

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 516 668**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43	(2006.01)	C12N 9/62	(2006.01)
A61K 38/46	(2006.01)	C12P 19/14	(2006.01)
C12P 7/06	(2006.01)		
C12P 7/08	(2006.01)		
C12P 1/02	(2006.01)		
C12P 1/04	(2006.01)		
C12P 1/06	(2006.01)		
C12N 9/00	(2006.01)		
C12N 9/30	(2006.01)		
C12N 9/54	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2005 E 05758644 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1722812**

54 Título: **Proceso de licuación**

30 Prioridad:

19.02.2004 US 546118 P

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

31.10.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (100.0%)
77 PERRY CHAPEL CHURCH ROAD
FRANKLINTON, NC 27525, US**

72 Inventor/es:

**HENDERSON, LORI y
COSTABLE, CARMEN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 516 668 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

Proceso de licuación.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a un proceso mejorado de licuación de material que contiene almidón adecuado como una fase en procesos para producir jarabes y productos de fermentación. La invención también se refiere a procesos para producir etanol que comprenden la licuación de materia prima que contiene almidón conforme a la invención.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] La licuación es un proceso bien conocido en la técnica por el cual el almidón se convierte en cadenas más cortas y dextrinas menos viscosas. El proceso implica generalmente gelatinización de almidón simultáneamente con o seguido de la adición de alfa-amilasa. La licuación se usa en procesos para producir jarabes y productos de fermentación, tal como etanol. Hay una necesidad para mejorar la fase de licuación para convertir el almidón en jarabes y productos de fermentación tal como especialmente etanol.

20 **RESUMEN DE LA INVENCION**

[0003] El objetivo de la presente invención es proporcionar procesos mejorados de licuación de material que contiene almidón, especialmente material que contiene almidón de tamaño reducido por, por ejemplo, molienda en seco.

25 [0004] Los presentes inventores han encontrado que la licuación de material que contiene almidón molido en seco se puede mejorar por tratamiento con al menos una alfa-amilasa y una amilasa maltogénica o alternativamente con al menos una amilasa y al menos una esterasa. Se cree que la esterasa ataca a lípidos presentes en el material que contiene almidón para producir moléculas más pequeñas que son menos propensas a producir complejos lípidos de almidón referidos como almidón retrogradado. Una ventaja de un proceso de la invención es que éste mejora la licuación reduciendo la viscosidad del compuesto acuoso caliente o tibio gelatinizado e impide o al menos reduce la formación de almidón retrogradado creado durante la cocción a chorro. Además, según la invención más carbohidrato es liberado de la materia prima que contiene almidón crudo.

30 [0005] Así, en el primer aspecto la invención proporciona un proceso de licuación de material que contiene almidón que comprende la fase de tratar dicho material que contiene almidón con al menos una alfa-amilasa y una amilasa maltogénica.

35 [0006] En un segundo aspecto la invención proporciona un proceso de licuación de material que contiene almidón que comprende la fase de tratar dicho material que contiene almidón con al menos una amilasa y al menos una esterasa.

40 [0007] En una forma de realización el proceso de licuación comprende las fases de:

i) pretratamiento de un compuesto acuoso de material que contiene almidón con al menos una esterasa,

45 ii) licuación del compuesto acuoso pretratado con una alfa-amilasa.

[0008] En una forma de realización preferida el material que contiene almidón es reducido en tamaño, preferiblemente por molienda en seco. La fase de licuación ii) se puede realizar como un proceso de compuesto acuoso de calor consistente en varias fases, tal como un proceso en tres fases, realizado a diferentes temperaturas y tiempos de retención.

50 [0009] En la producción de productos de fermentación, tal como etanol, y otros productos a base de almidón, tales como jarabes, la materia prima que contiene almidón, tales como granos enteros, preferiblemente maíz, puede ser reducida en tamaño, preferiblemente por molienda en seco para abrir la estructura y permitir otro tratamiento. Técnicas para la reducción del tamaño del material que contiene almidón, incluyendo molienda en seco, son bien conocidos en la técnica.

55 [0010] En otro aspecto la invención proporciona procesos para producir productos de fermentación, tal como etanol, comprendiendo:

(a) reducción del tamaño de material que contiene almidón

60 (b) licuación del producto de la fase (a) con al menos una alfa-amilasa y al menos una amilasa maltogénica;

(c) sacarificación del material licuado obtenido en la fase (b) con una enzima generadora de fuente de carbohidrato; y

(d) fermentación del material sacarificado utilizando un microorganismo fermentador.

65 [0011] En una forma de realización preferida el material que contiene almidón se reduce en tamaño, preferiblemente por

molienda en seco. La fase (b) se puede realizar conforme al proceso de licuación de la invención. Las fases (c) y (d) se pueden realizar separadamente o simultáneamente (proceso SSF).

[0012] En otro aspecto la invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación, tal como etanol, comprendiendo:

(a) reducción del tamaño del material que contiene almidón

(b) licuación del producto de la fase (a) con al menos una amilasa y al menos una esterasa;

(c) sacarificación del material licuado obtenido en la fase (b) con una enzima generadora de carbohidrato; y

(d) fermentación del material sacarificado utilizando un microorganismo fermentador.

[0013] En una forma de realización preferida el material que contiene almidón se reduce en tamaño, preferiblemente por molienda en seco. La fase (b) se puede realizar conforme al proceso de licuación de la invención. Las fases (c) y (d) se pueden realizar separadamente o simultáneamente (proceso SSF).

[0014] La invención también proporciona un proceso para producir un producto de fermentación, tal como etanol, que comprende

(a) reducción del tamaño del material que contiene almidón

(b) i) pretratamiento de un compuesto acuoso de dicho material que contiene almidón con al menos una esterasa, y

ii) licuación del compuesto acuoso pretratado con una alfa-amilasa;

(c) sacarificación del material licuado obtenido en la fase (b) con una enzima generadora de carbohidrato; y,

(d) fermentación del material sacarificado utilizando un microorganismo fermentador.

[0015] Las fases (b) y (c) se pueden realizar conforme al proceso de licuación de la invención. Las fases (c) y (d) se pueden realizar separadamente o simultáneamente (proceso SSF).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0016] La presente invención proporciona un proceso de licuación mejorado adecuado como una fase en procesos para producir, por ejemplo, jarabes o productos de fermentación. Como resultado del proceso de la invención, se evita la formación de almidón retrogradado o al menos se reduce y así más carbohidratos son liberados de la materia prima cruda que contiene almidón.

Materias primas

[0017] La materia prima cruda que contiene almidón se reduce en tamaño, preferiblemente por molienda en seco. Procesos de molienda en seco son bien conocidos en la técnica y generalmente implican la fase de triturar/moler el material que contiene almidón, tales como granos de cereal entero, en un estado seco o sustancialmente seco. No obstante, otras técnicas pueden reducir el tamaño del material que contiene almidón son también contemplados y dentro del campo de la invención.

[0018] En la producción de etanol la molienda en seco incluye generalmente las fases de trituración/molienda de granos de cereal enteros para producir una comida, y sometimiento de la comida a licuación, sacarificación, fermentación y opcionalmente recuperación por, por ejemplo, destilación.

[0019] La materia prima es generalmente seleccionada con base en el producto de fermentación deseado y el proceso empleado. Ejemplos de materias primas adecuados para el uso en un proceso de la presente invención incluyen materias primas que contienen almidón, tales como tubérculos, raíces, granos enteros, maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo o cereales, materias primas que contienen azúcar, tal como melaza, materias de la fruta, azúcar, caña de azúcar o remolacha azucarera, patatas, y materiales que contienen celulosa, tal como madera o residuos vegetales. Granos de maíz enteros que contienen almidón son la materia prima cruda preferida para la licuación y procesos de producción de productos de fermentación, tal como etanol, de la invención.

