza usando una preparación enzimática celulolítica comprendiendo además uno o más polipéptidos con actividad de mejora celulolítica. En una forma de realización preferida el polipéptido(s) con actividad de mejora celulolítica es(son) de origen de la familia GH61A. Ejemplos de preparaciones enzimáticas celulolíticas preferidas y adecuadas y polipéptidos con actividad de mejora celulolítica se describen más adelante en la sección "enzimas celulolíticas" y sección "polipéptidos de mejora celulolítica".

55

60

[0094] En la sección "enzimas" que aparece más adelante se describen enzimas adecuadas.

[0095] Polímeros de hemicelulosa pueden ser descompuestos por enzimas hemicelulolíticas y/o hidrólisis ácida para liberar sus componentes de azúcar de cinco y seis carbonos. Los azúcares de seis carbonos (hexosas), tales como glucosa, galactosa, arabinosa, y manosa, pueden ser fermentados fácilmente en productos de fermentación tales como etanol, acetona, butanol, glicerol, ácido cítrico, ácido fumárico, etc., mediante organismos de fermentación adecuados incluyendo levadura.

[0096] La levadura es el organismo de fermentación preferido para la fermentación de etanol. Se prefieren cepas de *Saccharomices*, especialmente cepas de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que son resistentes a niveles altos de etanol, es decir, hasta, p. ej., aproximadamente 10, 12, 15 o 20 % de vol. o más de etanol.

[0097] La hidrólisis enzimática se realiza preferiblemente en un entorno acuoso adecuado en condiciones que pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. En una forma de realización preferida, la hidrólisis se lleva a cabo en condiciones adecuadas, preferiblemente óptimas, para la enzima(s) en cuestión.

[0098] Un tiempo de proceso, temperatura y condiciones de pH adecuados pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Preferiblemente, la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura de entre 25 y 70°C, preferiblemente de entre 40 y 60°C, especialmente alrededor de 50°C. El paso se lleva a cabo preferiblemente con un pH en el intervalo de 3-8, preferiblemente pH 4-6. La hidrólisis se lleva a cabo típicamente durante entre 12 y 96 horas, preferible de 16 a 72 horas, más preferiblemente entre 24 y 48 horas.

#### **Fermentación de material derivado de lignocelulosa**

[0099] La fermentación de material derivado de lignocelulosa se realiza conforme a un proceso de fermentación de la invención como se ha descrito anteriormente.

#### Material con contenido de lignocelulosa (Biomasa)

[0100] Cualquier material con contenido de lignocelulosa adecuado se contempla en el contexto de la presente invención. El material con contenido de lignocelulosa puede ser cualquier material con contenido de lignocelulosa. En una forma de realización preferida, el material con contenido de lignocelulosa contiene al menos 50% en peso, preferiblemente al menos 70% en peso, más preferiblemente al menos 90% en peso de lignocelulosa. Debe entenderse que el material con contenido de lignocelulosa puede comprender también otros ingredientes tales como material celulósico, tal como celulosa, hemicelulosa y puede comprender también ingredientes tales como azúcares, tales como azúcares fermentables y/o azúcares no fermentables.

[0101] El material con contenido de celulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, vainas, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de árboles. El material lignocelulósico puede ser también, pero no está limitado a, material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, desperdicios sólidos municipales, residuos de papel, y pulpa y residuos de fábrica de papel. Se entiende aquí, que el material con contenido de lignocelulosa puede ser en forma de material de pared celular vegetal con contenido de lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

[0102] En una forma de realización, el material con contenido de lignocelulosa es fibra de maíz, paja de arroz, madera de pino, astillas de madera, álamo, paja de trigo, césped de pradera, bagazo, papel y residuos de tratamiento de pulpa.

[0103] Otros ejemplos más específicos incluyen tallo de maíz, mazorca de maíz, fibra de maíz, madera dura tal como álamo y abedul, madera de coníferas, paja de cereal tal como paja de trigo, césped de pradera, *Miscanthus*, cáscara de arroz, desperdicios sólidos urbanos (RSU), residuos orgánicos industriales, papel de oficina, o mezclas de los mismos.

[0104] En una forma de realización preferida el material con contenido de lignocelulosa es tallo de maíz o mazorca de maíz. En otra forma de realización preferida, el material con contenido de lignocelulosa es fibra de maíz. En otra forma de realización preferida, el material con contenido de lignocelulosa es césped de pradera. En otra forma de realización preferida, el material con contenido de lignocelulosa es bagazo.

#### SSF, HHF y SHF

[0105] En una forma de realización, la hidrólisis y fermentación se llevan a cabo como un paso simultáneo de hidrólisis y fermentación (SSF). En general, esto significa que la hidrólisis y fermentación combinadas/simultáneas se llevan a cabo en condiciones (p. ej., temperatura y/o pH) adecuadas, preferiblemente óptimas, para el organismo(s) de fermentación en cuestión.

[0106] En otra forma de realización, el paso de hidrólisis y el paso de fermentación se realizan como hidrólisis híbrida y fermentación (HHF). La HHF comienza típicamente con un paso separado de hidrólisis parcial y termina con un paso de hidrólisis simultánea y fermentación simultáneas. El paso separado de hidrólisis parcial es un paso de sacarificación enzimática de celulosa llevado a cabo típicamente en condiciones (p. ej., a temperaturas más altas) adecuadas, preferiblemente óptimas, para la enzima(s) de hidrólisis en cuestión. El paso de hidrólisis y fermentación posterior simultánea se lleva a cabo típicamente en condiciones adecuadas para el organismo(s) de fermentación (frecuentemente a temperaturas inferiores que el paso separado de hidrólisis).

[0107] En otra forma de realización, los pasos de hidrólisis y fermentación se pueden llevar a cabo también como hidrólisis y fermentación separadas, donde la hidrólisis se lleva a cabo antes del inicio de la fermentación. A esto se hace referencia frecuentemente como "SHF".

### Enzimas

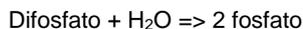
[0108] Aunque no se haya mencionado específicamente en el contexto de un proceso de la invención, debe entenderse que la enzima(s) es(son) usada en una "cantidad efectiva".

#### Enzimas pirofosfatasas

[0109] En el contexto de la presente invención, "enzima pirofosfatasa" (abreviado "PPasa") incluye enzimas dentro de las siguientes clases de EC (Comisión de Enzimas): EC 3.1.3.1 y EC 3.1.3.9, EC 3.6.1.1; EC 3.6.1.8, EC 3.6.1.9, EC 3.6.1.40. Las clases EC se basan en recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). La descripción de las clases EC puede encontrarse en Internet, por ejemplo, en [www.expasy.org/enzyme/](http://www.expasy.org/enzyme/).

[0110] En una forma de realización preferida la enzima pirofosfatasa es una pirofosfatasa inorgánica (EC.3.6.1.1) a la que también se hace referencia como difosfato fosfohidrolasa y pirofosfato fosfohidrolasa.

[0111] La pirofosfatasa inorgánica cataliza la siguiente reacción



[0112] La especificidad puede variar con la fuente y con el ión de metal de activación y la enzima de tales fuentes puede ser idéntica con EC 3.1.3.1 o EC 3.1.3.9.

[0113] Las PPasas inorgánicas juegan un papel importante en el metabolismo energético, proporcionando una tracción termodinámica para reacciones de biosíntesis tales como síntesis de proteínas, ARN y ADN (Lahti y colaboradores, "Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *E. coli* K-12", 1988, J. Bacteriol. 170: 5901-5907). Según Peller, "On the free energy changes in the synthesis and degradation of nucleic acids, 1976, Biochemistry 15: 141-146, las síntesis de ácido nucleico serían energéticamente imposibles *in vivo* si no se acoplasen a la hidrólisis de pirofosfato (PPi), catalizada por pirofosfatasa. Además, la pirofosfatasa es importante en la regulación de la síntesis y crecimiento macromolecular y el proceso de glucólisis de reacción de fosfofructoquinasa dependiente de PPi. Además, la hidrólisis de PPi se acopla al transporte de iones de hidrógeno a través de una membrana, mejorando esto el bombeo de iones.

[0114] Según la invención, cualquier enzima pirofosfatasa (PPasa) puede estar presente y/o ser añadida durante un proceso de fermentación de la invención.

[0115] La enzima(s) pirofosfatasa está (están) presente y/o añadida según la invención en una cantidad efectiva, de modo que la enzima(s) proporciona(n) una mejora, por ejemplo, rendimientos de fermentación más altos, en comparación con un proceso correspondiente llevado a cabo sin estar presente/ser añadida una enzima pirofosfatasa.

[0116] Un gran número de enzimas pirofosfatasas son conocidas en la técnica y pueden encontrarse, p. ej., en Internet (ver [www.expasy.org/enzyme/](http://www.expasy.org/enzyme/)).

[0117] En una forma de realización preferida, la enzima pirofosfatasa es de origen microbiano, tal como bacteriana o fúngica, tal como de origen de levadura o fúngico filamentoso. En otra forma de realización la enzima pirofosfatasa es de origen mamífero o vegetal. En una forma de realización, la pirofosfatasa es ácida, lo que significa que tiene un pH óptimo por debajo de pH 7.

[0118] Ejemplos de enzimas pirofosfatasas incluyen aquellas derivadas de bacterias, tales como una cepa del género *Bacillus*, tal como una cepa de *Bacillus stearothermophilus*; o una cepa del género *Thermoplasma*, tal como una cepa de *Thermoplasma acidophilum*; o una cepa del género *Thermus*, tal como una cepa de *Thermus thermophilus*; o una cepa de

*Escherichia*, tal como una cepa de *Escherichia coli*; o de un hongo filamentoso, tal como cepa del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus niger*; o de levadura, tal como una cepa del género *Saccharomyces*, tal como una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 [0119] En otra forma de realización, la pirofosfatasa es derivada de la planta del tabaco.

