

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 526 116**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/30 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
C12N 9/62 (2006.01)
C12Q 1/40 (2006.01)
C12N 9/58 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2008 E 08840170 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2201108**

(54) Título: **Mezclas de enzimas para fermentación**

(30) Prioridad:

18.10.2007 US 981035 P

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

07.01.2015

(73) Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 PAGE MILL ROAD
PALO ALTO, CA 94304-1013, US**

(72) Inventor/es:

**LANTERO, ORESTE J.;
SHETTY, JAYARAMA K. y
BRENEMAN, SUZANNE**

(74) Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 526 116 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

Mezclas de enzimas para fermentación

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención hace referencia a una mezcla de enzimas que comprende una glucoamilasa, una alfa amilasa estable a los ácidos, y una proteasa fúngica ácida. La presente invención también hace referencia a 5 métodos para utilizar la mezcla de enzimas en procesos de conversión de almidón, por ejemplo, tales como para producir productos finales tales como etanol.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La fermentación industrial utiliza predominantemente glucosa como materia prima para la producción de 10 una gran cantidad de productos finales tales como enzimas, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, polialcoholes, productos farmacéuticos y otros productos bioquímicos. En muchas aplicaciones la glucosa se produce a partir de la conversión enzimática de sustratos que comprenden almidón y celulosa (por ejemplo, granos de cereal molido enteros). El almidón, que comprende dos fracciones de polisacáridos, amilosa y amilopectina, se deposita en células vegetales como partículas granuladas. La estructura cristalina parcial de 15 estos gránulos confiere insolubilidad en agua fría, y, como resultado, la solubilización de los gránulos de almidón en agua generalmente requiere energía calorífica para romper la estructura cristalina del gránulo. Se han empleado numerosos procesos para la solubilización del almidón y estos incluyen el calentamiento directo e indirecto de sustratos que comprenden almidón granulado. (Véase, por ejemplo, *STARCH CHEMISTRY AND TECHNOLOGY*, Eds R.L. Whistler *et al.*, 2^a Ed., 1984 Academic Press Inc., Orlando FL y *STARCH CONVERSION TECHNOLOGY*, Eds G.M.A. Van Beynum *et al.*, Food Science and Technology Series 1985 20 Marcel Dekker Inc. NY).

[0003] El procesamiento de almidón a glucosa normalmente consiste en dos etapas, y estas etapas incluyen la licuefacción del almidón y la sacarificación del almidón licuificado. Etapas adicionales pueden incluir (a) la purificación y la isomerización cuando el producto final deseado es una fructosa o dextrosa purificada o (b) la fermentación y la destilación cuando el producto final deseado es, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, etanol). 25

[0004] Un objetivo del proceso de licuefacción del almidón es convertir una suspensión de gránulos de polímero de almidón en una solución de dextrinas de longitud de cadena más corta de baja viscosidad. Ésta es una etapa importante para manipular de forma conveniente el equipo industrial utilizado en los procesos de conversión del almidón. Normalmente, el almidón se licuifica utilizando temperatura elevada y bioconversión enzimática. Por 30 ejemplo, un proceso de licuefacción enzimática común implica añadir una alfa amilasa bacteriana termoestable (por ejemplo, SPEZYME® PRIME y SPEZYME® FRED, SPEZYME® ETHYL (Danisco U.S., Inc, Genencor Division) o TERMAMYL SC, TERMAMYL SUPRA o TERMANYL 120L (Novozymes)) a una suspensión que comprende un sustrato que incluye almidón y ajustar el pH a entre 5.5 y 6.5 y la temperatura a más de 90 °C. El almidón se licuifica y después se somete a enzimas de sacarificación. Normalmente, la sacarificación tiene lugar 35 en presencia de enzimas de glucoamilasa tales como glucoamilasa de *Aspergillus niger* (por ejemplo, OPTIDEX L-400 (Genencor International Inc.)) con un pH más ácido que el pH de la etapa de licuefacción.

[0005] US 2006/003408 describe alfa amilasas estables a los ácidos que tienen actividad de hidrólisis de almidón granulado y composiciones enzimáticas.

[0006] WO 2004/080923 describe procesos para la producción de un producto de alcohol a partir de almidón granulado que comprende un pretratamiento a una temperatura elevada por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granular seguido de la sacarificación y fermentación simultánea, y opcionalmente de la recuperación del etanol. 40

[0007] WO 02/074895 describe un proceso para producir un producto de fermentación, en concreto etanol; una composición que comprende al menos una actividad enzimática que genera una fuente de carbohidratos y al menos una actividad de alfa-amilasa y/o una o varias enzimas de degradación de la pared celular de la levadura, tales como una preparación de enzimas a partir de *Trichoderma* y la utilización de la composición para la producción de un producto de sacarificación y/o fermentación, en concreto, etanol. 45

[0008] WO 2006/060062 describe la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* y homólogos de la misma. Las glucoamilasas son útiles para la producción de glucosa y otros productos finales a partir del almidón. Las glucoamilasas son adecuadas para utilizarse en diferentes procesos y son especialmente adecuadas para utilizarse bajo condiciones de procesamiento de almidón convencional a alta temperatura y bajo condiciones de procesamiento de almidón sin cocción o a baja temperatura. 50

[0009] WO 2006/073839 describe proteasas fúngicas ácidas, designadas proteasas de la familia NSR24, proteasas de la familia NSP25 y proteasas PepA; polipéptidos de proteasa de las familias NSP24 y NSP25; 55 también se describen composiciones que incluyen dichas proteasas y usos de las mismas.

[0010] Existen un número de variaciones para la licuefacción y la sacarificación de un sustrato de almidón. No obstante, se necesitan medios más eficientes para la licuefacción, la sacarificación y la fermentación del almidón.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0011] La presente invención se refiere a una composición de mezcla de enzimas como se define en la reivindicación 1.

[0012] La composición de mezcla de enzimas es útil para producir productos finales a partir de azúcares fermentables, especialmente para producir etanol a partir de un licuado. Una ventaja de la composición de mezcla de enzimas es que da como resultado una mayor cantidad de etanol en relación con la cantidad de etanol producida por la glucoamilasa sola bajo esencialmente las mismas condiciones. En un aspecto, el aumento es mayor que 0,5 % en relación con la GA sola, incluyendo un aumento mayor que 1,0 %, 1,5 %, 2 % y 2,5 %.

[0013] La glucoamilasa tiene al menos 95 % de identidad de secuencia, teniendo la glucoamilasa la secuencia de la SEQ ID Nº 1; y la proteasa fúngica ácida (AFP, por sus siglas en inglés) tiene al menos 95 % de identidad de secuencia, teniendo la AFP la secuencia de la SEQ ID Nº 14, y la alfa amilasa tiene al menos 95 % de identidad de secuencia, teniendo la AA la secuencia de la SEQ ID Nº 5. La relación de la glucoamilasa, la alfa amilasa estable a los ácidos y la proteasa fúngica ácida es la que se define en la reivindicación 1.

[0014] La composición de mezcla de enzimas incluye opcionalmente una o varias enzimas, tales como una segunda glucoamilasa, una segunda alfa amilasa, una celulasa, una hemicelulasa, una xilanasa, una segunda proteasa, una fitasa, una pululanasa, una beta amilasa, una lipasa, una cutinasa, una pectinasa, una betaglucanasa, una galactosidasa, una esterasa, una ciclodextrina transglicosiltransferasa, y combinaciones de las mismas.