Productos de fermentación

[0020] Productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas.

Licuación

- 5 [0021] Los presentes inventores han encontrado que la licuación de material que contiene almidón se puede mejorar por tratamiento de dicho material que contiene almidón con al menos una alfa-amilasa y al menos una amilasa maltogénica o alternativamente con al menos una amilasa y al menos una esterasa.
- 10 [0022] Así, en el primer aspecto la invención proporciona un proceso de licuación de material que contiene almidón que comprende la fase de tratar dicho material que contiene almidón con al menos una alfa-amilasa y al menos una amilasa maltogénica.
- [0023] Según el segundo aspecto la invención proporciona un proceso de licuación de material que contiene almidón que comprende la fase de tratar el material que contiene almidón con al menos una amilasa y al menos una esterasa.
- 15 [0024] Sin estar limitado a cualquier teoría se cree que el tratamiento con una combinación de amilasa y esterasa reduce la formación de almidón retrogradado. Se cree que la esterasa ataca a lípidos presentes en, por ejemplo, material que contiene almidón molido en seco, tal como maíz, para producir moléculas más pequeñas que son menos propensas a producir complejos lipídicos de almidón referidos como almidón retrogradado que se crean durante la cocción de chorro. Además, esterases catalizan una reacción entre dendrímero y cadenas de almidón solubles que
- 20 ocurre en la interfase de aceite para formar una nueva arquitectura que previene la formación del complejo de lípido-almidón durante la cocción de chorro y licuación. También puede reducir la cantidad de amilasa necesaria para llevar a cabo la licuación.
- [0025] Según la presente invención "licuación" es un proceso donde el material que contiene almidón, preferiblemente materia prima de grano (entero), es descompuesto (hidrolizado) en maltodextrinas (dextrinas). Según la invención la licuación se puede realizar calentando el compuesto acuoso de 20-40 % en peso, preferiblemente 25-35 % en peso de material que contiene almidón y agua a entre 20-105°C, preferiblemente 60-95°C y añadiendo las enzimas para iniciar la licuación (dilución). El compuesto acuoso puede luego ser cocido a chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C para completar la gelatinización del compuesto acuoso. Luego el compuesto acuoso se enfría a 60-95°C y más enzima(s) es(son) añadida(s) para finalizar la hidrólisis (licuación secundaria).
- 25 [0026] En una forma de realización de la invención la licuación se realiza como un proceso consistente en varias fases, tal como un proceso de tres fases, donde la primera fase se realiza a una temperatura en la gama de 80 a 105°C, la segunda fase a una temperatura en la gama entre 65 a 95°C, y la tercera fase a una temperatura entre 40-75°C.
- 35 [0027] En una forma de realización preferida tres fases se realizan a las siguientes fases de temperatura: una primera fase: 80- 95°C, una segunda fase: 75-85°C, y tercera fase: 60 a 70°C. Según la invención el tiempo de retención para la primera fase puede ser de 10 a 90 minutos, 30- 120 minutos para la segunda fase, y 30-120 minutos para la tercera fase.
- 40 [0028] Un proceso de licuación de la invención puede típicamente efectuarse a pH 4,5-6,5, en particular a un pH entre 5 y 6.
- [0029] La amilasa puede ser cualquier amilasa, siendo preferida una amilasa mencionada en la sección "Amilasas" más abajo. En una forma de realización preferida la amilasa es una alfa-amilasa y/o una amilasa maltogénica. La esterasa puede ser cualquier esterasa, preferiblemente una esterasa mencionada en la sección "Esterasas". Esterasas preferidas son lipasas, fosfolipasas, y cutinasas, o mezclas derivadas. Un proceso de la invención de licuación o una fase de pretratamiento de la invención se puede realizar en presencia de una enzima oxidante de ácido graso, preferiblemente una lipoxigenasa, como será definido adicionalmente más abajo en la sección "Enzimas oxidantes de ácidos grasos".
- 50 [0030] En una forma de realización el proceso de licuación comprende las fases de:
- i) pretratar un compuesto acuoso de material que contiene almidón con al menos una esterasa, y
- 55 ii) licuación del compuesto acuoso pretratado con una alfa-amilasa.
- [0031] El material pretratado es preferiblemente reducido en tamaño, preferiblemente por molienda en seco. Como se ha mencionado anteriormente la licuación se puede realizar como un proceso de compuesto acuoso caliente de tres fases. En una forma de realización de la invención la esterasa se usa junto con una amilasa maltogénica durante el pretratamiento. En otra forma de realización de una esterasa, una amilasa maltogénica, y una alfa-amilasa están presentes durante el pretratamiento. En otra forma de realización de una esterasa, una amilasa maltogénica y enzimas generadoras de fuente de carbohidrato, tal como una glucoamilasa y opcionalmente una alfa-amilasa de ácido fúngico están presentes durante el pretratamiento.
- 60 [0032] En otra forma de realización del proceso de la invención el material que contiene almidón reducido en tamaño, por ejemplo, por molienda en seco, se licua por tratamiento con una esterasa, amilasa maltogénica y/o una alfa-amilasa sin o sin pretratamiento.
- 65

5 [0033] En una forma de realización preferida el pretratamiento se realiza sometiendo una suspensión acuosa preferiblemente de material que contiene almidón reducido en tamaño, por ejemplo, por molienda en seco, para una esterasa, preferiblemente una lipasa, una amilasa maltogénica y una alfa-amilasa, preferiblemente una amilasa ácida, tal como una alfa-amilasa de ácido fúngico seguido de licuación con una alfa-amilasa.

[0034] El proceso es preferiblemente realizado en un compuesto acuoso caliente acuoso a una temperatura en la gama de 20-105°C, preferiblemente 60-95°C.

10 **Proceso de producto de fermentación**

15 [0035] Procesos de producción de producto de fermentación, tal como etanol, de la invención generalmente implican las fases de reducción del tamaño de la materia prima que contiene almidón, por ejemplo, por molienda en seco, licuación, sacarificación, fermentación y opcionalmente recuperación, por ejemplo, por destilación. En los procesos de producción para producir un producto de fermentación, tal como etanol, el material que contiene almidón crudo, tal como granos enteros, preferiblemente maíz, se reduce en tamaño, por ejemplo, por molienda en seco, para descubrir la estructura y permiten otro tratamiento.

20 [0036] En un aspecto la invención proporciona un proceso para producir un producto de fermentación, tal como etanol, que comprende

(a) reducir el tamaño de material que contiene almidón

(b) licuación del producto de la fase (a) con al menos una alfa-amilasa y al menos una amilasa maltogénica;

25 (c) sacarificación del material licuado obtenido en la fase (b) con una enzima generadora de fuente de carbohidrato; y

(d) fermentación del material sacarificado que utiliza un microorganismo fermentador.

30 [0037] La fase (b) se puede realizar conforme al proceso de licuación de la invención.

[0038] En otro aspecto la invención proporciona un proceso para producir un producto de fermentación, tal como etanol, que comprende

(a) reducir el tamaño de material que contiene almidón;

35 (b) licuación del producto de la fase (a) con al menos una amilasa y al menos una esterasa;

(c) sacarificar el material licuado obtenido en la fase (b) con una enzima generadora de carbohidratos; y

(d) fermentar el material sacarificado utilizando un microorganismo fermentador.

40 [0039] La fase (b) se puede realizar conforme al proceso de licuación de la invención.