[0120] La enzima(s) pirofosfatasa es(son) adicionada en cantidades eficaces, lo que significa que la enzima(s) pirofosfatasa está(están) presente y/o añadida al medio de fermentación en concentraciones en el intervalo de 0,1 a 1,000 unidades/g de sólidos secos (SS), preferiblemente de 1 a 100 unidades/g de sólidos secos (SS) cuando se usa el ensayo PPasa para levadura, o en el intervalo de 0.001 a 5 unidades/g de sólidos secos (SS), preferiblemente de 0.01 a 1.5 unidades/g de sólidos secos (SS) cuando se usa el ensayo PPasa para bacterias. Ambos ensayos PPasa son descritos en la sección "materiales y métodos" que aparece más abajo.

15 [0121] Los productos de pirofosfatasa disponibles comercialmente incluyen aquellos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus stearothermophilus*, *E. Coli* y tabaco disponibles de Sigma-Aldrich.

#### Alfa-amilasa

20 [0122] Puede utilizarse cualquier alfa-amilasa. Las alfa-amilasas preferidas son microbianas, tales como de origen fúngico o bacteriano. Qué alfa-amilasa es la más adecuada depende de las condiciones del proceso, pero puede ser determinado fácilmente por un experto en la técnica.

25 [0123] En una forma de realización, la alfa-amilasa preferida es una alfa-amilasa ácida, p. ej., alfa-amilasa de ácido fúngico o alfa-amilasa de ácido bacteriano. La frase "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene actividad óptima a un pH en el intervalo de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

#### Alfa-amilasa bacteriana

30 [0124] Una alfa-amilasa bacteriana es preferiblemente derivada del género *Bacillus*.

[0125] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus stearothermophilus*, pero también puede estar derivada de otras subespecies de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID n°: 4 en el documento WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la SEC ID n°: 5 en el documento WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEC ID n°: 3 en el documento WO 99/19467. En una forma de realización, la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, incluso más preferido al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% con cualquiera de las secuencias mostradas en las SEC ID n°: 1, 2 o 3, respectivamente, del documento WO 99/19467.

45 [0126] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de los documentos WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente son descritas en las patentes estadounidenses n° 6,093,562, 6,297,038 o 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG alfa-amilasa) con una eliminación de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una eliminación doble descrita en el documento WO 1996/023873 - ver p. ej., página 20, líneas 1-10 preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácido de BSG alfa-amilasa tipo salvaje expuesto en la SEC ID n°:3 descritas en el documento WO 99/19467 o eliminación de aminoácidos R179 y G180 usando la SEC ID n°:3 del documento WO 99/19467 para la numeración. Incluso más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una doble supresión correspondiente a delta(181-182) y comprenden además una sustitución de N193F (también denominada I181\* + G182\* + N193F) comparada con la secuencia de aminoácido de alfa-amilasa BGS tipo salvaje descrita en la SEC ID n°:3 divulgada en el documento WO 99/19467.

#### 55 Alfa-amilasa híbrida bacteriana

[0127] Una alfa-amilasa híbrida contemplada específicamente comprende 445 residuos C-terminales de aminoácidos de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEC ID n°:4 del documento WO 99/19467) y los 37 residuos N-terminales de aminoácido de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en la SEC ID n°:5 del documento WO 99/19467) con uno o más, especialmente todas, de la siguiente sustitución:

[0128] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (usando la numeración de *Bacillus licheniformis* de la SEC ID n.º: 4 del documento WO 99/19467). También se prefieren variantes con una o más de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras columnas de alfa-amilasa *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o supresión de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente supresión de E178 y G179 (usando la SEC ID n.º: 5 del documento WO 99/19467).

[0129] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se dosifica en una cantidad de 0.0005-5 KNU por g DS, preferiblemente 0.001-1 KNU por g DS, tal como alrededor de 0.050 KNU por g DS.

#### 10 Alfa-amilasa fúngica

[0130] Las alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tal como, alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus kawachii*.

15 [0131] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que se deriva de una cepa de *Aspergillus oryzae*. El término "alfa-amilasa de tipo fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una alta identidad, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácido mostrada en la SEC ID n.º: 10 en el documento 96/23874.

20 [0132] Otra alfa-amilasa de ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa de ácido es una de *Aspergillus niger* divulgada como "AMYA\_ASPNG" en la Swiss-prot/TeEMBL database bajo el número de acceso primario P56271 y descrito en el documento WO 89/01969 (ejemplo 3).

25 [0133] Una alfa-amilasa de ácida fúngica disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

30 [0134] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas, incluyen aquellas derivadas de una cepa de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus* preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (documento WO 2004/055178 ) o *Meripilus giganteus*.

35 [0135] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y es descrita por Kaneko y colaboradores., 1996, J. Ferment. Bioeng. 81:292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii* "; y además como EMBL:#AB008370.

[0136] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje comprendiendo un dominio de unión al almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir.; no híbrido), o un variante de ellos. En una forma de realización, la alfa-amilasa de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

#### 40 Alfa-amilasa híbrida fúngica

[0137] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen aquellas descritas en el documento WO 2005/003311 o en la publicación de patente estadounidense n.º. 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente estadounidense n.º. 60/638.614 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (DC) y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a almidón, y opcionalmente un enlazador.

50 [0138] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la tabla 1 a 5 de los ejemplos en la solicitud de patente estadounidense n.º. 60/638,614, incluyendo la variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y *Athelia rolfsii* SBD (SEC ID n.º:100 en el documento US 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG de *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID n.º.:101 en el documento US 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD (que se describe en la tabla 5 como una combinación de secuencias de aminoácidos SEC ID n.º.: 20, SEC ID n.º.: 72 y SEC ID n.º.: 96 en la solicitud estadounidense n.º. 11/316,535) o como V039 en la tabla 5 en el documento WO 2006/069290, y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador *Athelia rolfsii* de glucoamilasa y SBD (SEC ID n.º.:102 en el documento estadounidense 60/638,614). Otras alfa-amilasas híbridas específicamente contempladas son cualquiera de las recogidas en las tablas 3, 4, 5, y 6 del ejemplo 4 en la solicitud estadounidense n.º.: 11/316,535 y el documento WO 2006/069290.

60 [0139] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la publicación de patente estadounidense n.º.: 2005/0054071, incluyendo aquellas descritas en la tabla 3 en la página 15, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón,

[0140] También se contemplan alfa-amilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las alfa-amilasas mencionadas anteriormente, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzima maduras.

[0141] Unas alfa-amilasas ácidas se pueden añadir en una cantidad de 0.001 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente de 0.01 a 5 AFAU/g DS, especialmente 0.3 a 2 AFAU/g DS o 0.001 a 1 FAU-F/g DS, preferiblemente 0.01 a 1 FAU-F/g DS.

#### Productos comerciales de alfa-amilasa

[0142] Composiciones comerciales preferidas comprendiendo alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X, LIQUOZYME™ SC y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED. SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa ácida fúngica vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

#### **Enzima generadora de fuente de carbohidrato**

[0143] El término "enzima generadora de fuente de carbohidrato" incluye glucoamilasa (siendo generadores de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (siendo generadores de maltosa) y también pululanasa y alfa-glucosidasa. Una enzima generadora de fuente de carbohidrato es capaz de producir un carbohidrato que puede ser usado como una fuente de energía por el organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como etanol. El carbohidrato generado puede ser convertido directamente o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención, puede ser usada una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidrato. Mezclas especialmente contempladas son mezclas de al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, incluso más preferido una alfa-amilasa ácida fúngica. La proporción entre la actividad de alfa-amilasa ácida fúngica (FAU- F) y la actividad de glucoamilasa (AGU) (es decir, FAU-F por AGU) puede estar entre 0.1 y 100 AGU/FAU-F, en particular entre 2 y 50 AGU/FAU-F, tal como en el intervalo de 10-40 AGU/FAU-F.

#### **Glucoamilasa**

[0144] Una glucoamilasa usada según la invención puede estar derivada de cualquier fuente adecuada, p. ej., derivada de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico, seleccionadas del grupo consistente en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 o G2 (Boel y colaboradores, 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102 ), o variantes de las mismas, tal como aquellas descritas en el documento WO 92/00381. Los documentos WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en el documento WO 84/02921, glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (1991, Agric. Biol. Chem. 55(4): 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen y colaboradores. (1996), Prot. Eng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen y colaboradores., 1995, Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen y colaboradores, 1994, Biochem. J. 301: 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe y colaboradores, 1996, Biochemistry, 35: 8698-8704; e introducción de pro residuos en la posición A435 y S436 (Li et al., 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204.

[0145] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominado *Corticium rolfsii*) (ver patente estadounidense n.º. 4,727,026 y Nagasaka y colaboradores, 1998, "Purification and properties of the raw starch degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*", Appl Microbiol Biotechnol. 50:323-330). Glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (documento WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente estadounidense Re. 32,153). *Talaromyces duponti*. *Talaromyces thermophilus* (patente estadounidense n.º. 4,587,215).

[0146] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (documento EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (documento WO 86/01831) y *Trametes cingulata*, *Pachytsytospora papyracea*; y *Leucopaxillus giganteus*, todos descritos en el documento WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* descrita en el documento PCT/US2007/066618; o una mezcla de los mismos. También se contemplan glucoamilasas híbridas. Ejemplos de glucoamilasas híbridas descritas en el documento WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen las glucoamilasas híbridas descritas en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1.

[0147] También se contemplan glucoamilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas mencionadas anteriormente, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzimas maduras mencionadas anteriormente.

[0148] Composiciones disponibles comercialmente comprendiendo glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

5

[0149] En una forma de realización las glucoamilasas pueden ser añadidas en una forma de realización en una cantidad de 0.0001-20 AGU/g DS, preferiblemente 0.001-10 AGU/g DS, especialmente entre 0.01-5 AGU/g DS, tal como 0.1-2 AGU/g DS.