[0015] La presente invención se refiere además a un método para producir productos finales tales como un alcohol a partir de azúcares fermentables. El método es el que se define en la reivindicación 7. El método también puede incluir una etapa de recuperación de los productos finales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] La Figura 1 muestra las concentraciones finales de alcohol obtenidas utilizando diferentes mezclas de enzimas durante la sacarificación/fermentación simultánea utilizando maíz molido entero que ha sido licuificado como se describe adicionalmente en el Ejemplo 2. El eje Y es el % de etanol (V/V), el eje X es como sigue: 1. TrGA, 0,25 GAU/gds (gramos de residuo seco) de maíz, 2. #1 + 0,05 SAPU AFP/gds de maíz, 3. #1 + 2,0 SSU de alfa amilasa/gds de maíz, 4. Nº 1 + 0,05 SAPU, AFP +2,0 SSU de alfa amilasa/gds de maíz.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

[0017] A menos que se defina de otra manera en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia al cual pertenece esta invención. Singleton, *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2^a ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Markham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, N.Y. (1991) proporcionan a un experto en la material el significado general de muchos de los términos utilizados en el presente documento. Aún así, algunos términos se definen a continuación con motivo de obtener claridad y facilidad de referencia.

[0018] "Alfa amilasas" son α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasas (E.C. 3.2.1.1) y son enzimas que escinden o hidrolizan enlaces α -1,4-glucosídicos internos en almidón (por ejemplo, amilopectina o polímeros de amilosa).

[0019] El término "por debajo de la temperatura de gelatinización" se refiere a una temperatura que es menor que la temperatura de gelatinización.

[0020] El término "DE" o "equivalente de dextrosa" es un estándar industrial para medir la concentración de azúcares reductores totales, calculada como D-glucosa en una base de peso seco. El almidón granulado no hidrolizado tiene un DE que es esencialmente 0 y la D-glucosa tiene un DE de 100.

[0021] "Dextrinas" son polímeros de glucosa de cadena corta (por ejemplo, de 2 a 10 unidades).

[0022] El término "residuos secos (ds, por sus siglas en inglés)" se refiere a los sólidos totales de una suspensión en % en una base de peso seco.

[0023] El término "producto final" se refiere a cualquier producto derivado de una fuente de carbono que se convierte enzimáticamente a partir de un sustrato fermentable. En algunos modos de realización preferidos, el producto final es un alcohol (por ejemplo, etanol).

- [0024] Como se utiliza en el presente documento, el término “productor de etanol” o “microorganismo productor de etanol” se refiere a un organismo de fermentación que es capaz de producir etanol a partir de un mono- u oligosacárido.
- 5 [0025] El término “azúcares fermentables” se refiere a cualquier azúcar capaz de ser fermentado por un organismo de fermentación. Los azúcares fermentables incluyen oligosacáridos y dextrinas.
- 10 [0026] Un “azúcar fermentable” se refiere a mono- o disacáridos, que pueden ser convertidos en un proceso de fermentación por un microorganismo en contacto con el azúcar fermentable para producir un producto final. En algunos modos de realización, el microorganismo metaboliza el azúcar fermentable y en otros modos de realización la expresión y/o la secreción de enzimas por el microorganismo consigue la conversión deseada del azúcar fermentable.
- 15 [0027] El término “fermentación” se refiere a la rotura enzimática y anaeróbica de sustancias orgánicas por microorganismos para producir compuestos orgánicos más simples. Aunque la fermentación se produce bajo condiciones anaeróbicas, no se pretende que el término se limite únicamente a condiciones estrictamente anaeróbicas, puesto que la fermentación también se produce en presencia de oxígeno.
- 20 [0028] Como se utiliza en el presente documento, el término “organismo de fermentación” se refiere a cualquier microorganismo o célula que es adecuado para utilizarse en la fermentación para producir directa o indirectamente un producto final.
- [0029] El término “equivalente funcional” significa que una enzima tiene las mismas características funcionales enzimáticas de las enzimas naturales y se deriva de una enzima natural.
- 25 [0030] El término “gelatinización” significa solubilización de una molécula de almidón, generalmente por cocción, para formar una suspensión viscosa.
- [0031] El término “temperatura de gelatinización” se refiere a la temperatura más baja a la que empieza la gelatinización de un sustrato que contiene almidón. La temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y puede variar dependiendo de factores tales como las especies vegetales y las condiciones ambientales y de crecimiento.
- 30 [0032] El término “almidón granulado” significa almidón crudo, que es almidón que no ha sido sometido a temperaturas de gelatinización.
- [0033] Los términos “enzima que hidroliza almidón granulado (GSH, por sus siglas en inglés)” y “enzimas que tienen actividad que hidroliza almidón granulado” se refieren a enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar almidón en forma de gránulos.
- 35 [0034] El término “% de homología” se utiliza indistintamente en el presente documento con el término “% de identidad”. Ejemplos de programas informáticos que se pueden utilizar para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin carácter limitativo, el conjunto de programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, y están a disposición del público en Internet (véase, por ejemplo, la página BLAST del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica). Véase también Altschul, *et al.*, 1990 y Altschul, *et al.*, 1997.
- 40 [0035] Las búsquedas de secuencias se llevan a cabo normalmente utilizando el programa BLASTN cuando se evalúa una secuencia de ácido nucleico dada en relación con las secuencias de ácido nucleico de las secuencias de ADN de la base de datos GenBank y otras bases de datos públicas. El programa BLASTX se prefiere para buscar secuencias de ácidos nucleicos que se han traducido en todos los marcos de lectura y comparado con las secuencias de aminoácidos de las secuencias de proteínas de la base de datos GenBank y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTN como BLASTX funcionan utilizando parámetros por defecto de una penalización de espacio abierto de 11,0, y una penalización de espacio extendido de 1,0, y utilizan la matriz BLOSUM-62. (Véase, por ejemplo, Altschul, *et al.*, 1997.)
- 45 [0036] Un “licuado”, también denominado un sustrato de almidón soluble o un sustrato licuificado, es una suspensión de grano molido entero que contiene un alfa amilasa termoestable que ha sido sometida a licuefacción a temperatura elevada dando como resultado un sustrato soluble para la sacarificación y fermentación o SSF (SSF = sacarificación y fermentación simultánea). Temperatura elevada es una temperatura mayor que la temperatura de gelatinización del grano.
- 50 [0037] “Licuefacción” o “licuificar” significa un proceso por el cual el almidón se convierte en dextrinas de cada más corta y menos viscosas.
- [0038] El término “molido” se utiliza en el presente documento para referirse a material vegetal que ha sido reducido en tamaño mediante, por ejemplo, molienda, trituración, fraccionamiento o cualquier otro medio de reducción de tamaño de partículas. La molienda incluye la molienda en seco o en húmedo. La “molienda en

seco" se refiere a la molienda del grano seco entero. La "molienda en húmedo" se refiere a un proceso por el que el grano se empapa (impregna) primero en agua para ablandarlo.

[0039] El término "oligosacáridos" se refiere a cualquier compuesto que tiene de 2 a 10 unidades de monosacáridos unidas en enlaces glicosídicos. Estos polímeros de cadena corta de azúcares simples incluyen dextrinas.