[0040] En otro aspecto la invención proporciona un proceso para producir un producto de fermentación, tal como etanol, que comprende

45 (a) reducir el tamaño de material que contiene almidón

(b) i) pretratamiento de un compuesto acuoso de dicho material que contiene almidón con al menos una esterasa,

ii) licuación del compuesto acuoso pretratado con una alfa-amilasa.

50 (c) sacarificar el material licuado obtenido en la fase (b) con una enzima generadora de carbohidratos; y

(d) fermentar el material sacarificado utilizando un microorganismo fermentador.

55 [0041] La fase (b) se realiza conforme al proceso de licuación de la invención. Las fases (c) y (d) se pueden realizar consecutivamente o simultáneamente (proceso SSF).

[0042] La fase de fermentación se puede seguir por una recuperación opcional, tal como destilación del producto de fermentación.

60 **Sacarificación**

65 [0043] "Sacarificación" es una fase en la que la maltodextrina (tal como, producto del proceso de licuación) se convierte en azúcares moleculares bajos DP1-3 (es decir, fuente de carbohidrato) que se puede metabolizar por un microorganismo fermentador, tal como levadura. Una fase de sacarificación en un proceso de producción de producto de fermentación de la invención se puede realizar utilizando una fase de sacarificación bien conocida en la técnica. La sacarificación es típicamente realizada enzimáticamente utilizando al menos una o varias enzimas generadoras de

fente de carbohidrato, tal como una glucoamilasa. La fase de sacarificación en un proceso para producir etanol de la invención puede ser una sacarificación bien conocida en la técnica. En una glucoamilasa de forma de realización, alfa-glucosidasas y/o alfa-amilasa ácida se usan para tratar el material licuado que contiene almidón. Una fase de sacarificación completa puede durar hasta aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas o más, y es frecuentemente realizada a temperaturas de aproximadamente 30 a 65°C y a un pH entre 4 y 5, normalmente a alrededor de pH 4.5. No obstante, es frecuentemente más preferido hacer una fase de pre-sacarificación, que dure aproximadamente de 40 a 90 minutos a temperatura de entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguido de sacarificación completa durante la fermentación en un proceso simultáneo de sacarificación y de fermentación (proceso SSF). En la producción de etanol, la sacarificación es normalmente realizada como un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF), en el que no hay fase de mantenimiento para la sacarificación, lo que significa que el microorganismo fermentador, tal como levadura, y enzima(s) es(son) añadido(s) juntos. En procesos SSF, es común introducir una fase de pre-sacarificación a una temperatura, por ejemplo, por encima de 50°C, justo antes de la fermentación.

15 Fermentación

[0044] En la producción de etanol, el microorganismo fermentador es preferiblemente levadura, el cual se aplica a la trituración sacarificada. "Microorganismo fermentador" se refiere a cualquier organismo adecuado para usar en un proceso de fermentación deseado. Microorganismos fermentadores adecuados son según la invención capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de microorganismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. Levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces spp.*, y en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. Levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, RED STAR®/Lesaffre ETHANOL RED (disponible de Red Star/Lesaffre, EEUU) FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, una filial de Burns Philip Food Inc., EEUU), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de GERT Strand AB Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties). En formas de realización preferidas, la levadura se aplica a la trituración y la fermentación continúa durante 24-96 horas, tal como típicamente 35-60 horas. En una forma de realización preferida la temperatura está generalmente entre 26-34°C, en particular aproximadamente 32°C, y el pH es generalmente de pH 3-6, preferiblemente alrededor de pH 4-5. Las células de levadura son preferiblemente aplicadas en cantidades de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , especialmente 5×10^7 recuento de levadura viable por mL de caldo de fermentación. Durante la fase de producción de etanol el recuento de células de levadura debería preferiblemente estar en la gama de 10^7 a 10^{10} , especialmente alrededor de 2×10^8 . Otra guía con respecto al uso de levadura para fermentación se puede encontrar en, por ejemplo, "The alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R.Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999).

35 Recuperación

[0045] Después de la fermentación, la trituración se puede recuperar por, por ejemplo, destilación, para extraer el producto de fermentación, tal como producto de alcohol (especialmente etanol). En el caso en el que el producto final sea etanol se puede usar como, por ejemplo, etanol de combustible; etanol bebible, es decir, licores neutros bebibles; o etanol industrial.

Conversión de almidón

45 [0046] El proceso de licuación de la invención también se puede incluir en un proceso de conversión de almidón tradicional para producir jarabes tales como glucosa, maltosa, malto-oligosacáridos e isomalto-oligosacáridos.

Amilasas

50 [0047] Amilasas adecuadas incluyen alfa-amilasas, beta-amilasas y amilasas maltogénicas, o mezclas de las mismas.

Alfa-amilasas

55 [0048] Según la invención alfa-amilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico.

[0049] En una forma de realización la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Bacillus*, tal como, derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. Otras alfa-amilasas incluyen alfa-amilasa derivada de una cepa de *Bacillus sp.* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas las cuales están descritas en detalle en WO 95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31.

65 [0050] La alfa-amilasa también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente aquella descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355 (todos los documentos incorporados por la presente por referencia). Variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente se describen en la patente estadounidense Nos. 6,093,562, 6,297,038 o patente estadounidense nº 6,187,576 (incorporadas por la presente por referencia) e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con

una delección de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una delección doble descrita en WO 1996/023873 - véase por ejemplo, página 20, líneas 1-10 (incorporada por la presente por referencia), preferiblemente que corresponde con delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEC ID NO:3 descrita en WO 99/19467 o delección de los aminoácidos R179 y G180 usando SEC ID NO:3 en WO 99/19467 para numeración (cuya referencia está incorporada por la presente por referencia). Más preferidas incluso son alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasa de *Bacillus stearothersophilus*, que tiene una delección doble que corresponde con delta(181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEC ID NO:3 descrita en WO 99/19467.

[0051] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos de terminal C de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en SEC ID n°: 4 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos de terminal N de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en SEC ID n°: 5 de WO 99/19467), con la siguiente sustitución: G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración en SEC ID n°: 4 de WO 99/19467). Especialmente preferidas son las variantes que tienen una o más de las mutaciones H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente delección de E178 y G179 (utilizando la numeración de SEC ID n°: 5 de WO 99/19467).

[0052] Otras alfa-amilasas bacterianas contempladas son alfa-amilasa KSM-K36 descrita en EP 1,022,334 y depositada como alfa-amilasa FERM BP 6945 y KSM-K38 descritas en EP 1,022,334, y depositadas como FERM BP-6946. También por lo tanto son contempladas variantes, en particular las variantes descritas en WO 02/31124 (de Novozymes A/S).

[0053] Otra alfa-amilasa incluye alfa-amilasas derivadas de una cepa de *Aspergillus*, tal como, *Aspergillus oryzae* y alfa-amilasas de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida. En una forma de realización más preferida la alfa-amilasa ácida es una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana. De forma más preferible, la alfa-amilasa ácida es una alfa-amilasa ácida fúngica derivada del género *Aspergillus*. Una amilasa ácida fúngica disponible comercialmente es SP288 (disponible por Novozymes A/S, Dinamarca).

[0054] En una forma de realización la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene actividad a un pH en la gama de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 3.5 a 6.0, o de forma más preferible de 4.0-5.0.

[0055] Una alfa-amilasa ácida fúngica preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl. En la presente divulgación, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una identidad alta, es decir, más del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 90%, 95 o incluso 99% de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°: 10 en WO 96/23874. Cuando se usa como una enzima generadora de maltosa alfa-amilasas fúngicas se pueden adicionar en una cantidad de 0.001-1.0 AFAU/g DS, preferiblemente de 0.002-0.5 AFAU/g DS, preferiblemente 0.02-0.1 AFAU/g DS.