#### 10 Beta-amilasa

[0150] Una beta-amilasa (E.C 3.2.1.2) es el nombre que se da tradicionalmente a amilasas maltogénicas que exo actúan, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados. Unidades de maltosa son sucesivamente eliminadas de las extremidades de cadena no-reducidas en una manera gradual hasta que la molécula es degradada o, en el caso de amilopectina, hasta que se alcanza un punto de ramificación. La maltosa liberada tiene la configuración beta anomérica, por lo tanto el nombre beta-amilasa.

15

[0151] Las beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty y C.T. Kelly, 1979, *Progress in Industrial Microbiology*, 15: 112-115. Estas beta-amilasas se caracterizan por tener temperaturas óptimas en el intervalo de 40°C a 65°C y pH óptimo en el intervalo de 4.5 a 7. Una beta-amilasa comercialmente disponible de barley es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S. Dinamarca, y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EEUU.

20

#### Amilasa maltogénica

[0152] La amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de Cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está disponible comercialmente de Novozymes A/S, alfa-amilasas maltogénicas son descritas en las patentes estadounidenses nº. 4,598,048, 4,604,355 y 6,152,628.

25

[0153] La amilasa maltogénica se puede añadir en una forma de realización preferida en una cantidad de 0.05-5 mg proteína/gramo total DS o 0.05- 5 MANU/g DS.

30

#### **Actividad celulolítica**

[0154] El término "actividad celulolítica" como se utiliza en este caso se entiende como comprendiendo enzimas con actividad celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), p. ej., celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II, así como actividad de endoglucanasa (EC 3.2.1.4) y actividad de beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21).

35

[0155] Son importantes al menos tres categorías de enzimas para convertir celulosa en azúcares fermentables: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que cortan al azar las cadenas de celulosa; celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) que disocian unidades de celobiosil de las extremidades de la cadena de celulosa y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) que convierten la celobiosa y celodextrinas solubles en glucosa. Entre estas tres categorías de enzimas implicadas en la biodegradación de la celulosa, las celobiohidrolasas parecen ser las enzimas clave para degradar celulosa cristalina nativa.

40

[0156] La actividad celulolítica puede, en una forma de realización preferida, estar en forma de una preparación de enzimas de origen fúngico, tal como de una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

45

[0157] En la forma de realización preferida la preparación enzimática celulolítica contiene una o más de las siguientes actividades: celulasa, hemicelulasa, actividad de mejora de enzima celulolítica, actividad de beta-glucosidasa, endoglucanasa, celobiohidrolasa, o isomerasa de xilosa.

50

[0158] Comprendiendo en una forma de realización preferida, la preparación de enzima celulolítica un polipéptido con actividad de mejora celulolítica, preferiblemente un polipéptido de la familia GH61A, preferiblemente el descrito en el documento WO 2005/074656 (Novozymes). La preparación de enzima celulolítica puede comprender además una beta-glucosidasa, tal como una beta-glucosidasa derivada de una cepa del género *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*, incluyendo la proteína de fusión con actividad de beta-glucosidasa descrita en la solicitud copendiente WO 2008/057637 (Novozymes). En una forma de realización preferida, la preparación de enzima celulolítica puede comprender también una enzima de CBH II, preferiblemente *Thielavia terrestris* celobiohidrolasa II (CEL6A). En otra forma de realización preferida, la preparación de enzima celulolítica puede comprender también enzimas celulolíticas, preferiblemente una derivada de

55

60

*Trichoderma reesei* o *Humicola insolens*.

[0159] En una forma de realización preferida, la preparación de enzima celulolítica puede comprender también un polipéptido con actividad de mejora celulolítica (GH61A) descrita en el documento WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en el documento WO 2008/057637) y enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*.

[0160] En una forma de realización, la composición de enzima celulolítica es el producto disponible comercialmente CELLUCLAST™ 1.5L, CELLUZYME™ (de Novozymes A/S, Dinamarca) o ACCELERASE™ 1000 (de Genencor Inc. EEUU).

[0161] Se puede añadir una enzima celulolítica para hidrolizar el material con contenido de lignocelulosa pretratado. La enzima celulolítica se puede dosificar en el intervalo de 0.1-100 FPU por gramo de sólidos totales (ST), preferiblemente 0.5-50 FPU por gramo ST, especialmente 1-20 FPU por gramo ST. En otra forma de realización, al menos 0.1 mg de enzima celulolítica por sólidos totales por gramo (ST), preferiblemente al menos 3 mg de enzima celulolítica por gramo de ST, tal como entre 5 y 10 mg de enzima(s) celulolítica por gramo de ST es(son) usado para la hidrólisis.

#### Endoglucanasa (EG)

[0162] El término "endoglucanasa" significa una endo-1,4-(1,3,1,4)-beta-D-glucano-4-glucanohidrolasa (E.C. nº. 3,2,1,4), que cataliza endo-hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados de celulosa (tales como carboximetilcelulosa y celulosa de hidroxietilo), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mezclados, tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal con componentes celulósicos.

La actividad de endoglucanasa puede ser determinada usando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987 Pure and Appl. Chem. 59: 257-268.

[0163] En una forma de realización preferida, las endoglucanasas se pueden derivar de una cepa del género *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

#### Celobiohidrolasa (CBH)

[0164] El término "celobiohidrolasa" se refiere a una celobiohidrolasa 1,4-beta-D-glucan (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 3,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier glucosa enlazada beta-1,4 con polímero, liberando celobiosa de los extremos que se reducen o no de la cadena.

[0165] Ejemplos de celobiohidrolasas han sido mencionados anteriormente incluyendo CBH I y CBH II de *Trichoderma reesei*, *Humicola insolens* y CBH II de *Thielavia terrestris* celobiohidrolasa (CELL6A).

[0166] La actividad de celobiohidrolasa se puede determinar según los procedimientos descritos por Lever y colaboradores, 1972, Anal. Biochem, 47: 273-279 y por van Tilbeurgh y colaboradores, 1982, FEBS Letters 149: 152-156; van Tilbeurgh y Claeysens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288. El método de Lever y colaboradores es adecuado para la hidrólisis de celulosa en los tallos de maíz y el método de van Tilbeurgh y colaboradores es adecuado para determinar la actividad de la celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente.

#### Beta-glucosidasa

[0167] Durante la hidrólisis pueden estar presentes una o más beta-glucosidasas.

[0168] El término "beta-glucosidasa" se refiere a una glucohidrolasa de beta-d-glucósido (E.C. 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos terminales no reducidos de beta-D-glucosa con la liberación de beta-D-glucosa. Para los fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi y colaboradores, 2002, J. Basic Microbiol. 42, 55-66, excepto si se emplean condiciones diferentes como se describe en este caso. Una unidad de actividad de beta-glucosidasa se define como 1,0  $\mu$ mole de p-nitrofenol producido por minuto a 50°C, pH 5 de 4 mM de p-nitrofenilo-beta-D-glucopiranosida como sustrato en 100 mM de citrato sódico, 0.01% de TWEEN® 20.

[0169] En una forma de realización preferida, la beta-glucosidasa es de origen fúngico, tal como una cepa de género *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Penicillium*. En una forma de realización preferida, la beta-glucosidasa es un derivado de *Trichoderma reesei*, tal como la beta-glucosidasa codificada por el gen bgl1 (ver fig. 1 de EP 562003). En otra forma de realización preferida, la beta-glucosidasa se deriva de *Aspergillus oryzae* (producida de forma recombinante en *Aspergillus oryzae* según el documento WO 02/095014), *Aspergillus fumigatus* (producida de forma recombinante en *Aspergillus oryzae* según el ejemplo 22 del documento WO 02/095014) o *Aspergillus niger* (1981, J. Appl. 3: 157.163),

Enzimas hemicelulolíticas

[0170] El material con contenido de lignocelulosa pretratado puede ser sometido además a una o más enzimas hemicelulolíticas, p. ej., una o más hemicelulasas.

[0171] La hemicelulosa puede ser descompuesta por hemicelulasas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco y seis componentes de carbono de azúcar.

[0172] El material derivado de lignocelulosa puede ser tratado con una o más hemicelulasas.

[0173] Puede utilizarse cualquier hemicelulasa adecuada para uso en la hidrolización de la hemicelulosa, preferiblemente en xilosa. Las hemicelulasas preferidas incluyen xilanasas, arabinofuranosidasas, esterasa de xilano de acetilo, feruloil esterasa, glucuronidasas, endo-galactanasas, manasas, endo o exo arabinasas, exo-galactanasas, y mezclas de dos o más de las mismas. Preferiblemente, la hemicelulasa para uso en el presente proceso es una hemicelulasa con exo actividad y más preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa con exo actividad que tiene la capacidad de hidrolizar la hemicelulosa en condiciones ácidas de por debajo de pH 7, preferiblemente pH 3-7. Un ejemplo de hemicelulasa adecuada para uso en el presente proceso incluye VISCOZYME™ (disponible de Novozymes A/S. Dinamarca).

[0174] En una forma de realización la hemicelulasa es una xilanasas. En una forma de realización, la xilanasas puede ser preferiblemente de origen microbiano, tal como de origen fúngico (p. ej., *Trichoderma*, *Meripilus*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Fusarium*) o bacteriano (p. ej., *Bacillus*). En una forma de realización preferida, la xilanasas se deriva de un hongo filamentoso, preferiblemente derivado de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus aculeatus*; o una cepa de *Humicola*, preferiblemente *Humicola lanuginosa*. La xilanasas puede ser preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasas, más preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasas de GH10 o GH11. Ejemplos de xilanasas comerciales incluyen SHEARZYME™ y BIOFEED WHEAT™ de Novozymes A/S. Dinamarca.

[0175] La hemicelulasa se puede adicionar en una cantidad eficaz para hidrolizar hemicelulosa, tal como, en cantidades de aproximadamente 0.001 a 0.5 % en peso de sólidos totales (ST), más preferiblemente de aproximadamente 0.05 a 0.5 % en peso de ST.

[0176] Las xilanasas se pueden adicionar en cantidades de 0.001-1.0 g/kg DM (sustancia seca) de sustrato, preferiblemente en cantidades de 0.005-0.5 g/kg DM de sustrato, y de la forma más preferible de 0.05-0.10 g/kg DM de sustrato.