[0040] Como se utiliza en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, en caso necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los expertos en la materia conocen métodos para realizar el alineamiento de secuencia y determinar la identidad de secuencia, y se pueden realizar sin experimentación indebida, y se pueden obtener cálculos de valores de identidad con concisión. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 19 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York); y el programa ALIGN (Dayhoff (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5:Supl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.). Un número de algoritmos están disponibles para alinear secuencias y determinar la identidad de secuencia e incluir, por ejemplo, el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman, *et al.*, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; el algoritmo de homología local de Smith, *et al.*, (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; la búsqueda del método de similitud de Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444; el algoritmo Smith-Waterman (*Meth. Mol. Biol.* 70:173-187 (1997); y los algoritmos BLASTX y BLASTP, BLASTN, (véase, Altschul, *et al.*, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410). También están disponibles programas computarizados que utilizan estos algoritmos, e incluyen, pero sin carácter limitativo: el software ALIGN o Megalign (DNASTAR), o WU-BLAST-2 (Altschul, *et al.*, *Meth. Enzym.*, 266:460-480 (1996)); o GAP, BESTFIT, BLAST Altschul, *et al.*, *supra*, FASTA, y TFASTA, disponible en el paquete de Genetics Computing Group (GCG), Versión 8, Madison, Wis., EE.UU.; y CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif. Los expertos en la materia pueden determinar parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento sobre la longitud de las secuencias que se comparan. Preferiblemente, la identidad de secuencia se determina utilizando los parámetros por defecto que el programa determina. Específicamente, la identidad de secuencia se puede determinar por el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman (*Meth. Mol. Biol.* 70:173-187 (1997)) como se aplica en el programa MSPRCH (Oxford Molecular) utilizando una búsqueda de espacio afín con los siguientes parámetros de búsqueda: penalización de espacio abierto de 12, y penalización de extensión de espacio de 1. Preferiblemente, se pueden llevar a cabo comparaciones de aminoácidos emparejados utilizando el programa GAP del paquete de software del análisis de secuencias GCG de Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wis., empleando la matriz de sustitución de aminoácidos blosum62, con un peso de espacio de 12 y un peso de longitud de 2. Con respecto al alineamiento óptimo de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la variante de secuencia de aminoácido puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos eliminados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos y pueden ser 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Las correcciones para una mayor identidad de secuencia asociada con la inclusión de espacios en la secuencia de aminoácidos del derivado se pueden realizar asignando penalizaciones de espacio.

[0041] Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en el presente documento. En la presente descripción y reclamaciones se utilizan los códigos convencionales de una letra y de tres letras para residuos de aminoácidos. El código de tres letras para aminoácidos se define de conformidad con la Comisión conjunta de nomenclatura bioquímica (JCBN, por sus siglas en inglés) de la IUPAC-IUB. También se entiende que un polipéptido puede ser codificado por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

[0042] Se describen variantes de la invención con la siguiente nomenclatura: [residuo de aminoácido original/posición/residuo de aminoácido sustituido]. Por ejemplo, la sustitución de treorina (T) por alanina (A) en la posición 89 se representa como A89T. Cuando se sustituye más de un aminoácido en una posición dada, la sustitución se representa como, por ejemplo, 1) A89C, A89D o A89T; 2) A89C, D, o T o c) A89C/D/T. Cuando se identifica una posición adecuada para la sustitución en el presente documento sin sugerir un aminoácido específico, ha de entenderse que cualquier residuo de aminoácido se puede sustituir por el residuo de aminoácido presente en la posición.

[0043] Los términos "enzima de sacarificación" y "glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3)" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier enzima que es capaz de catalizar la liberación de D-glucosa a partir de extremos no reductores de almidón y oligo- y polisacáridos relacionados.

[0044] La expresión "sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés)" se refiere a un proceso en la producción productos finales en el que un organismo de fermentación, tal como un microorganismo

que produce etanol, y al menos una enzima, tal como una enzima de sacarificación, se combinan en la misma etapa del proceso en el mismo recipiente.

[0045] El término “suspensión” se refiere a una mezcla acuosa que comprende sólidos insolubles, (por ejemplo, almidón granulado).

5 [0046] Como se utiliza en el presente documento, el término “almidón” se refiere a cualquier material que comprende los carbohidratos de polisacáridos complejos de las plantas, es decir, amilosa y amilopectina con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, en la que x puede ser cualquier número.

10 [0047] El término “vinaza” significa la porción líquida de vinaza separada de los sólidos (por ejemplo, mediante cribado o centrifugación) que contiene partículas finas suspendidas y material disuelto. El término “backset” se utiliza generalmente para referirse a la vinaza reciclada.

[0048] El término “contenido total de azúcar” se refiere al contenido total de azúcar presente en una composición de almidón.

15 [0049] El término “variante” cuando se utiliza en referencia a una enzima (por ejemplo, una alfa amilasa, una glucoamilasa, una proteasa fúngica ácida, una fitasa o similar) significa una enzima derivada de una enzima producida naturalmente (natural) pero que tiene una sustitución, una inserción o una delección de uno o varios aminoácidos en comparación con la enzima producida de forma natural. El término incluye las formas híbridas de la enzima, donde, por ejemplo, la enzima puede tener un extremo C-terminal derivado de una *Bacillus sp.* (por ejemplo, *B. licheniformis*) y un extremo N-terminal derivado de una *Bacillus sp.* diferente (por ejemplo, *B. stearothermophilus*). Una variante puede tener una o varias propiedades alteradas en comparación con la enzima natural tales como, pero sin carácter limitativo, estabilidad térmica aumentada, estabilidad proteolítica aumentada, actividad específica aumentada, mayor especificidad de sustrato, mayor actividad en un intervalo de pH o combinaciones de las mismas.

20 [0050] El término “natural” como se utiliza en el presente documento se refiere a una enzima que se produce de forma natural (nativa) en una célula huésped.

25 Ejemplos de modos de realización

[0051] Los inventores han descubierto una mezcla de enzimas que comprende una alfa amilasa, una glucoamilasa y una proteasa fúngica ácida. Dicha composición es útil en un proceso de conversión de almidón durante la sacarificación y/o la sacarificación/fermentación. Utilizar tal composición proporciona ventajas con respecto a utilizar solo glucoamilasa en el proceso de conversión de almidón.

30 [0052] La presente invención se refiere a una composición tal como se define en la reivindicación 1. La presente invención también se refiere a la utilización de la composición tal como se define en la reivindicación 1 para producir productos finales deseados a partir de azúcares fermentables mediante un método tal como se define en la reivindicación 7, por ejemplo, para producir etanol a partir de un licuado. Una ventaja de la composición es que proporciona una mayor cantidad de etanol en relación con la cantidad de etanol producida esencialmente bajo las mismas condiciones por la glucoamilasa solo. En un aspecto, el aumento es mayor que 0,5 % en relación con la glucoamilasa solo, preferiblemente mayor que 1,0 %, 1,5 %, 2 % y 2,5 %.

Glucoamilasas

40 [0053] La glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3.) es una enzima que descompone los almidones y las dextrinas en glucosa. La glucoamilasa es una enzima de actuación exo; hidroliza enlaces alfa 1-4 y alfa 1-6 glucosídicos en almidón y libera glucosa.