[0056] Preferiblemente la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, preferiblemente del género *Aspergillus*, preferiblemente de las especies de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *A. niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos de Swiss-prot/TeEMBL bajo la accesión primaria n° P56271. También variante de amilasa ácida fúngica establecida con al menos 70% de identidad, tal como al menos 80% o incluso al menos 90% de identidad a ella es contemplada.

[0057] Otras alfa-amilasas contempladas incluyen las alfa-amilasas híbridas descritas en WO 2005/003311 (incorporada por la presente por referencia).

[0058] Composiciones comerciales preferidas que incluyen una alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ de DSM; BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L de Novozymes A/S, Dinamarca) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEYME FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int., EEUU), y la alfa-amilasa ácida fúngica vendida bajo el nombre comercial SP 288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0059] La alfa-amilasa se puede adicionar en cantidades como son bien conocidas en la técnica. Cuando se mide en unidades AAU la actividad de alfa-amilasa ácida está preferiblemente presente en una cantidad de 5-50,000 AAU/kg de DS, en una cantidad de 500- 50,000 AAU/kg de DS, o de forma más preferible en una cantidad de 100-10,000 AAU/kg de DS, tal como 500-1,000 AAU/kg DS. Alfa-amilasa de ácido fúngico son preferiblemente adicionadas en una cantidad de 10-10,000 AFAU/kg de DS, en una cantidad de 500-2,500 AFAU/kg de DS, o de forma más preferible en una cantidad de 100-1,000 AFAU/kg de DS, tal como aproximadamente 500 AFAU/kg DS.

Amilasas maltogénicas

[0060] 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 a maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible por Novozymes A/S bajo el nombre comercial MALTOGENASE™. Alfa-amilasas maltogénicas están descritas en las patentes estadounidenses Nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628, que están incorporadas por la presente por referencia.

Esterasas

[0061] Como se utiliza en este caso, una "esterasa" también referida como unas hidrolasas de éster carboxílico, se refiere a enzimas que actúan en enlaces estéricos, e incluye enzimas clasificadas en hidrolasas del éster carboxílico EC 3.1.1 según nomenclatura enzimática (disponible en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme> o de Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, California, con suplemento 1 (1993), suplemento 2 (1994), suplemento 3 (1995), suplemento 4 (1997) y suplemento 5, en Eur. J. Biochem. 1994, 223,1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232,1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237,1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250,1-6, y Eur. J. Biochem. 1999, 264,610-650; respectivamente). Ejemplos no limitativos de esterasas incluyen arilesterasa, triacilglicerol-lipasa, acetilesterasa, acetilcolinesterasa, colinesterasa, tropinesterasa, pectinesterasa, esterol-esterasa, clorofilasa, L-arabinonolactonasa, gluconolactonasa, uronolactonasa, tanasa, retinil-palmitato esterasa, hidrolasa de dímero de hidroxibutirato, acilglicerol lipasa, 3-oxoadipato enol-lactonasa, 1,4-lactonasa, galactolipasa, 4-piridoxolactonasa, acilcarnitina hidrolasa, aminoacil-ARNt hidrolasa, D-arabinonolactonasa, 6-fosfogluconolactonasa, fosfolipasa A1,6-acetilglucosa desacetilasa, lipoproteína-lipasa, dihidrocoumarina lipasa, limonin-D-anillo-lactonasa, esteroide-lactonasa, triacetato-lactonasa, actinomicina lactonasa, orselinato-dépsido hidrolasa, cefalosporina C desacetilasa, clorogenato hidrolasa, alfa-aminoácido esterasa, 4-metiloxaloacetato esterasa, carboximetilenobutenolidasa, desoxilimonato A-anillo-lactonasa, 2-acetil-1-alkilglicerofosfolina esterasa, fusarinina C ornitinerasa, sinapina esterasa, hidrolasa de éster de cera, forbol- diester hidrolasa, fosfatidilinositol desacilasa, sialato O-acetilesterasa, acetoxibutinilbitiofeno desacetilasa, acetilsalicilato desacetilasa, metilumbeliferil-acetato desacetilasa, 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa, N-acetilgalactosaminoglicano desacetilasa, esterasa de hormona juvenil, bis(2-etilhexil)ftalato esterasa, proteína-glutamato metilesterasa, 11-cis-retinil-palmitato hidrolasa, todos-trans-retinil-palmitato hidrolasa, L-rhamnono-1,4-lactonasa, 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno desacetilasa, etil-éster acilo-graso sintasa, xilono-1,4-lactonasa, n-acetilglucosaminilfosfatidilinositol desacetilasa, cetraxato bencilsterasa, acetilalkilglicerol acetilhidrolasa, y acetilxilano esterasa.

[0062] Esterasas preferidas para usar en la presente invención son enzimas lipolíticas, tales como, lipasas (según están clasificadas por EC 3.1.1.3, EC 3.1.1.23 y/o EC 3.1.1.26) y fosfolipasas (según están clasificadas por EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32, incluyendo lisofosfolipasas según están clasificadas por EC 3.1.1.5). Otras esterasas preferidas son cutinasas (según están clasificadas por EC 3.1.1.74).

[0063] Ejemplos de cantidades eficaces de esterasa son de 0,01 a 400 LU/g DS (sólidos secos). Preferiblemente, la esterasa se usa en una cantidad de 0.1 a 100 LU/g DS, de forma más preferible 0.5 a 50 LU/g DS, e incluso de forma más preferible 1 a 20 LU/g DS. Otra optimización de la cantidad de esterasa puede de aquí en adelante ser obtenida utilizando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

[0064] En una forma de realización preferida la esterasa es una enzima lipolítica, de forma más preferible, una lipasa. Como se utiliza en este caso, unas "enzimas lipolíticas" se refieren a lipasas y fosfolipasas (incluyendo lisofosfolipasas). La enzima lipolítica es preferiblemente de origen microbiano, en particular de, origen bacteriano, fúngico o de levadura. La enzima lipolítica usada se puede derivar de cualquier fuente, incluyendo, por ejemplo, una cepa de *Absidia*, en particular de *Absidia blakesleena* y *Absidia corymbifera*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aeromonas*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aureobasidium*, en particular *Aureobasidium pullulans*, una cepa de *Bacillus*, en particular *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*, una cepa de *Beauveria*, una cepa de *Brochothrix*, en particular *Brochothrix thermosohata*, una cepa de *Candida*, en particular *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*), *Candida parapolityca*, y *Candida antarctica*, una cepa de *Chromobacter*, en particular *Chromobacter viscosum*, una cepa de *Coprinus*, en particular *Coprinus cinerius*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, y *Fusarium roseum culmorum*, una cepa de *Geotricum*, en particular *Geotricum penicillatum*, una cepa de *Hansenula*, en particular *Hansenula anomala*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola brevispora*, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, y *Humicola insolens*, una cepa de *Hyphozyma*, una cepa de *Lactobacillus*, en particular *Lactobacillus curvatus*, una cepa de *Metarhizium*, una cepa de *Mucor*, una cepa de *Paecilomyces*, una cepa de *Penicillium*, en particular *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum* y *Penicillium expansum*, una cepa de *Pseudomonas* en particular *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia* (syn. *Burkholderia cepacia*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas mephitica lipolytica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas plantari*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, y *Pseudomonas wisconsinensis*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Rhizomucor*, en particular *Rhizomucor miehei*, una cepa de *Rhizopus*, en particular *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus microsporus* y *Rhizopus nodosus*, una cepa de *Rhodospiridium*, en particular *Rhodospiridium toruloides*, una cepa de *Rhodotorula*, en particular *Rhodotorula glutinis*, una cepa de *Sporobolomyces*, en particular *Sporobolomyces shibatanus*, una cepa de *Thermomyces*, en particular *Thermomyces*

lanuginosus (precedentemente *Humicola lanuginosa*), una cepa de *Thiarosporella*, en particular *Thiarosporella phaseolina*, una cepa de *Trichoderma*, en particular *Trichoderma harzianum*, y *Trichoderma reesei*, y/o una cepa de *Verticillium*.