Xilosa isomerasa

[0177] Las xilosa isomerasas (D-xilosa ketoisomerasa) (E.C. 5.3.1.5.) son enzimas que catalizan la reacción de isomerización reversible de D-xilosa. Algunas xilosa isomerasas también convierten la isomerización reversible de D-glucosa en D-fructosa. Por lo tanto, a veces se hace referencia a la xilosa isomerasa como "isomerasa de glucosa"

[0178] Una xilosa isomerasa usada en un método o proceso de la presente divulgación puede ser cualquier enzima con actividad de xilosa isomerasa y se pueden derivar de cualquier fuente, preferiblemente de origen bacteriano o fúngico, tal como hongos filamentosos o levadura. Ejemplos de xilosa isomerasas bacterianas incluyen aquellas que pertenecen a los géneros *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, y *Thermotoga*, incluyendo *T. neapolitana* (Vieille y colaboradores, 1995. Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1867-1875 ) and *T. maritime*.

[0179] Ejemplos de xilosa isomerasas fúngicas son especies derivadas de *Basidiomycetes*.

[0180] Una xilosa isomerasa preferida se deriva de una cepa del género de levadura *Candida*, preferiblemente una cepa de *Candida boidinii*, especialmente la xilosa isomerasa de *Candida boidinii* descrita por, p. ej., Vongsuvanlert y colaboradores., 1988, Agric. Biol. Chem., 52(7): 1817-1824. La xilosa isomerasa puede estar derivada preferiblemente de una cepa de *Candida boidinii* (Kloeckera 2201), depositada como DSM 70034 y ATCC 48180, descrito en Ogata y colaboradores, Agric. Biol. Chem., 33: 1519-1520 o Vongsuvanlert y colaboradores, 1988, Agric. Biol. Chem., 52(2): 1519-1520.

[0181] En una forma de realización, la xilosa isomerasa se deriva de una cepa de *Streptomyces*, p. ej., derivada de una cepa de *Streptomyces murinus* (patente estadounidense nº. 4,687,742); *S. flavovirens*, *S. albus*, *S. achromogenus*, *S. echinatus*, *S. wedmorensis*, todos descritos en la patente estadounidense nº 3,616,221. Otras xilosa isomerasas se recogen en el documento de patente estadounidense nº. 3,622,463, el documento de patente estadounidense nº. 4,351,903. El documento de patente estadounidense nº. 4,137,126. El documento de patente estadounidense nº. 3,625,828, el documento de patente húngara nº. 12,415. El documento de patente alemana 2,417,642, el documento de patente japonesa nº. 69,28,473, y el documento WO 2004/044129.

[0182] La xilosa isomerasa puede estar bien en forma inmovilizada o líquida. Se prefiere la forma líquida.

[0183] Ejemplos de xilosa isomerasas disponibles comercialmente incluyen SWEETZYME™ T de Novozymes A/S, Dinamarca.

[0184] La xilosa isomerasa se añade para proporcionar un nivel de actividad en el intervalo de 0.01-100 IGIU por gramo de total de sólidos.

#### Actividad de mejora celulolítica

[0185] El término "actividad de mejora celulolítica" se define aquí como una actividad biológica que mejora la hidrólisis de un material derivado de lignocelulosa mediante proteínas con actividad celulolítica. Para los fines de la presente divulgación, la actividad de mejora celulolítica se determina por medición del aumento en azúcares reductores o en el aumento del total de celobiosa y glucosa de la hidrólisis de un material derivado de lignocelulosa, p. ej., material pretratado con contenido de lignocelulosa por proteína celulolítica en las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína total/g de celulosa en PCS (tallo de maíz pretratado), donde el total de proteína está compuesta por 80-99.5% p/p de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS y 0.5-20% p/p de proteína de actividad de mejora celulolítica durante 1-7 días a 50°C en comparación con una hidrólisis de control con igual carga de proteínas total sin actividad de mejora celulolítica (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS).

[0186] Los polipéptidos con actividad de mejora celulolítica mejoran la hidrólisis de un material derivado de lignocelulosa catalizado por proteínas con actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis preferiblemente al menos 0,1-veces, más al menos 0,2-veces, más preferiblemente al menos 0,3-veces, más preferiblemente al menos 0,4-veces, más preferiblemente al menos 0,5-veces, más preferiblemente al menos 1-vez, más preferiblemente al menos 3-veces, más preferiblemente al menos 4-veces, más preferiblemente al menos 5-veces, más preferiblemente al menos 10-veces, más preferiblemente al menos 20-veces, incluso más preferiblemente al menos 30-veces, de la forma más preferible al menos 50-veces, e incluso de la forma más preferible al menos 100-veces.

[0187] En una forma de realización preferida, la hidrólisis y/o fermentación se realizan en presencia de una enzima celulolítica en combinación con un polipéptido con actividad de mejora. En una forma de realización preferida el polipéptido con actividad de mejora es un polipéptido de la familia GH61A. El documento WO 2005/074647 divulga polipéptidos aislados con actividad de mejora celulolítica y polinucleótidos de los mismos de *Thielavia terrestris*. El documento WO 2005/074656 divulga un polipéptido aislado con actividad de mejora celulolítica y un polinucleótido de la misma de *Thermoascus aurantiacus*. La solicitud estadounidense publicada n°. 2007/0077630 divulga un polipéptido aislado con actividad de mejora celulolítica y un polinucleótido del mismo de *Trichoderma reesei*.

#### **Proteasas**

[0188] Se puede añadir una proteasa durante la hidrólisis en el paso ii), la fermentación en el paso iii) o hidrólisis y fermentación simultáneas. La proteasa puede ser cualquier proteasa. En una forma de realización preferida, la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen fúngico o bacteriano. Se prefiere una proteasa ácida fúngica, pero también pueden ser usadas otras proteasas.

[0189] Proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas acídicas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas en condiciones acídicas por debajo de pH 7.

[0190] Las proteasas fúngicas ácidas contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* and *Torulopsis*. Están especialmente contempladas proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (ver, p. ej., Koaze y colaboradores, 1964, Agr. Biol. Chem. Japón, 28: 216), *Aspergillus saitoi* (ver, p. ej., Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japón, 28: 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida y colaboradores, 1977, Agric. Biol. Chem., 42(5): 927-933, *Aspergillus aculeatus* (documento WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*, tal como la proteasa pepA; y proteasas acídicas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

[0191] También se contemplan proteasas neutras o alcalinas, tal como una proteasa derivada de una cepa de *Bacillus*. Una proteasa particular contemplada se deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible en la Swissprot como n°. de acceso P06832. También se contemplan las proteasas con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos obtenible de la Swissprot como n°. de acceso P06832 tal como al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

[0192] También se contemplan las proteasas con al menos un 90% identidad con la secuencia de aminoácidos descrita

como SEC ID n°:1 en el WO 2003/048353, tal como un 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

5 [0193] También se contemplan proteasas tipo papaína tales como proteasas dentro de E.C. 3.4.22.\* (proteasa de cisteína), tal como EC 3.4.22.2 (papaína), EC 3.4.22.6 (chimopapaína), EC 3.4.22.7 (asclepaina), EC 3.4.22.14 (actinidaina), EC 3.4.22.15 (catepsina L). EC 3.4.22.25 (glicil endopeptidasa) y EC 3.4.22.30 (caricaína).

10 [0194] En una forma de realización, la proteasa es una preparación de proteasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización, la proteasa se deriva de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor meihei*. En otra forma de realización contemplada, la proteasa es una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, y una proteasa derivada de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor meihei*.

15 [0195] Proteasas de ácido aspártico se describen, por ejemplo, en *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Editado por A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Aca-demic Press, San Diego, 1998, capítulo 270). Ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluyen, p. ej., aquellas descritas en Berka y colaboradores, 1990, Gene, 96: 313); Berka y colaboradores., 1993, Gene, 125: 195-198; y Gomi y colaboradores, 1993. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

20 [0196] Productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, FLAVOURZYME™, PROMIX™, NEUTRASE®, RENNILASE®, NOVOZYM™ FM 2.0L, y NOVOZYM™ 50006 (disponible de Novozymes A/S. Dinamarca) y GC106™ y SPEZYME™ FAN de Genencor Int., Inc., EEUU.

25 [0197] La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0.0001-1 mg de proteína enzimática por g DS, preferiblemente 0.001 a 0.1 mg de proteína enzimática por g DS. Alternativamente, la proteasa puede estar presente en una cantidad de 0.0001 a 1 LAPU/g DS, preferiblemente 0.001 a 0.1 LAPU/g DS y/o 0.0001 a 1 mAU-RH/g DS, preferiblemente 0.001 a 0.1 mAU-RH/g DS.

#### Organismo de fermentación modificado

30 [0198] El organismo de fermentación puede ser un organismo de fermentación modificado transformado con un polinucleótido que codifica una enzima de pirofosfatasa, donde el organismo de fermentación es capaz de expresar una enzima de pirofosfatasa en conaciones de fermentación.

35 [0199] Las condiciones de fermentación son como se definen según la invención. En una forma de realización preferida el organismo de fermentación es un organismo microbiano, tal como levadura u hongo filamentoso, o una bacteria. Ejemplos de otros organismos de fermentación se pueden encontrar en la sección "organismo de fermentación".

40 [0200] Un organismo de fermentación se puede transformar con una pirofosfatasa que codifica genes usando técnicas bien conocidas en la técnica.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

45 [0201]

Pirofosfatasa de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) fue adquirida de Sigma (I1643).

Pirofosfatasa de tabaco fue adquirida de Sigma (producto # P0414)

Pirofosfatasa de *E. coli* fue adquirida de Sigma (producto # I5907)

50 Pirofosfatasa de *Bacillus* fue adquirida de Sigma (producto # I2891) Glucoamilasa TC de *Trametes cingulata* descrita en la SEC ID n°: 2 en el documento WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

Glucoamilasa (AMG A): Glucoamilasa derivada de *Trametes cingulata* descrita en la SEC ID n°: 2 en el documento WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S.