[0054] Las glucoamilasas útiles pueden ser una glucoamilasa natural, una variante o un fragmento de la misma o una glucoamilasa híbrida que se deriva de, por ejemplo, un dominio catalítico de una fuente microbiana y un dominio de unión a almidón de otra fuente microbiana. Las siguientes glucoamilasas son ejemplos no limitantes de glucoamilasas que se pueden utilizar en el proceso que se describe en el presente documento.

45 [0055] Las glucoamilasas se pueden obtener de cepas de glucoamilasa G1 y G2 de *Aspergillus niger* (Boel *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3:1097 -1102; WO 92/00381, WO 00/04136 y la patente estadounidense 6 352 851); glucoamilasas de *Aspergillus awamori* (WO 84/02921); glucoamilasas de *Aspergillus oryzae* (Hata *et al.*, (1991) *Agric. Biol. Chem.* 55:941 - 949) y *Aspergillus shirousami*. (Véase Chen *et al.*, (1996) *Prot. Eng.* 9:499 - 505; Chen *et al.* (1995) *Prot. Eng.* 8:575-582; y Chen *et al.*, (1994) *Biochem J.* 302:275-281). *Talaromyces* tales como las derivadas de *T. emersonii*, *T. leycettanus*, *T. duponti* y *T. thermophilus* (WO 99/28488; la patente estadounidense Nº RE: 32.153; la patente estadounidense Nº 4 587 215); cepas de *Trichoderma*, tales como *T. reesei* y en concreto glucoamilasas que tienen al menos 80 %, 85 %, 90 % y 95 % de identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID Nº 4 descrita en la publicación de la patente estadounidense Nº 2006-0094080; cepas de *Rhizopus*, tales como *R. niveus* y *R. oryzae*; cepas de *Mucor* y cepas de *Humicola*, tales como *H. grisea* (véase, Boel *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3:1097-1102; WO 92/00381; WO 00/04136; Chen *et al.*, (1996) *Prot. Eng.* 9:499-505;

Taylor *et al.*, (1978) *Carbohydrate Res.* 61:301-308; la patente estadounidense 4 514 496; la patente estadounidense 4 092 434; la patente estadounidense 4 618 579; Jensen *et al.*, (1988) *Can. J. Microbiol.* 34:218 - 223 y la SEQ ID Nº 3 de WO 2005/052148). También es útil en el presente documento una glucoamilasa que tenga al menos 85 %, 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 3 de WO 05/052148. Otras glucoamilasas útiles presentes incluyen las obtenidas de *Athelia rolfsii* y variantes de las mismas (WO 04/111218).

[0056] Las enzimas que tienen actividad de glucoamilasa utilizadas comercialmente se producen, por ejemplo, de *Aspergillus niger* (nombre comercial DISTILLASE, OPTIDEX L-400 y G ZYME G990 4X de Genencor International Inc.) o de especie *Rhizopus* (nombre comercial CU.CONC de Shin Nihon Chemicals, Japón).

10 También la enzima digestiva comercial, nombre comercial GLUCZYME de Amano Pharmaceuticals, Japón (Takahashi *et al.*, (1985) *J. Biochem.* 98:663-671). Enzimas adicionales incluyen tres formas de glucoamilasa (E.C.3.2.1.3) de una *Rhizopus* sp., a saber "Gluc1" (MW 74 000), "Gluc2" (MW 58 600) y "Gluc3" (MW 61 400). También es útil la preparación de enzima GC480 (Genencor International Inc.).

15 **[0057]** Las glucoamilasas se pueden derivar de la expresión de proteínas heterólogas o endógenas de bacterias, plantas y fuentes fúngicas.

20 **[0058]** La Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID Nº 1) de una glucoamilasa de *Trichoderma reesei* que tiene 599 aminoácidos, el dominio catalítico (SEQ ID Nº 2) no está subrayado y se representa por las posiciones de residuos 1-453; la región de enlazador (SEQ ID Nº 3) está subrayada y se representa por las posiciones de residuos 454-491; y el dominio de unión a almidón SEQ ID Nº 4 está en negrita y se representa por las posiciones de residuos 492-599.

Tabla 1: Secuencia de proteína madura de glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA)
(SEQ ID Nº 1)

```

1   SVDDFISTET PIALNNLLCN VGPDGCRAGF TSAGAVIASP STIDPDYYYM
51  WTRDSALVFK NLIDRPTETY DAGLQRRIEQ YITAQVTLQQ LSNPSGSIAD
101 GSGLGEPKFE LTLKPFITGNW GRPQRDGPAL RAIALIGYSK WLINNNNYQST
151 VSNIWIPTVR NDLNYYVAQYW NQTFGFDLWEE VNGSSFFTVA NQHRALVEGA
201 TLAATLGQSG SAYSSVAPQV LCFLQRFWVS SGGYVDSNIN TNEGRTGKDVS
251 NSVLTTSIHTF DPNLGCDAGT FQPCSDKALS NLKVVVDSFR SIYGVNKGIP
301 AGAAVAIGRY AEDVYYNGNP WYLATFAAEE QLYDAIYVWK KTGSITVTTAT
351 SLAFQELVP GVTAGTYSSS SSTFTNIINA VSTYADGFLS RAAKYYVPADG
401 SIAEQFDRNS GTPLSALHILT WSYTASFLTT ARRAGIVPPS WANSSASTIP
451 STCGSGASVVG SYSRPTATSF PPSQTPKPGV PSCTPYTPLP CATPT9VAVT
501 FHELVSTQPGF QTVKVAGNAAL ALGNWSTSAA VALDAVNAYAD NEPLNIGTVN
551 LEAGDVVEYK YINVGQDGSV TWESDPNHTY TVPAVACVTO VVKREDITWQS

```

25
30

[0059] Los inventores han identificado dos dominios responsables de la actividad de glucoamilasa, es decir, un dominio de unión y un dominio catalítico. Es probable que las mutaciones conservadoras en estos dominios den como resultado una proteína con actividad de glucoamilasa. Aunque todas las sustituciones de aminoácidos conservadoras en estos dominios no dan como resultado necesariamente una proteína con actividad de glucoamilasa, los expertos en la materia supondrán que muchas de estas sustituciones conservadoras darían como resultado una proteína con la actividad de glucoamilasa. Además, no es probable que las sustituciones de aminoácidos fuera de los dos dominios funcionales identificados afecten en gran medida la actividad de glucoamilasa.

35 **[0060]** La glucoamilasa útil en la invención tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 1.

Alfa amilasas

40 **[0061]** Las alfa amilasas útiles pueden ser una alfa amilasa natural, una variante o fragmento de la misma o una alfa amilasa híbrida que se deriva de, por ejemplo, un dominio catalítico de una fuente microbiana y un dominio de unión a almidón de otra fuente microbiana. De forma alternativa, la alfa amilasa puede ser una variante que se ha modificado para ser estable a los ácidos. La alfa amilasa también puede ser una alfa amilasa con actividad de hidrolización de almidón granulado (GSHE, por sus siglas en inglés) puesto que las enzimas actúan para descomponer más almidón en el licuado.