5 [0065] En una forma de realización preferida, la enzima lipolítica es derivada de una cepa de *Aspergillus*, una cepa de *Achromobacter*, una cepa de *Bacillus*, una cepa de *Candida*, una cepa de *Chromobacter*, una cepa de *Fusarium*, una cepa de *Humicola*, una cepa de *Hyphozyma*, una cepa de *Pseudomonas*, una cepa de *Rhizomucor*, una cepa de *Rhizopus*, o una cepa de *Thermomyces*.

10 [0066] En formas de realización más preferidas, la enzima lipolítica es una lipasa. Lipasas se pueden aplicar aquí por su capacidad para modificar la estructura y composición de aceites y grasas de triglicéridos en los medios de fermentación (incluyendo levadura de fermentación), por ejemplo, resultando de un sustrato de maíz. Lipasas catalizan diferentes tipos de conversiones de triglicérido, tal como hidrólisis, esterificación y transesterificación. Lipasas adecuadas incluyen, lipasas ácidas, básicas y neutras, como son bien conocidas en la técnica, aunque las lipasas ácidas (tal como, por ejemplo, la lipasa G AMANO 50, disponible por Amano) parecen ser más eficaces a concentraciones inferiores de lipasa en comparación con lipasas básicas o bien neutras. Las lipasas preferidas para usar en la presente invención incluyen lipasa de *Candida antarctica* y lipasa de *Candida cylindracea*. Lipasas más preferidas son lipasas purificadas tales como lipasa de *Candida antarctica* (lipasa A), lipasa de *Candida antarctica* (lipasa B), lipasa de *Candida cylindracea*, y lipasa de *Penicillium camembertii*.

20 [0067] La lipasa es descrita en EP 258,068-A o puede ser una variante de lipasa tal como un variante descrita en WO 00/60063 o WO 00/32758 que se incorpora por la presente por referencia. Lipasas comerciales preferidas incluyen LECITASE™, LIPOLASE™, LIPEX™ y NOVOZYM® 735 (disponible por Novozymes A/S, Dinamarca) y G AMANO™ 50 (disponible por Amano).

25 [0068] Lipasas son preferiblemente adicionadas en cantidades de aproximadamente 1 a 400 LU/g DS, preferiblemente 1 a 10 LU/g DS, y de forma más preferible 1 a 5 LU/g DS.

30 [0069] En otra forma de realización preferida de la presente invención, al menos una esterasa es una cutinasa. Las cutinasas son enzimas que son capaces de degradar cutina. La cutinasa se puede derivar de cualquier fuente. En una forma de realización preferida, la cutinasa es derivada de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambucium*, una cepa de *Helminthosporium*, en particular *Helminthosporium sativum*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola insolens*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina*, o *Pseudomonas putida*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Streptomyces*, en particular *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular *Ulocladium consortiale*. En una forma de realización más preferida la cutinasa es derivada de una cepa de *Humicola insolens*, en particular la cepa *Humicola insolens* DSM 1800. Cutinasa de *Humicola insolens* es descrita en WO 96/13580 que es incorporada por la presente por referencia. La cutinasa puede ser una variante tal como una de las variantes descritas en WO 00/34450 y WO 01/92502 que es incorporada por la presente por referencia. Variantes de cutinasa preferidas incluyen variantes catalogadas en el ejemplo 2 de WO 01/92502 que son incorporadas específicamente por la presente por referencia. Una cantidad eficaz de cutinasa es entre 0.01 y 400 LU/g DS, preferiblemente de aproximadamente 0.1 a 100 LU/g DS, de forma más preferible, 1 a 50 LU/g DS. Otra optimización de la cantidad de cutinasa puede de aquí en adelante ser obtenida utilizando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

45 [0070] En otra forma de realización preferida, al menos una esterasa es una fosfolipasa. Como se utiliza en este caso, el término fosfolipasa es una enzima que tiene actividad hacia fosfolípidos. Fosfolípidos, tales como lecitina o fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en una posición externa (sn-1) y media (sn-2) y esterificados con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, sucesivamente, se puede esterificar a un alcohol amino. Fosfolipasas son enzimas que participan en la hidrólisis de fosfolípidos. Diferentes tipos de actividad fosfolipásica pueden ser distinguidos, incluyendo fosfolipasas A₁ y A₂ que hidrolizan un grupo de acilo graso (en la posición sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que puede hidrolizar el grupo acilo graso restante en el lisofosfolípido. Fosfolipasa C y fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacil glicerol o ácido fosfatídico respectivamente.

55 [0071] El término fosfolipasa incluye enzimas con actividad de fosfolipasa, por ejemplo, fosfolipasa A (A₁ o A₂), actividad de fosfolipasa B, actividad de fosfolipasa C o actividad de fosfolipasa D. El término "fosfolipasa A" usado aquí en relación con una enzima de la invención se destina a cubrir una enzima con actividad de fosfolipasa A₁ y/o fosfolipasa A₂. La actividad de fosfolipasa se puede proporcionar por enzimas que tienen otras actividades también, tal como, por ejemplo, una lipasa con actividad de fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa puede, por ejemplo, ser de una lipasa con actividad de fosfolipasa lateral. En otras formas de realización de la invención la actividad enzimática de fosfolipasa está provista por una enzima con esencialmente solo actividad de fosfolipasa y donde la actividad enzimática de fosfolipasa no es una actividad secundaria.

65 [0072] La fosfolipasa puede ser de cualquier origen, por ejemplo, de origen de animal (tal como, por ejemplo, mamífero), por ejemplo, de páncreas (por ejemplo, páncreas bovino o porcino), o veneno de serpiente o veneno de abeja.

Alternativamente, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo, de hongos filamentosos, levadura o bacterias, tal como el género o especie *Aspergillus*, por ejemplo, *A. niger* *Dictyostelium*, por ejemplo, *D. discoideum*; *Mucor*, por ejemplo, *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo, *R. pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo, *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, por ejemplo, *S. libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo, *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo, *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo, *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, por ejemplo, *C. freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo, *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo, *K. pneumoniae*; *Proteus*, por ejemplo, *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo, *P. stuartii*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *S. violeceoruber* *Yersinia*, por ejemplo, *Y. Enterocolitica*. Así, la fosfolipasa puede ser fúngica, por ejemplo, de la clase *Pyrenomycetes*, tal como el género *fusarium*, tal como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o una cepa de *F. oxysporum*. La fosfolipasa también puede ser de una cepa de hongo filamentosos en el género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. Fosfolipasas comerciales preferidas incluyen LECITASE™ y LECITASE™ ULTRA (disponibles por Novozymes A/S, Dinamarca).

[0073] Una cantidad eficaz de fosfolipasa está entre 0,01 y 400 LU/g DS, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 100 LU/g DS, de forma más preferible, 1 a 50 LU/g DS. Otra optimización de la cantidad de fosfolipasa puede de aquí en adelante ser obtenida utilizando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Enzimas oxidantes de ácidos grasos

[0074] El término "enzima oxidante de ácidos grasos" significa al menos una de tales enzimas.