55 Alfa-amilasa A (AA1): alfa-amilasa híbrida consistente en *Rhizomucor pusillus* alfa-amilasa con *Aspergillus niger* enlazador de glucoamilasa y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en el documento WO 2006/069290 (Novozymes A/S).

Preparación de celulasa A: composición celulolítica comprendiendo un polipéptido con actividad de mejora celulolítica (GH61A) descrita en el documento WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en el documento WO 2008/057637) y preparación de enzimas celulolíticas derivada de *Trichoderma reesei*.

60 Levadura: RED STAR™ disponible de Red Star/Lesaffre, EEUU  
RWB218 fue recibido de Royal Nedalco/Países Bajos y es descrito en Kuyper y colaboradores, 2005, FEMS Yeast

Research 5: 925-934.

[0202] Tallo de maíz sin lavar pretratado (PCS): catalizado por ácidos, explotado mediante vapor obtenido de The National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.

5

**Métodos:**

**Identidad**

10 [0203] La conexión entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de polinucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

15 [0204] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiples: penalización del espacio de 10 y penalización de longitud del espacio de 10. Parámetros de alineamiento emparejados son Ktuple=1, penalización de espacio=3, ventanas=5, y diagonales=5.

20 [0205] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de polinucleótidos se determina por el método Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80: 726-730) usando el Software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiples: penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Parámetros de alineamiento emparejados son Ktuple=3, espacio de penalización=3, y ventanas=20.

25 **Determinación de actividad de pirofosfatasa (ensayo de PPasa)**

Definición de unidad de \*Sigma (levadura)

[0206] Una unidad liberará 1.0 micro-moles de ortofosfato inorgánico por min. a pH 7.2 a 25°C.

30

Definición de unidad de \*Sigma (bacteria)

[0207] Una unidad liberará 1.0 micro moles de ortofosfato inorgánico por min. a pH 9 a 25°C.

35 [0208] Las definiciones anteriores de actividad de unidad se basan en la definición de unidad de los productos de Sigma-Aldrich PPasa: PPasa de *Saccharomyces cerevisiae* (producto # 11643) y PPasa de *Escherichia coli* (producto # I5907,

Definición de unidad de \*Sigma (planta o PPasas ácidas)

40 [0209] Una unidad liberará 1.0 de nanomoles de fosfato inorgánico de 7-metil-GTP en 30 min. a pH 6.0 a 37°C. Una unidad de 7-metil-GTP (pH 6.0) es equivalente a 15 unidades de ATP (pH 5.0).

**Actividad de glucoamilasa**

45 [0210] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades de glucoamilasa (AGU).

**Actividad de glucoamilasa (AGU)**

50 [0211] La unidad de glucoamilasa Novo (AGU) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto en las condiciones estándar 37°C, pH 4.3, sustrato: maltosa 23.2 mM, tampón: acetato 0.1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

55 [0212] Se puede usar un sistema autoanalizador. Se añade mutarotasa al reactivo de dehidrogenasa de glucosa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierte en beta-D-glucosa. La dehidrogenasa de glucosa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración original de glucosa.

60

<u>Incubación AMG:</u>	
Sustrato:	maltosa 23.2 mM
Tampón:	acetato 0.1 M
pH:	4.30 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Intervalo de trabajo enzimático:	0.5-4.0 AGU/mL

<u>Reacción de color:</u>	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0.21 mM
Tampón:	fósforo 0.12 M; 0.15 M NaCl
pH:	7.60 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

[0213] Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) describiendo este método analítico con más detalle está disponible a petición en Novozymes A/S, Dinamarca.

5

#### Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0214] La actividad de alfa-amilasa puede ser determinada usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción se continua mezclando muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negro, pero durante la descomposición del almidón el color del azul se vuelve más débil y se convierte gradualmente en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

10

[0215] Un kilo de unidad de alfa-amilasa Novo (KNU) se define como la cantidad de enzima que, en condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0.05; 0.0003 M Ca<sup>2+</sup>; y pH 5.6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

15

[0216] Una carpeta [EB-SM-0009.02/01](#) describiendo este método analítico con más detalle está disponible a petición a Novozymes A/S, Dinamarca.

20

#### Actividad de alfa-amilasa ácida (UAAF)

[0217] Cuando se usa según la presente invención la actividad de una alfa-amilasa ácida se puede medir en UAAF (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica). Alternativamente, la actividad de la alfa-amilasa ácida se puede medir en UAA (unidades de alfa-amilasa ácida).

25

#### Unidades de alfa-amilasa ácida (UAA)

[0218] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en UAA (unidades de alfa-amilasa ácidas), que es un método absoluto. Una unidad de amilasa ácida (UAA) es la cantidad de enzima que convierte 1 g de almidón (100% de sustancia seca) por hora en condiciones estandarizadas en un producto con una transmisión a 620 nm después de reacción con una solución de yodo de resistencia conocida igual al de una referencia de color.

30

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0219]

Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g DS/L.
Tampón:	Citrato, aprox. 0.13 M, pH=4.2
Solución de yodo:	40.176 g de yoduro potásico + 0.088 g de yodo/L
Agua de ciudad	15°-20°dH (dureza de grado alemán)
pH:	4.2
Temperatura de incubación:	30°C
Tiempo de reacción:	11 minutos
Longitud de onda:	620 nm
Concentración enzimática:	0.13-0.19 AAU/ml
Intervalo de trabajo enzimático:	0.13-0.19 AAU/ml

5

[0220] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene diluyendo tratamiento de ácido clorhídrico de almidón natural de modo que éste retiene la capacidad para teñir de azul con yodo. Pueden encontrarse detalles adicionales en el documento EP 0140410 B2.

10 **Determinación de UAF-F**

[0221] Las UAF-F Unidades de Alfa-Amilasa Fúngicas (Fungamyl) se mide en relación a un estándar enzimático de una resistencia declarada.

Condiciones de reacción	
Temperatura	37°C
pH	7.15
Longitud de onda	405 nm
Tiempo de reacción	5 min.
Tiempo de medición	2 min.

15

[0222] Una carpeta (EB-SM-0216.02) que describe este método estándar con más detalle está disponible a petición en Novozymes A/S, Dinamarca.

**Actividad de alfa-amilasa ácida (UAAF)**

20

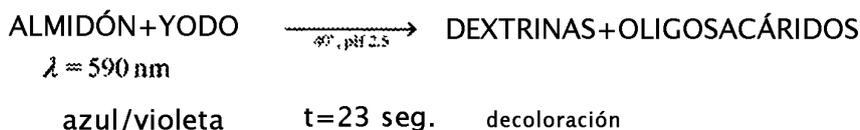
[0223] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en UAAF (unidades de alfa-amilasa ácidas fúngicas), que se determinan en relación a un estándar enzimático. 1 UAAF se define como la cantidad de enzima que degrada 5.260 mg de sustancia seca de almidón por hora en las condiciones estándar mencionadas por debajo.

25

[0224] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alpha-D-glucano-glucanohidrolasa, E.C. 3,2,1,1) hidroliza enlaces alpha-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con diferentes longitudes de cadena. La intensidad de color formado con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa se determina usando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón en las condiciones analíticas específicas.

30

**ALFA-AMILASA**



Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0225]

Sustrato:	almidón soluble, aprox. 0.17 g/L
Tampón:	citrato, aprox. 0.03 M
Yodo (I <sub>2</sub> ):	0.03 g/L
CaCl <sub>2</sub> :	1.85 mM
pH:	2.50 ± 0.05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración enzimática:	0.025 UAAF/mL
Intervalo de trabajo enzimático:	0.01-0.04 UAAF/mL

- 5 [0226] Una carpeta [EB-SM-0259.02/1](#) que describe este método analítico con más detalle está disponible a petición en Novozymes A/S, Dinamarca.

**Medición de actividad de celulasa usando ensayo de papel de filtro (ensayo FPU)**

## 10 1. Fuente del método

[0227] 1.1 el método se describe en un documento titulado "*Measurement of Cellulase Activities*" por Adney, B. y Baker, J., 1996, Laboratory Analytical Procedure, National Renewable Energy Laboratory (NREL). Se basa en el método IUPAC para medir la actividad de celulasa (Ghose, T.K., 1987, *Measurement of Cellulase Activities, Pure & Appl. Chem.* 59: 257-268.

15

## 2. Procedimiento

[0228]

20

2.1 El método se realiza como es descrito por Adney y Baker, 1996, *supra*, salvo para el uso de una placa de 96 pocillos para leer los valores de absorbencia después del desarrollo del color, como se describe a continuación.

## 2.2 Tubos de ensayo enzimático:

25

2.2.1 Una banda de papel de filtro laminado (#1 Whatman; 1 X 6 cm; 50 mg) se añade al fondo de un tubo de ensayo (13 X 100 mm).

2.2.2 Se añaden al tubo 1.0 mL de 0.05 M de tampón de Na-citrato (pH 4.80).

2.2.3 Los tubos con papel de filtro y tampón son incubados 5 min. a 50° C (± 0.1° C) en un baño de agua circulante.

30

2.2.4 Después de la incubación, se añaden al tubo 0.5 mL de dilución enzimática en tampón de citrato.

Las diluciones enzimáticas se diseñan para producir valores ligeramente por encima y por debajo del valor asignado de 2.0 mg de glucosa.

2.2.5 Los contenidos del tubo se mezclan mediante agitación suave durante 3 segundos.

35

2.2.6 Después de la agitación, los tubos se incuban durante 60 min. a 50°C (± 0.1 °C) en un baño de agua circulante.

2.2.7 Inmediatamente después de los 60 min. de incubación, los tubos se retiran del baño de agua, y se añaden 3.0 mL de reactivo DNS a cada tubo para frenar la reacción. Los tubos se agitan 3 segundos para mezclar.

40

## 2.3 Ensayo en blanco y controles

2.3.1 Se prepara un blanco de reactivo añadiendo 1.5 mL de tampón de citrato a una probeta.

2.3.2 Se prepara un control de sustrato colocando una banda de papel de filtro laminado en el fondo de una probeta, y añadiendo 1.5 mL de tampón de citrato.