45 **[0062]** Ejemplos de alfa amilasas fúngicas incluyen las obtenidas de cepas de hongos filamentosos que incluyen, pero sin carácter limitativo, cepas de *Aspergillus* (por ejemplo, *A. niger*, *A. kawachi*, y *A. oryzae*); *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., y *Penicillium* sp. Como se describe en el presente documento, una alfa amilasa se puede obtener de una cepa de *Aspergillus kawachi* o una cepa de *Trichoderma reesei*.

[0063] Las alfa amilasas comercialmente disponibles contempladas para utilizarse incluyen: GZYME 997; y CLARASE L (Genencor International Inc.); TERMAMYL 120-L, LC y SC y SUPRA (Novozymes Biotech); SAN SUPER (Novozymes A/S) y FUELZYME FL (Diversa/Valley Research).

[0064] La alfa amilasa útil en la invención es como se define en la reivindicación 1. Preferiblemente, cuando se añade en una cantidad efectiva, tiene actividad en el intervalo de pH de 3.0 a 7.0 y preferiblemente en el intervalo de pH de 3.5 a 6.5, incluyendo actividad a un pH de aproximadamente 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, y 6.0. Las alfa amilasas estables a los ácidos útiles como se describen en el presente documento pueden ser alfa amilasas fúngicas o alfa amilasas bacterianas. Las alfa amilasas estables a los ácidos preferidas incluyen las obtenidas de *Aspergillus kawachi* (por ejemplo, AkAA), *Aspergillus niger* (por ejemplo, AnAA), y *Trichoderma reesei* (por ejemplo, TrAA).

[0065] La Tabla 2 muestra la secuencia de proteína madura para la alfa amilasa de *Aspergillus kawachi* (AkAA) (SEQ ID Nº 5). El supuesto enlazador es TTTTTTAATSTSKATTSSSSAAATTSSCTATTT (SEQ ID Nº 6), subrayado. Los aminoácidos delante del enlazador comprenden el dominio catalítico (SEQ ID Nº 7), no subrayado. Los aminoácidos detrás del enlazador comprenden el dominio de unión a almidón (SBD, por sus siglas en inglés), (SEQ ID Nº 8), en negrita. El SBD incluye los últimos 102 aminoácidos del polipéptido.

Tabla 2: Secuencia de proteína madura de alfa amilasa de *Aspergillus kawachi* (AkAA)
(SEQ ID Nº 5)

```
LSAAEWRQTQSIYFLLTDRFGRTDNSTTATCNTGDQIYCGGSWQGIINHLDYIQGMGFTAIWI
SPITEQLPQDTSDGEAYHGYWQQKIZYDVSNSFGTADDLKSLSDALHARGMYLMVDVVPNRMG
YAGNGNDVDYSVFDPFDSSSYFHPYCLITDWDNLTMVQDCWEGDTIVSLPDLNNTETAVRTI
WYDWVADLVSNYSVDEGLRIDSVEEVEPDFFPGYQEAAGVYCVGEVDNGNPALDCPYQKYLDG
VLNYPIYWQLLYAFESSSGSISNLNMIKSVASDCSDPTLLGNFIENHDNPRFASYTSRDYSQ
AKNVLSYIFLSDGIPIVYAGEEQHYSGGKVYPNREATWLSGYDTSAELYTWIATTNAIRKLA
ISADSAYITYANDPIYTDNSNTIAMRKGTSGSQITVLSNKSGSSGSSYTLTLSGSGYTSGTKL
IEAYTCTSVDNGDIPVPMASGLPRVLLPASVVDSSSLCGGSGNTTTTTTAATSTSKATT
SSSSSSAAATTSSCTATSTTILPITFEELVTTTYGEEVYLSGSISQLGEWDTDAVKLSADD
YTSSNPEWSVTVSLPVGTTFEYKFKIVDEGGSVTVWESDPNREYTVPPECGSGETVVDTWR
```

[0066] Los inventores han identificado dos dominios responsables de la actividad de alfa amilasa, es decir, un dominio de unión y un dominio catalítico. Es probable que las mutaciones conservadoras en estos dominios den como resultado una proteína con actividad de alfa amilasa. Aunque todas las sustituciones de aminoácidos conservadoras en estos dominios no dan como resultado necesariamente una proteína con actividad de alfa amilasa, los expertos en la materia supondrán que muchas de estas sustituciones conservadoras darían como resultado una proteína con la actividad de alfa amilasa. Además, no es probable que las sustituciones de aminoácidos fuera de los dos dominios funcionales identificados afecten en gran medida la actividad de alfa amilasa.

[0067] La alfa amilasa tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 5.

[0068] La Tabla 3 muestra la secuencia de proteína madura de una alfa amilasa de *Aspergillus niger* (AnAA) (SEQ ID Nº 9). En la tabla, el dominio catalítico se representa por los aminoácidos 1-478 (SEQ ID Nº 10), no subrayados. La región de enlazador está subrayada (SEQ ID Nº 11). El domino de unión a almidón está en negrita (SEQ ID Nº 12).

Tabla 3: Secuencia de proteína madura de alfa amilasa de *Aspergillus niger* AnAA
(SEQ ID Nº 9)

```
LSAAEWRQTQSIYFLLTDRFGRTDNSTTATCNTGDQIYCGGSWQGIINHLDYIQGMGFTAIWI
SPITEQLPQDTADGEAYHGYWQQKIZYDVSNSFGTADDLKSLSDALHARGMYLMVDVVPNRMG
YAGNGNDVDYSVFDPFDSSSYFHPYCLITDWDNLTMVQDCWEGDTIVSLPDLNNTETAVRTI
WYDWVADLVSNYSVDEGLRIDSVLEVEPDFFPGYQEAAGVYCVGEVDNGNPALDCPYQEYLDG
VLNYPIYWQLLYAFESSSGSISDLNMIKSVASDCSDPTLLGNFIENHDNPRFASYTSRDYSQ
AKNVLSYIFLSDGIPIVYAGEEQHYSGGKVYPNREATWLSGYDTSAELYTWIATTNAIRKLA
ISADSAYITYANDPIYTDNSNTIAMRKGTSGSQITVLSNKSGSSGSSYTLTLSGSGYTSGTKL
IEAYTCTSVDSSGDIPVPMASGLPRVLLPASVVDSSSLCGGSGNSTTTTTTATSSSTA
TSKSASTSSTACTATSTSLAVTFEELVTTTYGEEVYLSGSISQLGDWDTDAVKMSADDY
TSSNPEWSVTVSLPVGTTFEYKFKIVDEGGSVTVWESDPNREYTVPPECGSGETVVDTWR
```

[0069] La Tabla 4 proporciona la secuencia de proteína madura para la alfa amilasa de *Trichoderma* (TrAA) que tiene 433 aminoácidos (SEQ ID Nº 13). Esta alfa amilasa no contiene un SBD o un enlazador.