[0075] En el presente contexto, una "enzima oxidante de ácidos grasos" es una enzima que hidroliza el sustrato ácido linoleico de forma más eficaz que el sustrato siringaldazina. "De forma más eficaz" significa con una velocidad de reacción más alta. Esto se puede evaluar utilizando el método descrito en el ejemplo 2 de WO 03/035972 (incorporado por la presente por referencia), y calculando la diferencia entre (1) aumento de absorbancia por minuto en el sustrato de ácido linoleico (absorbancia a 234 nm), y (2) aumento de absorbancia por minuto en el sustrato de siringaldazina (absorbancia a 530 nm), es decir, por cálculo de la diferencia de velocidad de reacción (RRD) = $(d(A_{234})/dt - d(A_{530})/dt)$. Si la RRD está por encima de cero, la enzima en cuestión se califica como una enzima oxidante de ácido graso tal y como se define aquí. Si la RRD es cero, o bajo cero la enzima en cuestión no es una enzima oxidante de ácido graso.

[0076] En formas de realización particulares, la RRD es al menos 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, o al menos 0,25 unidades/minuto de absorbancia.

[0077] En una forma de realización particular las enzimas son bien definidas. Además, para el método del ejemplo 2 de WO 03/035972 la dosificación enzimática se ajusta para obtener un aumento de absorbancia máxima por minuto a 234 nm, o a 530 nm. En formas de realización particulares, el aumento de absorbancia máxima está en la gama de 0.05-0.50, 0.07-0.4, 0.08-0.3, 0.09-0.2; o 0.10-0.25 unidades de absorbancia por min. La dosificación enzimática puede por ejemplo estar en la gama de 0.01-20, 0.05-15; o 0.10-10 mg de proteína enzimática por ml.

[0078] En la alternativa, una "enzima oxidante de ácidos grasos" se puede definir como una enzima capaz de oxidar ácidos grasos insaturados de forma más eficaz que la siringaldazina. La actividad de la enzima podría ser comparada en una disposición de oxímetro estándar como se describe en el ejemplo 1 de la presente solicitud a pH 6 y 30°C incluyendo bien siringaldazina o ácido linoleico como sustratos.

[0079] En una forma de realización particular, la enzima oxidante de ácido graso es definida como una enzima clasificada como EC 1.11.1.3, o como EC 1.13.11.-. EC 1.13.11.- significa cualquiera de sus sub-clases, actualmente cuarenta y nueve: EC 1.13.11.1-EC 1.13.11.49. EC 1.11.1.3 es designada peroxidasa de ácido graso, y EC 1.13.11.- es designada oxigenasas que actúan en donantes únicos con incorporación de dos átomos de oxígeno.

[0080] En otra forma de realización particular, la enzima EC 1.13.11.- se clasifica como EC 1.13.11.12, EC 1.13.11.31, EC 1.13.11.33, EC 1.13.11.34, EC 1.13.11.40, EC 1.13.11.44 o EC 1.13.11.45, designada lipoxigenasa, araquidonato 12-lipoxigenasa, araquidonato 15-lipoxigenasa, araquidonato 5-lipoxigenasa, araquidonato 8-lipoxigenasa, linoleato diol sintasa, y linoleato 11-lipoxigenasa, respectivamente).

[0081] Ejemplos de cantidades eficaces de enzima oxidante de ácidos grasos son de 0,001 a 400 U/g DS (sólidos secos). Preferiblemente, la enzima oxidante de ácidos grasos se usa en una cantidad de 0.01 a 100 U/g DS, de forma más preferible 0.05 a 50 U/g DS, e incluso de forma más preferible 0.1 a 20 U/g DS. Otra optimización de la cantidad de enzima oxidante de ácidos grasos puede de aquí en adelante ser obtenida utilizando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Lipoxigenasa

[0082] En una forma de realización preferida, la enzima oxidante de ácidos grasos es una lipoxigenasa (LOX),

clasificada como EC 1.13.11.12, que es una enzima que cataliza la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente cis,cis-1,4-dienos, por ejemplo, ácido linoleico y produce un hidroperóxido. Pero también otros sustratos pueden ser oxidados, por ejemplo, ácidos grasos monoinsaturados.

5 [0083] Lipoxigenasas microbianas se pueden derivar de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pyricularia oryzae*, y cepas de *Geotrichum*. La preparación de una lipoxigenasa derivada de *Gaeumannomyces graminis* se describe en los ejemplos 3-4 de WO 02/20730. La expresión en *Aspergillus oryzae* de una lipoxigenasa derivada de *Magnaporthe salvinii* se describe en el Ejemplo 2 de WO 02/086114, y esta enzima se puede purificar utilizando métodos estándares, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4 de WO 02/20730.

[0084] Lipoxigenasa (LOX) también puede ser extraída de semillas vegetales, tal como semilla de soja, guisante, garbanzo, y alubias. Alternativamente, la lipoxigenasa se puede obtener de células mamíferas, por ejemplo, reticulocitos de conejo.

15 [0085] La actividad de lipoxigenasa se puede determinar como se describe en la sección "Materiales y Métodos".

[0086] Ejemplos de cantidades eficaces de lipoxigenasa (LOX) son de 0,001 a 400 U/g DS (sólidos secos). Preferiblemente, la lipoxigenasa se usa en una cantidad de 0.01 a 100 U/g DS, de forma más preferible 0.05 a 50 U/g DS, e incluso de forma más preferible 0.1 a 20 U/g DS. Otra optimización de la cantidad de lipoxigenasa puede de aquí en adelante ser obtenida utilizando procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Enzima generadora de fuente de carbohidratos

25 [0087] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye glucoamilasas (siendo generadoras de glucosa), beta-amilasas y amilasas maltogénicas (siendo generadoras de maltosa). Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de proveer energía al microorganismo(s) de fermentación usado en un proceso de la invención para producir etanol y/o puede convertirse directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede consistir en mezclas de enzimas que caen en la definición. Mezclas especialmente contempladas son las 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 actividad de alfa-amilasa ácida fúngica (AFAU) por actividad de glucoamilasa (AGU) (AFAU por AGU) puede en una forma de realización de la invención ser al menos 0.1, en particular al menos 0.16, tal como en la gama de 0.12 a 0.50.

30 [0088] Ejemplos de glucoamilasas contempladas, alfa-amilasas y beta-amilasas se exponen en las secciones más abajo.

[0089] Debe entenderse que las enzimas usadas según la invención deberían ser adicionadas en cantidades eficaces.

40 Glucoamilasas

[0090] Una glucoamilasa usada según la invención se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada de un microorganismo o una planta. Glucoamilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico, seleccionadas del grupo consistente en las glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097- 1102), o variantes han de la misma, tal como se describe en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* (WO 84/02921), *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de la misma.

50 [0091] Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes para mejorar la termoestabilidad: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Eng. 9,499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Engng. 8,575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301,275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35,8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Engng. 10,1199-1204. Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (ver Patente estadounidense nº 4,727,026 y (Nagasaka, Y. Et al. (1998) Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol Biotechnol 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular, derivados de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente US No. Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente US nº 4,587,215). Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

60 [0092] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden 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.).

65 [0093] Glucoamilasas pueden en una forma de realización ser adicionadas en una cantidad de 0,02-20 AGU/g DS,

preferiblemente 0,1-10 AGU/g DS, tal como 2 AGU/g DS.

Beta-amilasas

5 [0094] Al menos según la invención la beta-amilasa (E.C 3.2.1.2) es el nombre generalmente dado a amilasas maltogénicas exo-actuadoras, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en la amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados. Unidades de maltosa son sucesivamente eliminados de las extremidades de cadena no reductoras en una manera gradual hasta que la molécula es degradada o, en el caso de amilopectina, hasta que se alcanza un punto de derivación. La maltosa liberada tiene la configuración beta anomérica, de ahí el nombre beta-amilasa.