2.3.3 Se preparan controles enzimáticos para cada dilución enzimática mezclando 1.0 mL de tampón de citrato con 0.5 mL de la dilución de enzima apropiada.

2.3.4 El blanco de reactivo, control de sustrato, y controles enzimáticos se evalúan de la misma manera como los tubos de ensayo enzimático, y se hace con éstos.

#### 2.4 Estándares de glucosa

2.4.1 Se prepara una solución madre de glucosa de 100 mL (10.0 mg/mL), y se congelan partes alícuotas de 5 mL. Antes de usarse, las partes alícuotas se descongelan y se remueven para mezclarse.

2.4.2 Las diluciones de la solución madre se hacen en tampón de citrato de la siguiente manera:

G1 = 1.0 mL de materia prima + 0.5 mL de tampón = 6.7 mg/mL = 3.3 mg/0.5 mL  
 G2 = 0.75 mL de materia prima + 0.75 mL de tampón = 5.0 mg/mL = 2.5 mg/0.5 mL  
 G3 = 0.5 mL de materia prima + 1.0 mL de tampón = 3.3 mg/mL = 1.7 mg/0.5 mL  
 G4 = 0.2 mL de materia prima + 0.8 mL de tampón = 2.0 mg/mL = 1.0 mg/0.5 mL

2.4.3 Se preparan tubos de estándar de glucosa añadiendo 0.5 mL de cada dilución a 1.0 mL de tampón de citrato.

2.4.4 Los tubos de glucosa estándar se evalúan de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y se hace como con éstos.

#### 2.5 Desarrollo de color

2.5.1 Después de los 60 min. de incubación y adición de DNS, los tubos se hierven todos juntos durante 5 min. en un baño de agua.

2.5.2 Después de la ebullición, se enfrían inmediatamente en un baño de hielo/agua.

2.5.3 Cuando están enfriados, los tubos se agitan brevemente, y se permite a la pulpa asentarse. Luego cada tubo es diluido añadiendo 50 microL del tubo a 200 microL de ddH<sub>2</sub>O en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo se mezcla, y la absorbancia se lee a 540 nm.

#### 2.6 Cálculos (los ejemplos se dan en el documento NREL)

2.6.1 Una curva estándar de glucosa se prepara graficando la concentración de glucosa (mg/0.5 mL) para los cuatro estándares (G1-G4) vs. A<sub>540</sub>. Esto se realiza utilizando una regresión lineal (Software prismático), y la ecuación para la línea se utiliza para determinar la glucosa producida para cada uno de los tubos de ensayo enzimático.

2.6.2 Se prepara un gráfico de glucosa producido (mg/0.5 mL) vs. dilución de enzima total, con el eje (dilución enzimática) estando en una escala logarítmica.

2.6.3 Se dibuja una línea entre la dilución enzimática producida justo sobre 2.0 mg de glucosa y la dilución producida justo por debajo. A partir de esta línea, se determina la dilución enzimática que habría producido exactamente 2.0 mg de glucosa.

2.6.4 Las unidades de filtro de papel/ml (FPU/mL) se calculan de la siguiente manera:

$$\text{FPU/ml} = 0.37 / 2.0 \text{ mg de glucosa de producción de dilución de enzima.}$$

#### Método de ensayo de proteasa - AU(RH)

[0229] La actividad proteolítica se puede determinar con hemoglobina desnaturalizada como sustrato. En el método de hemoglobina de Anson para la determinación de actividad proteolítica se digiere hemoglobina desnaturalizada, y la hemoglobina no digerida se precipita con ácido tricloroacético (ATC). La cantidad de producto ATC soluble se determina con reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y triptófano.

[0230] Una unidad de Anson (AU-RH) se define como la cantidad de enzima que en condiciones estándar (es decir, 25°C, pH 5.5 y 10 min. de tiempo de reacción) digiere hemoglobina a un nivel inicial de manera que se libera por minuto una cantidad de producto soluble ATC que da el mismo color con reactivo de fenol como un miliequivalente de tirosina.

[0231] El método AU(RH) es descrito en EAL-SM-0350 y está disponible de Novozymes A/S Dinamarca a petición.

#### Método de ensayo de proteasa (UAPL)

[0232] 1 unidad de amino-peptidasa de leucina (UAPL) es la cantidad de enzima que descompone 1 microM de sustrato por

minuto en las siguientes condiciones: 26 mM de L-leucina-p-nitroanilida como sustrato, 0.1 M Tris de tampón (pH 8.0), 37°C, 10 minutos de tiempo de reacción.

[0233] UAPL se describe en EB-SM-0298.02/01 disponible en Novozymes A/S Dinamarca a petición.

#### **Determinación de actividad de amilasa maltogénica (UAMN)**

[0234] Una UAMN (Unidad de Amilasa Maltogénica Novo) puede ser definida como la cantidad de enzima requerida para liberar un micro mol de maltosa por minuto en una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378) por ml de 0.1 M de tampón de citrato, pH 5.0 a 37°C durante 30 minutos.

### **EJEMPLOS**

#### **Ejemplo 1:**

#### **Efecto de pirofosfatasa (PPasa) en la fermentación de hidrolizados de tallo de maíz pretratado (PCS) para producir etanol**

[0235] Todos los tratamientos fueron evaluados vía fermentaciones de mini-escala. Tallo de maíz (PCS) ácido explotado por vapor diluido por NREL fue diluido con agua y ajustado a pH 5.0 con NH<sub>4</sub>OH. El tampón de penicilina y citrato y medio LP (extracto de levadura y peptona) también se añadieron antes de la hidrólisis. El nivel de sólidos totales (ST) fue de 20%. La muestra se hidrolizó entonces durante 72 horas a 50°C con una cantidad eficaz de preparación de celulasa A. Después del paso de hidrólisis, la muestra se filtró de forma estéril para eliminar los sólidos y el filtrado se usó para la fermentación. La fermentación se llevó a cabo en mini frascos de 40 ml a 30°C. Cada frasco contenía 5.0 ml de hidrolizados de PCS y 4.75 ml de medio LPGX (extracto de levadura, peptona, glucosa y xilosa). Cada frasco fue dosificado con la cantidad apropiada de levadura de panadería con base de PPasa basada en la dosificación mostrada en la tabla que aparece a continuación, seguido por inoculación de 0.25 ml de propagado RWB218 durante la noche. Después de la inoculación, los frascos fueron incubados en agitador a 30°C a 150 rpm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Las muestras se tomaron durante la fermentación y al final de la fermentación (48 horas) para medir el etanol (fig. 2), glucosa (fig 1a), xilosa (fig 1b), niveles de ácido acético y de glicerol por HPLC. La preparación de HPLC consistió en detener la reacción por adición de 40% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (adición de 1% v/v), centrifugado, y filtración a través de un filtro micrométrico de 0.20. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta el análisis. Se utilizó el sistema Agilent™ 1100 HPLC acoplado con detector RI. La columna de separación fue una columna aminex HPX-87H de exclusión iónica (300 mm x 7.8 mm) de BioRad™.

	Tratamientos	dosis de PPasa (ug/gST)
1	Control	
2	PPasa	1.25
3	PPasa	2.5
4	PPasa	8.5

#### **Ejemplo 2:**

#### **El efecto de la pirofosfatasa (PPasa) en la combinación de alfa-amilasa (AA 1) y glucoamilasa (AMG A) en un proceso de paso de sacarificación y fermentación simultáneos (SSF).**

[0236] Todos los tratamientos fueron evaluados vía fermentaciones a mini-escala. 410 g de maíz molido amarillo dentado (con un tamaño de partícula medio de alrededor de 0.5 mm) se añadió a 590 g de agua del grifo. Esta mezcla fue suplementada con 3.0 ml 1 g/L de penicilina y 1 g de urea. El pH de este lodo fue ajustado a 4.5 con 40% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El nivel de sólido seco (SS) se determinó como alrededor de 35 % en peso. Aproximadamente 5 g de este lodo se añadieron a frascos de 20 ml. Cada frasco fue dosificado con la cantidad apropiada de dosis enzimática mostrada en la tabla que aparece a continuación seguido de la adición de 200 micro litros de propagado de levadura/5 g de lodo. Las dosis de enzima reales fueron basadas en el peso exacto del lodo de maíz en cada frasco. Los frascos se incubaron a 32°C. Se realizaron nueve repeticiones de fermentaciones de cada tratamiento. Se seleccionaron tres repeticiones durante 24 horas, 48 horas y 70 horas de análisis de punto de tiempo. Los frascos fueron agitados a 24, 48 y 70 horas y analizados por HPLC. La preparación de HPLC consistió en detener la reacción por adición de 50 micro litros de 40% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, centrifugado, y filtración a través de un filtro de 0.45 micrómetros. Se almacenaron las muestras a 4°C hasta el análisis. El sistema de Agilent™ 1100 HPLC acoplado con detector de RI se utilizó para determinar la concentración de etanol y de oligosacáridos. La columna de separación era una columna aminex HPX-87H de exclusión iónica (300 mm x 7.8 mm) de BioRad™. Los

resultados del experimento 1 se resumen en las figuras 3 y 4, y los resultados del experimento 2 y 3 se resumen en las figuras 5 y 6, respectivamente.