Tabla 4: Secuencia de proteína madura de alfa amilasa de *Trichoderma reesei* (TrAA)
(443 aminoácidos) (SEQ ID Nº 13)

5 DTAAWRSRTI YFALTDIRIAR GSGDTGGSAC GNLDYCGGT FQGLESKLDY
IKGMGFDAIW ITPVVTSDG GYHGWAEDI DSINSHYGSA DDLKSLVNAA
HSKGFYMMVD VVANHMGYAN ISDDSPSPLN QASSYHPECID IDYNQQTSVE
NCWISGLPDL NTQSSTIRSI YQDWVSNLVS TYGFDGVRID TVKHVEQDYW
PGFVNATGVY CIGEVFDGDP NYLLFYASILM PGLLNYAIYY PMTRFFLQQG
10 SSQDMVNMD QIGSMFPDPT ALGTFVDNH HD NPFRLSIKND TALKNALTY
TILSRGIPIV YYGTEQAFSG GNDPANREDL WRSGFNAQSD MYDAISKLY
AKHAVGGGLAD NDHKHLYVAD TAYAFSRAGG NMVALTTNSG SGSSAQHCFG
TQVPNGRWQN VFDEGNNGPTY SADGNGQLCL NVSNGQPIVL LSS

Proteasas fúngicas ácidas

[0070] Una proteasa fúngica ácida (AFP, por sus siglas en inglés) útil como se describe en el presente documento puede ser una proteasa fúngica ácida natural, una variante o un fragmento de la misma, o un mutante de AFP modificado genéticamente.

[0071] Las proteasas fúngicas ácidas incluyen, por ejemplo, las obtenidas de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Rhizopus*, tales como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* y *M. miehei*. Las AFP se pueden derivar de la expresión de proteínas heterólogas o endógenas de fuentes bacterianas, vegetales y fúngicas. En concreto, se prefieren las AFP secretadas de cepas de *Trichoderma*.

[0072] La Tabla 5 muestra la secuencia de proteína madura (355 aminoácidos) (SEQ ID Nº 14) para una AFP preferida de *Trichoderma reesei*.

Tabla 5: Secuencia de proteína madura de proteasa fúngica ácida de *Trichoderma reesei* (AFP) (SEQ ID Nº 14)

25 KYGAPISDNLSLVAARQAKQALAKRQTGSAPNHPSDSADSEYITSVSIGTPAQVLPIDFDT
GSSDLWVFSSETPKSSATGHAIYTPSKSSTSCKVSGASWSISYGDGSSSGDVTDKVTIGG
FSVNTQGVESATRVSTEFVQDTVISGLVGLAFDSGNQVRPHQKTFWSNAASSLAEPILTAD
LRHGQNGSYNFQGYIDTSAKGPVAYTPVDNSQGFWEFTASGYSVGGKLNRNSIDGIADTGT
TLLLLDDNNVVDAYYANVQSAQYDNQQEGVVFDCDEDLPSFSFGVGSSSTITIPGDLLNLPLE
EGSSTCFGGLQSSSGTIGINIFGDVALKAALVVFDLGNERLGWAQK

[0073] La proteasa fúngica ácida útil en la invención tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 14.

Enzimas secundarias

[0074] Aunque algunos modos de realización de la invención incluyen una composición que comprende al menos una alfa amilasa estable a los ácidos, al menos una glucoamilasa y al menos una proteasa fúngica ácida como se define en las reivindicaciones, la composición puede incluir opcionalmente otras enzimas. Por ejemplo, cuando las composiciones se utilizan en diferentes aplicaciones (por ejemplo, aplicaciones de procesamiento de almidón), se pueden incluir enzimas secundarias adicionales. La composición de la mezcla según la invención se puede utilizar en la etapa de sacarificación y/o en la etapa de fermentación junto con el microorganismo de fermentación y otros componentes y otras enzimas secundarias. Las enzimas adicionales incluyen sin limitación: glucoamilasas adicionales, alfa amilasas adicionales, proteasas adicionales, celulasas, hemicelulasas, xilanasa, fitasas, pululanases, lipasas, cutinasas, pectinasas, beta-glucanasas, galactosidases, esterasas, ciclodextrina transglucosiltransferasas (CGTasas), beta-amilasas y combinaciones de las mismas.

[0075] En algunos modos de realización, la enzima adicional es una segunda alfa amilasa estable a los ácidos tal como una alfa amilasa fúngica. En algunos modos de realización, la segunda alfa amilasa es una GSHE, tal como AkAA, TrAA o AsAA. Ejemplos no limitantes de otras alfa amilasas que pueden ser útiles en combinación con la mezcla son las derivadas de *Bacillus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora* y *Humicola*.

[0076] Algunas de estas amilasas están comercialmente disponibles, por ejemplo, TERMAMYL y SUPRA disponibles de Novo Nordisk A/S, FUELZYME FL de Diversa, LIQUEZYME SC de Novo Nordisk A/S y SPEZYME FRED, SPEZYME ETHYL y GZYME G997 disponibles de Genencor International, Inc.

[0077] En otro modo de realización, la invención puede incluir la adición de una fitasa. Una fitasa es una enzima que es capaz de liberar al menos un fosfato inorgánico de un hexafosfato de inositol. Las fitasas se agrupan según su preferencia por una posición específica del grupo éster fosfato en la molécula de fitato en la que se inicia la hidrólisis, (por ejemplo, como 3-fitatas (EC 3.1.3.8) o como 6-fitatas (EC 3.1.3.26)). Un ejemplo común de fitasa es myo-inositol-hexakisfosfato-3-fosfohidrolasa. Las fitasas se pueden obtener de microorganismos tales como organismos fúngicos y bacterianos. Algunos de estos microorganismos incluyen, por ejemplo, *Aspergillus* (por ejemplo, *A. niger*, *A. terreus*, y *A. fumigatus*), *Myceliophthora* (*M. thermophila*), *Talaromyces* (*T. thermophilus*) *Trichoderma* spp (*T. reesei*), y *Thermomyces* (WO 99/49740). También las fitasas están disponibles de especies de *Penicillium*, por ejemplo, *P. hordei* (Nº ATCC 22053), *P. piceum* (Nº ATCC 10519), o *P. brevi-compactum* (Nº ATCC 48944). Véase, por ejemplo la patente estadounidense 6 475 762. Además, las fitasas están disponibles de *Peniophora*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterbacter* y *Buttiauxella* (véase WO2006/043178, presentada el 17 de octubre de 2005). Las fitasas comerciales están disponibles tales como NATUPHOS (BASF), RONOZYME P (Novozymes A/S), PHZYME (Danisco A/S, Diversa) y FINASE (AB Enzymes). En algunos modos de realización preferidos, la fitasa útil en la presente invención es una derivada de la bacteria *Buttiauxella* spp. La *Buttiauxella* spp. incluye *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferrugutiae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, y *B. warmboldiae*. Cepas de la especie *Buttiauxella* están disponibles en DSMZ, el Centro nacional de recursos de material biológico alemán (Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania). La cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada bajo número de acceso NCIMB 41248 es un ejemplo de una cepa especialmente útil de la que se puede obtener una fitasa y utilizarla según la invención.

[0078] Las celulasas también se pueden utilizar con las mezclas y/o las composiciones según la invención. Las celulasas son composiciones de enzimas que hidrolizan celulosa (enlaces β-1,4-D-glucano) y/o derivados de las mismas, tales como celulasa hinchada de ácido fosfórico. Las celulasas incluyen la clasificación de exocellobiohidrolasas (CBH), endoglucanasas (EG) y β-glucosidasas (BG) (EC3.2.191, EC3.2.1.4 y EC3.2.1.21). Ejemplos de celulasas incluyen celulasas de *Penicillium*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Cellulomonas*, *Clostridium* y *Aspergillus*. Las celulasas disponibles comercialmente vendidas para aplicaciones de pienso son beta-glucanasas tales como ROVABIO (Adisseo), NATUGRAIN (BASF), MULTIFECT BGL (Danisco Genencor) y ECONASE (AB Enzymes).