10 [0095] Beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarti y C.T. Kelly, Progress in Industrial Microbiology, vol. 15, págs. 112-115, 1979). Estas beta-amilasas se caracterizan por tener temperaturas óptimas en la gama de 40°C a 65°C y pH óptimo en la gama de 4.5 a 7. Una beta-amilasa disponible comercialmente de cebada es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EEUU.

Producción de enzimas

20 [0096] Las enzimas referenciadas aquí se pueden derivar u obtener de cualquier origen adecuado, incluyendo origen bacteriano, fúngico, levadura o mamífero. El término "derivado" significa en este contexto que la enzima puede haber sido aislada de un organismo donde está presente originalmente, es decir, la identidad de la secuencia de aminoácidos de la enzima son idénticas a una enzima nativa. El término "derivado" también significa que las enzimas pueden haber sido producidas de forma recombinante en un organismo huésped, la enzima producida recombinantemente con bien una identidad idéntica a una enzima nativa o con una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, teniendo uno o varios aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida de recombinación que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácidos nucleicos conocidos en la técnica. Dentro del significado de una enzima nativa están incluidas variantes naturales. Además, el término "derivado" incluye enzimas producidas sintéticamente por, por ejemplo, síntesis peptídica. El término "derivado" también abarca enzimas que han sido modificadas por ejemplo, por glicosilación, fosforilación, o por otra modificación química, sea in vivo o in vitro. El término "obtenido" en este contexto se refiere a que la enzima tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una enzima nativa. El término abarca una enzima que ha sido aislada de un organismo donde esta está presente originalmente, o uno donde ha sido expresada de forma recombinante en el mismo tipo de organismo u otro, o enzimas producidas sintéticamente por, por ejemplo, síntesis peptídica. Con respecto a las enzimas producidas de forma recombinante los términos "obtenido" y "derivado" se refieren a la identidad de la enzima y no a la identidad del organismo huésped donde es producida de forma recombinante.

35 [0097] Las enzimas también puede ser purificadas. El término "purificado" como se utiliza en este caso cubre enzimas libres de otros componentes del organismo del que derivan. El término "purificado" también cubre enzimas libres de componentes del organismo nativo del que se obtienen. Las enzimas pueden ser purificadas, con cantidades solo menores de otras proteínas que están presentes. La expresión "otras proteínas" se refieren en particular a otras enzimas. El término "purificado" como se utiliza en este caso también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente otras proteínas y más particularmente otras enzimas presentes en la célula de origen de la enzima de la invención. La enzima puede ser "sustancialmente pura," es decir, libre de otros componentes del organismo donde se produce, es decir, por ejemplo, un organismo huésped para enzimas producidas de forma recombinante. En la forma de realización preferida, las enzimas son al menos 75% (p/p) puras, de forma más preferible al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% puras. En otra forma de realización preferida, la enzima es 100% pura.

50 [0098] Las enzimas usadas según la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para usar en los procesos descritos aquí, tal como, por ejemplo, en forma de un polvo seco o granulado, un granulado no polvoriento, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Granulados se pueden producir, por ejemplo, como se describe en las patentes de EEUU Nos. 4,106,991 y 4,661,452, y pueden opcionalmente ser recubiertos por el proceso conocido en la técnica. Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tal como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, ácido láctico u otro ácido orgánico según proceso establecido. Enzimas protegidas se pueden preparar según el proceso descrito en EP 238, 216.

60 [0099] Aunque no se menciona específicamente en el contexto de un proceso de la invención, debe entenderse que la(s) enzima(s) o agente(s) es(son) usado(s) en una "cantidad efectiva".

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas:

65 [0100] Alfa-amilasa A: variante de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las siguientes mutaciones: I181*+G182*+N193F descrita en la patente de EEUU nº 6,187,576 y disponible bajo petición de Novozymes A/S,

Dinamarca.

[0101] Amilasa maltogénica A: amilasa maltogénica derivada de la cepa NCIB 11837 de *Bacillus stearothermophilus* descrita en la patente de EEUU nº 4,598,048 y disponible bajo petición de Novozymes A/S, Dinamarca.

Solución madre para método de yodo:

[0102] 0,1 N I₂
disolver 1.3 g de I₂ y 2.0 g de KI en 100 mL de agua DI

Métodos:

Determinación de homología (identidad)

[0103] El término "homología" de polipéptido significa el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos. La homología puede ser determinada adecuadamente por programas informáticos conocidos en la técnica, tal como, GAP proporcionado en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Versión 8, Agosto 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453. Los siguientes ajustes para comparación de secuencia polipeptídica son usados: penalización de creación de GAP de 3.0 y penalización de extensión de GAP de 0.1.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0104] La actividad amilolítica se puede determinar usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida mezclando muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, un color azul negruzco es formado, pero durante la descomposición del almidón, el color azul se vuelve más débil y gradualmente se vuelve de color marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio de color.

[0105] Una kilo Novo unidad de amilasa alfa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándares (es decir, a 37°C +/- 0,05, 0,0003 M Ca²⁺; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

[0106] Una carpeta EB-SM-0009,02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible contra pedido a Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta está incluida en la presente por referencia.

Determinación de actividad FAU

[0107] Una unidad de alfa-amilasa fúngica (FAU) es definida como la cantidad de enzima, que descompone 5,26 g de almidón (Merck Amylum soluble Erg. B.6, lote 9947275) por hora con base en las siguientes condiciones estándares:

Sustrato:	Almidón soluble
Temperatura	37°C
pH	4.7
Tiempo de reacción	7-20 Minutos

Determinación de actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0108] Actividad de alfa-amilasa ácida se mide en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica), que se determinan con respecto a una enzima estándar.

[0109] El estándar usado es AMG 300 L (de Novozymes A/S, Dinamarca, glucoamilasa G1 tipo salvaje de *Aspergillus niger*, también descrito en Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102) y WO 92/00381). La alfa amilasa neutra en esta AMG cae después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 semanas de aprox. 1 FAU/ml a por debajo de 0.05 FAU/ml.

[0110] La actividad de alfa-amilasa ácida en esta AMG estándar se determina de acuerdo con la siguiente descripción. En este método, 1 AFAU se define como la cantidad de enzima, que degrada 5.260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo condiciones estándares.

[0111] El yodo forma un complejo azul con almidón pero no con sus productos de degradación. La intensidad de color es por lo tanto directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa es determinada utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo condiciones analíticas especificadas.

Alfa-amilasa**Almidón + yodo**

→

Dextrinas + oligosacáridos**40°C, pH 2.5****Azul/violeta****t=23 seg.****Decoloración**

Condiciones estándares/condiciones de reacción: (por minuto)

5	Sustrato:	Almidón, aprox. 0.17 g/L
	Tampón	Citrato, aprox. 0.03 M
	Yodo (I ₂):	0.03 G/L
	CaCl ₂ :	1.85 MM
	pH:	2.50 ± 0.05
	Temperatura de incubación:	40°C
	Tiempo de reacción:	23 Segundos
10	Longitud de onda:	Lambda=590nm
	Concentración enzimática:	0.025 AFAU/mL
	Gama de trabajo de enzima:	0.01-0.04 AFAU/mL

15 [0112] Si se prefieren detalles adicionales estos se pueden encontrar en EB-SM-0259,02/01 disponible bajo petición por Novozymes A/S, Dinamarca, e incorporados por referencia.

Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

20 [0113] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida), que es un método absoluto. Una unidad de amilasa ácida (AAU) es la cantidad de enzima que convierte 1 g de almidón (100% de sustancia seca) por hora bajo condiciones estandarizadas en un producto con una transmisión a 620 nm después de la reacción con una solución de yodo de fuerza conocida igual a uno de una referencia de color.