Experimento 1  
[0237]

5

	Tratamientos	AA1 (UAF-F/gDS)	AMG A (AGU/gDS)	PPasa (microgramo de proteína/gDS)	ión metálico (mM/gDS)
1	AA 1 + AMG A	0.0475	0.50		
2	AA 1 + AMG A + PPasa de levadura	0.0475	0.50	5	
3	AA 1 + AMG A + PPasa de levadura	0.0475	0.50	10	
4	AA 1 + AMG A + PPasa de <i>Bacillus</i>	0.0475	0.50	25	
5	AA 1 + AMG A + PPasa de <i>Bacillus</i>	0.0475	0.50	50	
6	AA 1 + AMG A + PPasa de levadura + Magnesio	0.0475	0.50	5	5
7	AA 1 + AMG A + PPasa de levadura + Manganesio	0.0475	0.50	5	5
8	AA 1 + AMG A + PPasa de <i>Bacillus</i> + Magnesio	0.0475	0.50	25	5
9	AA 1 + AMG A + PPasa de <i>Bacillus</i> + Manganesio	0.0475	0.50	25	1

Experimento 2

[0238]

10

	Tratamientos	AA1 (UAF-F/gDS)	AMG A (AGU/g DS)	PPasa (mg de sólidos/gDS)
1	AA 1 + AMG A	0.0475	0.50	
2	AA 1 + AMG A + PPasa de <i>E. coli</i>	0.0475	0.50	10
3	AA 1 + AMG A + PPasa de <i>E. coli</i>	0.0475	0.50	20
4	AA 1 + AMG A + PPasa de <i>E. coli</i>	0.0475	0.50	30

Experimento 3

[0239]

15

	Tratamientos	AA 1 (UAF-F-gDS)	AMG A (AGU/g DS)	PPasa (unidades /gDS)
1	AA 1 + AMG A	0.0475	0.50	
2	AA 1 + AMG A + PPasa de tabaco	0.0475	0.50	0.5
3	AA 1 + AMG A + PPasa de tabaco	0.0475	0.50	1
4	AA 1 + AMG A + PPasa de tabaco	0.0475	0.50	2
5	AA 1 + AMG A + PPasa de tabaco	0.0475	0.50	5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proceso para la fermentación de material vegetal en un producto de fermentación en un medio de fermentación usando un organismo de fermentación bacteriano, de levadura o filamentoso fúngico, en el que una o más enzimas pirofosfatasas son añadidas al medio de fermentación, o expresadas a niveles aumentados por el organismo de fermentación y en el que durante la fermentación hay presente o se añade un ión metálico.
- 10 2. Proceso según la reivindicación 1, en el que el ión metálico se selecciona del grupo consistente en  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , y  $Zn^{2+}$ , o una combinación de dos o más de los mismos.
- 15 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que durante la fermentación hay presente una enzima generadora de fuente de carbohidrato.
- 20 4. Proceso según la reivindicación 3, en el que la enzima generadora de fuente de carbohidrato se selecciona del grupo consistente en glucoamilasa, beta-amilasa, amilasa maltogénica, pululanasa, alfa-glucosidasa, o una mezcla de dos o más de las mismas.
- 25 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que una alfa-amilasa fúngica ácida está presente durante la fermentación.
- 30 6. Proceso para la producción de un producto de fermentación a partir de material con contenido en almidón, comprendiendo los pasos de:
- i) licuar el material con contenido de almidón;
  - ii) sacarificar el material licuado;
  - iii) fermentar con uno o más organismos de fermentación;
- en el que la fermentación se lleva a cabo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 35 7. Proceso según la reivindicación 6, comprendiendo además, antes del paso i), los pasos de:
- x) reducir el tamaño de partícula del material con contenido de almidón por molturación; y
  - y) formar un lodo comprendiendo el material con contenido de almidón y agua.
- 40 8. Proceso para la producción de un producto a partir de fermentación de material con contenido de almidón, comprendiendo los pasos de:
- (a) sacarificar el material con contenido de almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material con contenido de almidón,
  - (b) fermentar utilizando un organismo de fermentación,
- en el que la fermentación se lleva a cabo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 45 9. Proceso según cualquiera de reivindicaciones 6-8, en el que el material con contenido de almidón se selecciona del grupo consistente en maíz, mandioca, trigo, cebada, centeno, sorgo, y patatas, o cualquier combinación de los mismos.
- 50 10. Proceso para la producción de un producto de fermentación a partir de material con contenido de lignocelulosa, comprendiendo los pasos de:
- (a) pretratamiento del material con contenido de lignocelulosa;
  - (b) hidrolizado del material;
  - (c) fermentación con un organismo de fermentación;
- en el que la fermentación se lleva acabo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 55 11. Proceso según la reivindicación 10, en el que el material con contenido de lignocelulosa se origina a partir de materiales seleccionados del grupo consistente en tallos de maíz, mazorcas de maíz, fibra de maíz, madera dura, madera de coníferas, paja de cereal, paja de trigo, césped, cáscaras de arroz, Miscanthus, desperdicios sólidos urbanos, residuos orgánicos industriales, bagazo, y papel de oficina, o mezclas de los mismos.
- 60 12. Proceso según la reivindicación 11, en el que el organismo de fermentación es un organismo de fermentación C6 o C5.

13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el organismo de fermentación es una levadura.
14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el producto de fermentación es etanol.
- 5 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el producto de fermentación es recuperado después de la fermentación por destilación.