[0079] Las xilanases también se pueden utilizar con las mezclas y/o composiciones según la invención. Las xilanases (por ejemplo, endo-β-xilanases (E.C. 3.2.1.8), que hidrolizan la cadena principal de xilano pueden ser de fuentes bacterianas, tales como *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Acidothermus*, *Microtetrapora* o *Thermonospora*. Además, las xilanases pueden ser de fuentes fúngicas, tales como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium* o *Fusarium*. (Véase, por ejemplo, EP473 545; la patente estadounidense 5 612 055; WO 92/06209; y WO 97/20920). Las preparaciones comerciales incluyen MULTIFECT y FEEDTREAT Y5 (Danisco Genencor), RONOZYME WX (Novozymes A/S) y NATUGRAIN WHEAT (BASF).

[0080] También se pueden utilizar proteasas adicionales con las mezclas y/o composiciones según la invención. Las proteasas se pueden derivar de fuentes bacterianas o fúngicas. Las fuentes de proteasas bacterianas incluyen proteasas de *Bacillus* tales como *B. amyloliquefaciens*, *B. lentinus*, *B. licheniformis*, y *B. subtilis*. Estas fuentes incluyen subtilisina tal como una subtilisina obtenible de *B. amyloliquefaciens* y mutantes de la misma (patente estadounidense 4 760 025). La proteasa comercial adecuada incluye MULTIFECT P 3000 (Danisco Genencor) y SUMIZYME FP (Shin Nihon). Fuentes de proteasas fúngicas incluyen *Trichoderma* (por ejemplo NSP-24), *Aspergillus*, *Humicola* y *Penicillium*, por ejemplo.

45 Composición de mezcla de enzimas

[0081] Las composiciones de mezcla de enzimas de la invención comprenden una glucoamilasa, una alfa amilasa, y una proteasa fúngica ácida y son como se definen en la reivindicación 1. Los tres componentes enzimáticos se pueden utilizar como una formulación mezclada que comprende tres componentes enzimáticos mezclados, o los componentes de la enzima se pueden añadir individualmente durante una etapa de proceso para dar como resultado una composición abarcada por la invención. Preferiblemente, la composición de la invención se utiliza durante una etapa en la conversión del almidón de manera que se mantenga una relación de actividad como se define más adelante en el texto. Esto puede implicar la adición de los componentes separados de la composición en un tiempo adecuado de manera que se mantenga la relación, por ejemplo, añadiendo los componentes de forma simultánea.

55 [0082] La composición de mezcla de enzimas de la invención es como se define en la reivindicación 1.

Métodos de utilización

[0083] La presente invención se refiere además a un método como se define en la reivindicación 7 para producir productos finales a partir de azúcares fermentables. En el método, la etapa (b) sacarificación y la etapa (c)

fermentación pueden producirse de forma secuencial o simultánea. La glucoamilasa, la alfa amilasa estable a los ácidos, y la proteasa fúngica ácida se pueden añadir de forma separada al licuado. De forma alternativa, se pueden añadir al licuado una composición de mezcla de enzimas comprende una glucoamilasa, una alfa amilasa estable a los ácidos, y una proteasa fúngica ácida. A continuación se detalla cada etapa.

5 Conversión del almidón

[0084] Un sustrato que comprende material vegetal se reduce o se muele mediante métodos conocidos en la técnica. El material vegetal se puede obtener de trigo, maíz, centeno, sorgo (milo), arroz, mijo, cebada, triticale, yuca (tapioca), patata, boniato, remolacha azucarera, caña de azúcar y legumbres tales como la soja y los guisantes. El material vegetal preferido incluye maíz, cebada, trigo, arroz, milo y combinaciones de los mismos. El material vegetal puede incluir variedades híbridas y variedades modificadas genéticamente (por ejemplo, maíz transgénico, cebada o soja que comprenden genes heterólogos).

[0085] Cualquier parte de la planta que contenga almidón se puede utilizar para producir un licuado, incluyendo, pero sin carácter limitativo, partes de la planta tales como hojas, tallos, vainas, cáscaras, tubérculos, mazorcas, granos y similares. Los granos enteros preferidos incluyen maíz, trigo, centeno, cebada, sorgo y combinaciones de los mismos. En otros modos de realización, el almidón se puede obtener de granos de cereales fraccionados que incluyen componentes de gérmenes, fibra y/o endospermo. En la técnica se conocen métodos para fraccionar el material vegetal, tal como maíz y trigo. En algunos modos de realización, el material vegetal obtenido de diferentes fuentes se puede mezclar (por ejemplo, maíz y milo o maíz y cebada). Los métodos de molienda se conocen muy bien en la técnica y se hace referencia a *THE ALCOHOL TEXTBOOK: A REFERENCE FOR THE BEVERAGE, FUEL AND INDUSTRIAL ALCOHOL INDUSTRIES* 3^a ED. K.A. Jacques *et al.*, Eds, (1999) Nottingham University Press. Véanse los capítulos 2 y 4.

[0086] En algunos modos de realización, el material vegetal, ya se haya reducido mediante molienda o mediante otros medios, se combinará con una solución que dará como resultado una suspensión que comprenderá sustrato de almidón. En algunos modos de realización, la suspensión puede incluir un flujo secundario del procesamiento del almidón tal como *backset*. En algunos modos de realización, la suspensión comprenderá 15 % - 55 % de residuo seco (ds, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, 20 % - 50 %, 25 % - 45 %, 25 % - 40 %, y 20 % - 35 %). La suspensión que comprende el material vegetal reducido se puede someter a un proceso de licuefacción en el que se puede añadir una alfa amilasa durante la etapa de licuefacción. Esto da como resultado un licuado. Para producir el licuado, se puede añadir a la suspensión una dosis individual o fraccionada de una alfa amilasa. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la dosis efectiva de alfa amilasa para utilizarse en los procesos de licuefacción.

[0087] En algunos modos de realización, la cantidad de alfa amilasa utilizada para la licuefacción es una cantidad efectiva para causar la licuefacción de una mayoría del almidón. En otros modos de realización, la cantidad es efectiva para permitir la licuefacción de más del 40 % del almidón, incluyendo 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, y 100 %. En algunos modos de realización, el intervalo comprenderá de 0,05 a 50 AAU/gds, también de 0,1 a 20 AAU/gds y también de 1,0 a 10 AAU/gds. En modos de realización adicionales la dosis de alfa amilasa será estará comprendida en el intervalo de 0,01 a 10,0 kg/tonelada métrica (MT, por sus siglas en inglés) de residuo seco; también de 0,05 a 5,0 kg/MT de residuo seco; y también de 0,1 a 4,0 kg/MT de residuo seco.