Condiciones estándares/condiciones de reacción:

25	Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g DS/L.
	Tampón:	Citrato, aprox. 0.13 M, pH=4.2
	Solución de yodo:	40. 176 g yoduro potásico + 0.088 g yodo/L
	Agua corriente	15°-20°dH (dureza de grado alemán)
	pH:	4.2
30	Temperatura de incubación:	30°C
	Tiempo de reacción:	11 Minutos
	Longitud de onda:	620 Nm
	Concentración enzimática:	0.13-0.19 AAU/ml
35	Gama de trabajo de enzima:	0.13-0.19 AAU/ml

40 [0114] 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 por tratamiento de ácido clorhídrico diluido de almidón natural de modo que éste retiene la capacidad para colorear de azul con yodo. Detalles adicionales se pueden encontrar en EP 0140410B2, esta divulgación está incluida por la presente por referencia.

Actividad de glucoamilasa (AGI)

45 [0115] Glucoamilasa (equivalente a amilogucosidasa) convierte el almidón en glucosa. La cantidad de glucosa es determinada aquí por el método de glucosa-oxidasa para la determinación de la actividad. El método descrito en la sección 76-11 Starch-Glucoamylase Method with Subsequent Measurement of Glucose with Glucose Oxidase in "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol.1-2 AACC, de American Association of Cereal Chemists, (2000); ISBN: 1-891127-12-8.

50 [0116] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzima que formará 1 micromol de glucosa por minuto bajo las condiciones estándares del método.

Condiciones estándares/condiciones de reacción:

55	Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 16 g material seco/L.
	Tampón:	Acetato, aprox. 0.04 M, pH=4.3

ES 2 516 668 T3

pH: 4.3
Temperatura de incubación: 60°C
Tiempo de reacción: 15 Minutos
Terminación de la reacción: NaOH a una concentración de aproximadamente 0.2 g/L (pH 9)
5 Concentración enzimática: 0.15-0.55 AAU/ml

[0117] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico. Almidón Lintner se obtiene por tratamiento de ácido clorhídrico de diluido de almidón nativo de modo que éste retiene la capacidad para colorear de azul con yodo.

10 Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0118] La Novo unidad de glucoamilasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándares 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

[0119] Un sistema autoanalizador puede ser utilizado. Mutarotasa se añade al reactivo glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se gira en la beta-D-glucosa. Glucosa deshidrogenasa 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 de glucosa original.

incubación AMG:	
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
Gama de trabajo de enzima:	0.5-4.0 AGU/mL
Reacción de color:	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0.21 MM
Tampón:	Fosfato 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

[0120] Una carpeta (EB-SM-0131,02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo petición por Novozymes A/S, Dinamarca.

25 Actividad de cutinasa (LU)

[0121] La actividad de cutinasa se determina como actividad lipolítica determinada usando tributirina como sustrato. Este método fue basado en la hidrólisis de tributirina por la enzima, y el consumo de álcali se registra como función de tiempo. Una unidad de lipasa (LU) es definida como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándares (es decir, a 30°C; pH 7.0; con goma arábiga como emulsionante y tributirina como sustrato) libera 1 micro mol de ácido butírico titulable por minuto. Una carpeta AF 95/5 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo petición por Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta está incluida en la presente por referencia.

35 Actividad de lipoxigenasa

[0122] Actividad de lipoxigenasa se determina espectrofotométricamente a 25°C por control de la formación de hidroperóxidos. Para el análisis estándar, 10 micro litros de enzima se añaden a una cubeta de cuarzo de 1 ml que contienen 980 micro litros 25 mM tampón de fosfato sódico (pH 7.0) y 10 micro litros de solución de sustrato (10 mM ácido linoleico disperso con 0.2%(v/v) Tween20 (no debería ser mantenido durante periodos de tiempo extendidos)). La enzima es típicamente diluida suficientemente para asegurar una rotación circulatoria de como máximo el 10% del sustrato adicionado en el primer minuto. La absorbancia a 234 nm es seguida y el índice es estimado desde la parte lineal de la curva. Los hidro(pero)xi ácidos grasos cis-trans-conjugados se presume que tienen un coeficiente de extinción molecular de 23,000 M⁻¹ cm⁻¹.

45 Método de yodo estándar

[0123]

hervir una alícuota pequeña (10-20 mLs) de material licuado en una probeta durante varios minutos
añadir 10-12 gotas de la solución de yodo
mezclar y dejar la muestra reposar en agua helada durante aproximadamente 10 minutos

5 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1

Licuación con una alfa-amilasa y una amilasa maltogénica

10

[0124] Alfa-amilasa A y amilasa maltogénica A fueron adicionadas a un compuesto acuoso de maíz triturado molido seco (30% sólidos), calentada a 85°C y mantenida durante 2 horas. Los efectos físicos de este sistema fueron comparados con la licuación hecha con solo alfa-amilasa A.

15

[0125] La trituración hecha con alfa-amilasa A y amilasa maltogénica A mostró menos almidón retrogradado usando el método de yodo estándar además de ser menos viscosa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para licuar material que contiene almidón que comprende tratar dicho material que contiene almidón con al menos una alfa-amilasa y una amilasa maltogénica (E.C. 3.2.1.133).
2. Proceso según la reivindicación 1, donde la licuación se realiza en varias fases, tal como tres fases, preferiblemente una primera fase a una temperatura en la gama de 80 a 105°C, una segunda fase a una temperatura en la gama entre 65 a 95°C, y una tercera fase a una temperatura entre 40-75°C.
- 10 3. Proceso según la reivindicación 2, donde la licuación consistente en varias fases se realiza en las siguientes fases de temperatura: una primera fase: 80-95°C, una segunda fase: 75-85°C, y tercera fase: 60 a 70°C.
4. Proceso de las reivindicaciones 2 o 3, donde el tiempo de mantenimiento para la fase primera es 10 a 90 minutos, 30-120 minutos para la segunda fase y 30-120 minutos para la tercera fase.
- 15 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el material que contiene almidón se trata con una esterasa y una amilasa maltogénica y una alfa-amilasa.
- 20 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el material que contiene almidón es granos enteros, preferiblemente maíz, trigo, cebada, o milo.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la amilasa o amilasa maltogénica es de origen bacteriano, preferiblemente una cepa del género *Bacillus*, especialmente *Bacillus stearothermophilus*.
- 25 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la esterasa es una lipasa, fosfolipasa, o una cutinasa, o una combinación de las mismas.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, además donde la licuación se realiza en presencia de una enzima oxidante de ácidos grasos, preferiblemente una lipoxigenasa.
- 30 10. Proceso para producir un producto de fermentación, que comprende
- (a) reducir el tamaño de material que contiene almidón;
- 35 (b) licuar el producto de la fase (a) con al menos una alfa-amilasa y al menos una amilasa maltogénica tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
- (c) sacarificar el material licuado obtenido en la fase (b) con una enzima generadora de fuente de carbohidrato; y
- 40 (d) fermentar el material sacarificado usando un microorganismo fermentador.
11. Proceso según la reivindicación 10, donde las fases c) y d) se realizan como una fase simultánea de sacarificación y de fermentación (SSF).
- 45 12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, donde la enzima generadora de fuente de carbohidrato es una glucoamilasa o una alfa-amilasa de mezclas derivadas, preferiblemente en la mezcla de actividad de alfa-amilasa ácida fúngica (AFAU) por actividad de glucoamilasa (AGU) (AFAU por AGU) de al menos 0.1, en particular al menos 0.16, tal como en la gama de 0.12 a 0.50.
- 50 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende además destilar el material fermentado.
14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 10-13, donde dicho microorganismo fermentador es levadura.
- 55 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 10-14, donde el producto de fermentación es etanol.