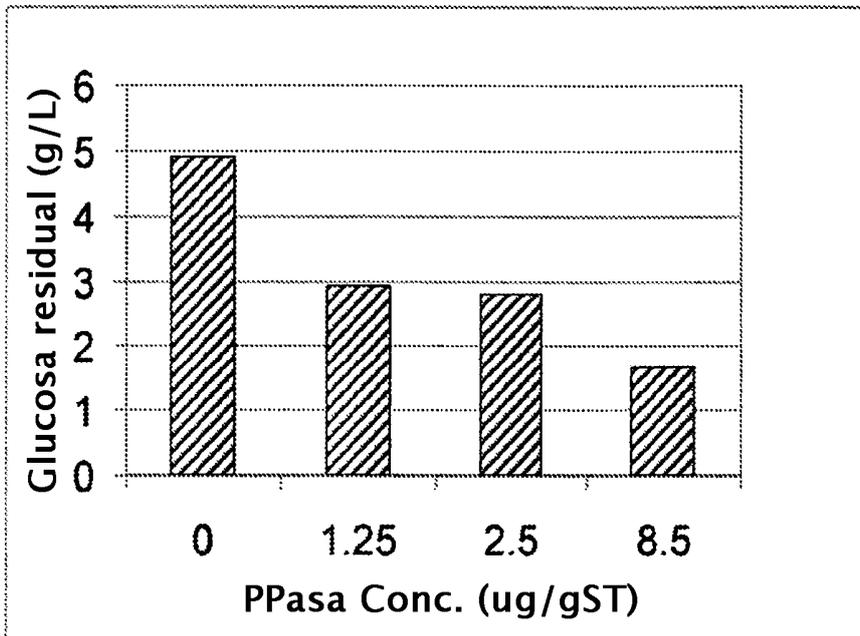


Figura 1a

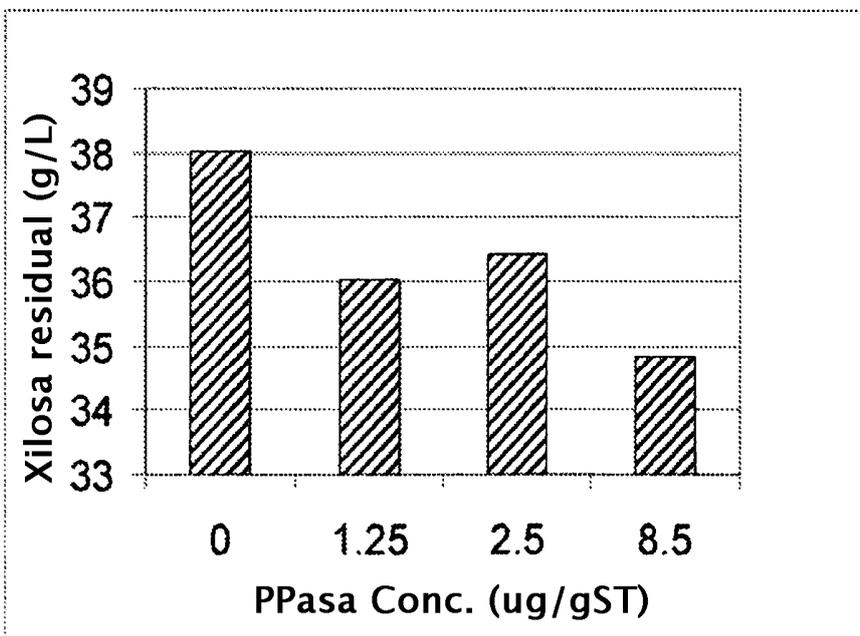


Figura 1b

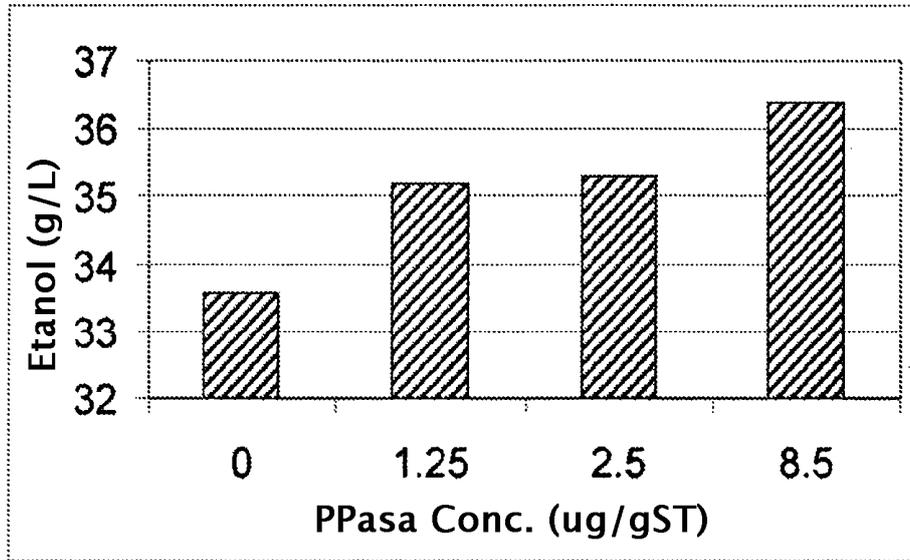


Figura 2

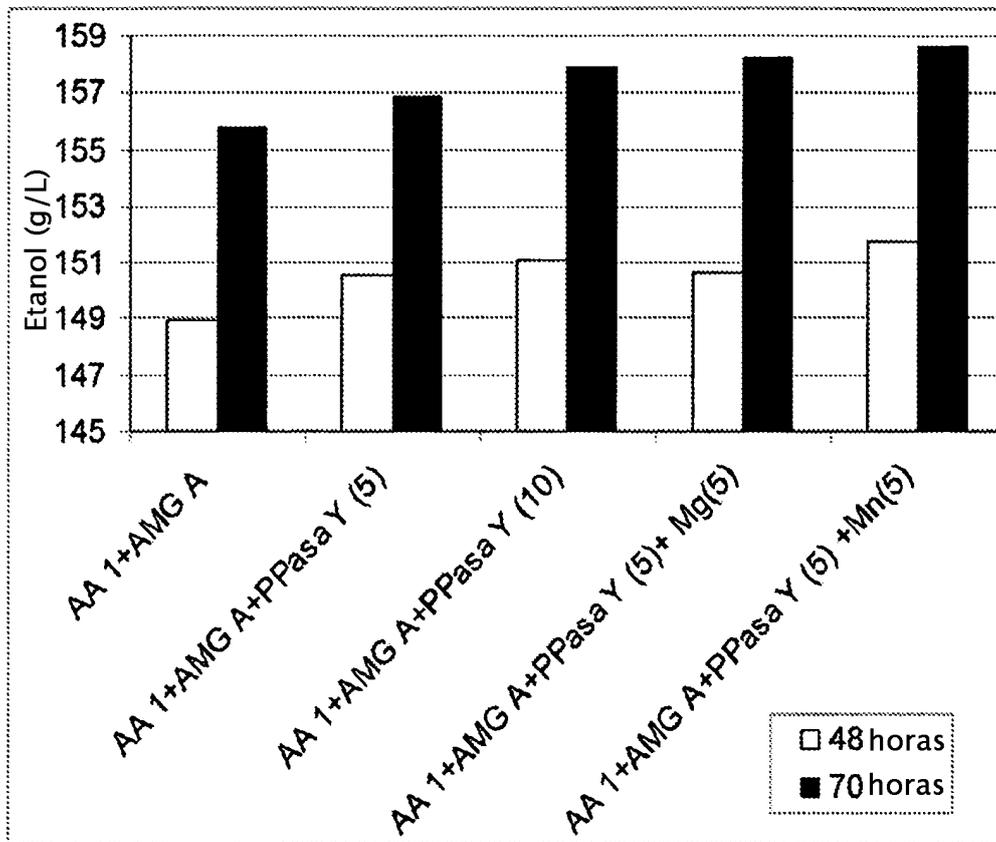


Figura 3

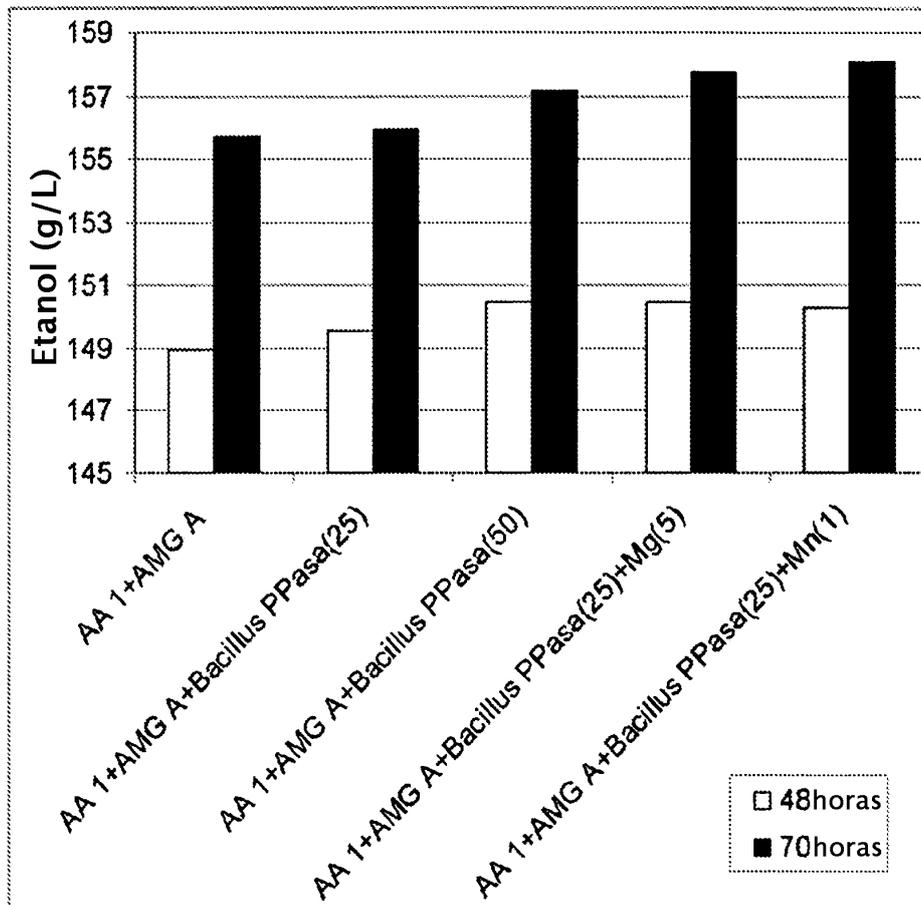


Figura 4

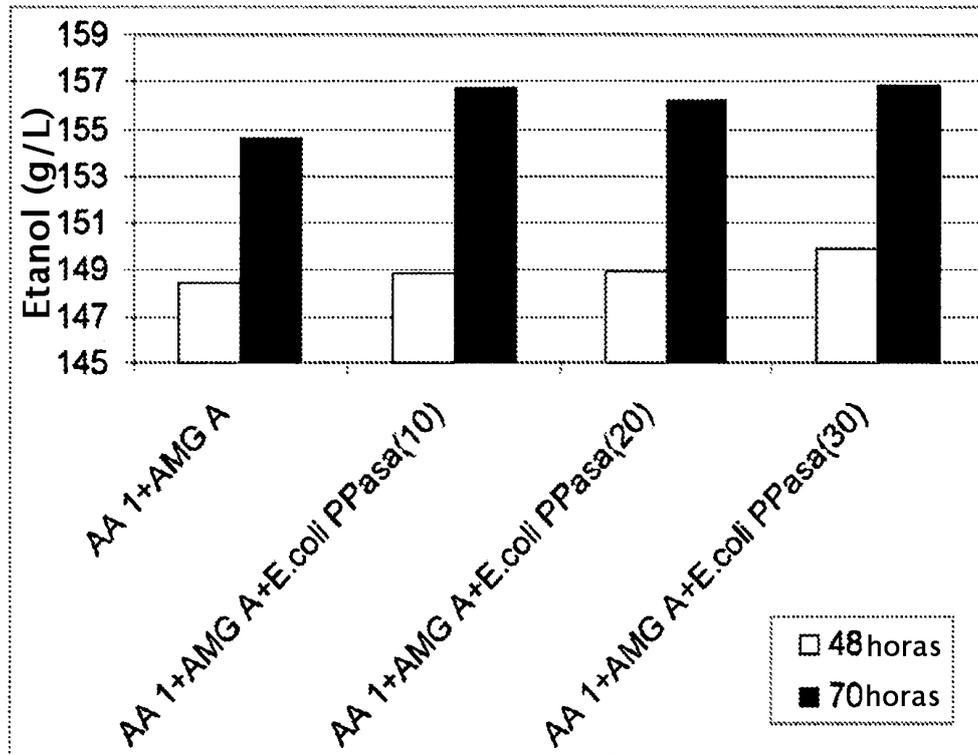


Figura 5

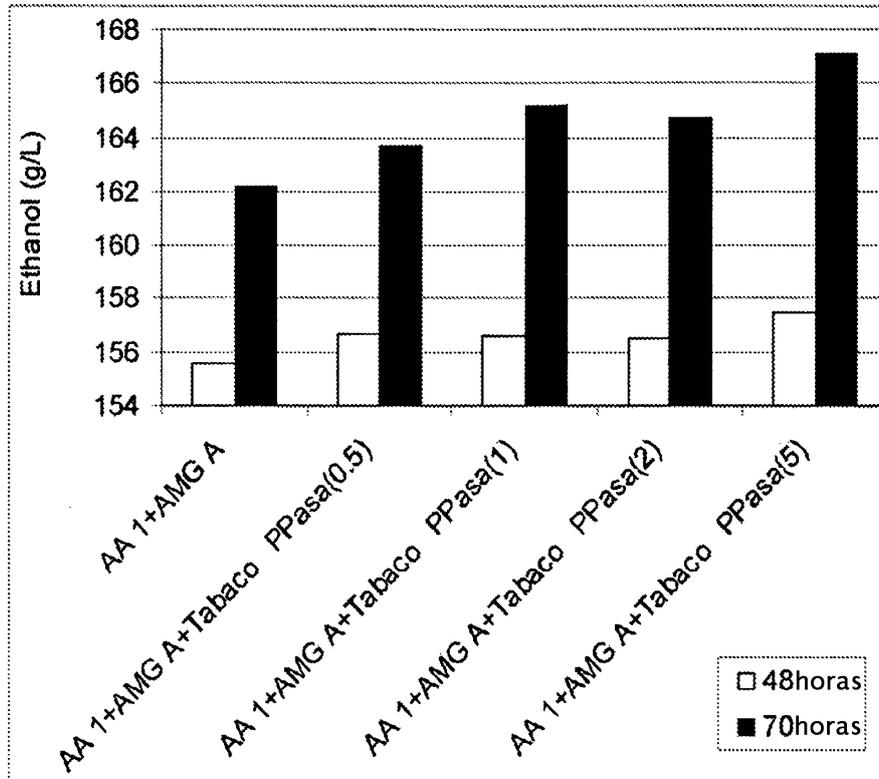


Figura 6