[0088] En algunos modos de realización, la alfa amilasa se añade a una temperatura de 0 °C a 30 °C por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón del almidón granulado del material vegetal reducido. Esta temperatura puede estar de 0 °C a 25 °C, de 0 °C a 20 °C, de 0 °C a 15 °C y de 0 °C a 10 °C por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón. Este valor específico variará y depende del tipo de grano que comprenda la suspensión. Por ejemplo, la temperatura de gelatinización del almidón del maíz es generalmente mayor que la temperatura de gelatinización del almidón del centeno o el trigo. En algunos modos de realización, la temperatura estará entre 45 °C y 80 °C, también entre 50 °C y 75 °C, también entre 50 °C y 72 °C y en algunos modos de realización la temperatura estará por debajo de 68 °C; por debajo de 65 °C, por debajo de 62 °C, por debajo de 60 °C y también por debajo de 55 °C. En otros modos de realización, la temperatura estará por encima de 40 °C, por encima de 45 °C, por encima de 50 °C, y por encima de 55 °C. En algunos modos de realización preferidos, la temperatura de la incubación estará comprendida entre 58 °C y 72 °C y también entre 60 °C y 68 °C.

[0089] En algunos modos de realización, la suspensión se mantendrá a un intervalo de pH de entre aproximadamente 3.0 y menos de 6.5., también a un intervalo de pH de entre 4.0 y menos de 6.2, también a un intervalo de pH de entre aproximadamente 4.5 y menos de 6.0 y preferiblemente a un intervalo de pH de entre aproximadamente 5.0 y 6.0 (por ejemplo, de aproximadamente 5.4 a 5.8), y el grano molido de la suspensión se pondrá en contacto con la composición de enzimas durante un periodo de tiempo de 2 minutos a 18 horas (por ejemplo, de 5 min a 3 hr; de 15 min a 2,5 hr y de 30 min a 2 hr). En una etapa adicional, el sustrato incubado se licuificará exponiendo el sustrato incubado a un aumento de la temperatura tal como de 0 °C a 55 °C por encima de la temperatura de gelatinización del almidón. (por ejemplo, a 65 °C a 120 °C, de 70 °C a 110 °C, de 70 °C a 90 °C) durante un periodo de tiempo de 2 minutos a 8 horas (por ejemplo, de 2 minutos a 6 hr, de 5 minutos a 4 horas y preferiblemente de 1 hr a 2 hr) a un pH de aproximadamente 4.0 a 6.5. En algunos modos de realización,

la temperatura se puede aumentar a una temperatura de entre aproximadamente 85 °C - 90 °C y se puede utilizar una única dosis de alfa amilasa. Si la temperatura se aumenta por encima de 90 °C - 105 °C, se puede añadir una segunda dosis de alfa amilasa después de que la temperatura vuelva a la normalidad. En un modo de realización adicional, la temperatura se puede aumentar a entre aproximadamente 105 °C y 140 °C y se puede utilizar una dosis fraccionada de alfa amilasa, siendo una parte añadida antes de aumentar la temperatura y la otra parte añadida después de que la temperatura se haya llevado hasta al menos por debajo de 105 °C, incluyendo por debajo de 104 °C, 103 °C, 102 °C, 101 °C, 100 °C, 99 °C, 98 °C, 97 °C, 96 °C, 95 °C, 94 °C, 93 °C, 92 °C, y 91 °C, pero preferiblemente por debajo de 90 °C. En algunos modos de realización, el licuado resultante se enfriá antes de la sacarificación.

10 Sacarificación y fermentación

[0090] El licuado obtenido anteriormente se puede poner en contacto con una glucoamilasa, una alfa amilasa estable a los ácidos, y una proteasa fúngica ácida en una dosis individual o fraccionada siempre y cuando se mantenga una relación de enzimas deseada. Por consiguiente, una dosis fraccionada significa que la dosis total en la relación deseada se añade en más de una porción, incluyendo dos porciones o tres porciones. En un modo de realización, se añade una porción de la dosis total al principio y se añade una segunda porción en un momento específico del proceso. En un modo de realización, se añade al menos una porción de la dosis al principio de la sacarificación (o SSF) para empezar el proceso de sacarificación. En un modo de realización, cada enzima de la composición de enzimas se puede añadir al licuado por separado, pero simultáneamente o en un periodo de tiempo suficientemente próximo de manera que se mantenga la relación de actividad. De forma alternativa, la composición de mezcla de enzimas, que comprende una glucoamilasa, una alfa amilasa estable a los ácidos y una proteasa fúngica ácida, se puede añadir durante una o ambas de las etapas de sacarificación y fermentación. La relación de la glucoamilasa, la alfa amilasa estable a los ácidos y la proteasa fúngica ácida es de 1:1,5:0,1 a 1:8:1, y más preferiblemente de aproximadamente 1:2:0,2 a 1:5:0,6, como se mide mediante GAU:SSU:SAPU.

25 [0091] El proceso de sacarificación puede durar de 12 a 120 horas. No obstante, es común realizar una sacarificación de 30 minutos a 2 horas y después completar la sacarificación durante la fermentación. A veces esto se denomina sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés). La sacarificación se lleva a cabo comúnmente a temperaturas de 30 °C a 65 °C y normalmente con un pH de 3.0 a 5.0, incluyendo de 4.0 a 5.0. La sacarificación puede dar como resultado la producción de azúcares fermentables.

30 [0092] En algunos modos de realización los azúcares fermentables se someten a fermentación con microorganismos de fermentación. La etapa de contacto y la etapa de fermentación se pueden llevar a cabo de forma simultánea en el mismo recipiente de reacción o de forma secuencial. En general, los procesos de fermentación se describen en *The Alcohol Textbook 3^a ED, A Reference for the Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Industries*, Eds Jacques *et al.*, (1999) Nottingham University Press, Reino Unido.

35 [0093] En algunos modos de realización, el método comprende además utilizar los azúcares fermentables (dextrina, por ejemplo, glucosa) como una materia prima de fermentación en fermentaciones microbianas bajo condiciones de fermentación adecuadas para obtener productos finales, tales como alcohol (por ejemplo, etanol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido succínico, ácido láctico), polialcoholes (por ejemplo, glicerol), intermedios de ácido ascórbico (por ejemplo, gluconato, DKG, KLG), aminoácidos (por ejemplo, lisina), proteínas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de los mismos).

40 [0094] En algunos modos de realización preferidos, los azúcares fermentables se fermentan con una levadura a temperaturas comprendidas en el intervalo de 15 °C a 40 °C, de 20 °C a 38 °C, y también de 25 °C a 35 °C; a un intervalo de pH comprendido entre pH 3.0 y 6.5, también pH entre 3.0 y 6.0, pH entre 3.0 y 5.5, pH entre 3.5 y 5.0 y también pH entre 3.5 y 4.5 durante un periodo de tiempo de 5 horas a 120 horas, preferiblemente de 12 horas a 120 horas y más preferiblemente de 24 horas a 90 horas para producir un producto de alcohol, preferiblemente etanol.

45 [0095] Las células de levadura generalmente se proporcionan en cantidades de 10^4 a 10^{12} , y preferiblemente de 10^7 a 10^{10} de recuento de levadura viable por ml de caldo de fermentación. La fermentación incluirá además de un microorganismo de fermentación (por ejemplo, levadura) nutrientes, opcionalmente ácido y enzimas adicionales. En algunos modos de realización, además de las materias primas descritas anteriormente, los medios de fermentación contendrán suplementos que incluyen, pero sin carácter limitativo, vitaminas (por ejemplo, biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, riboflavina), cofactores, y macro y micro nutrientes y sales (por ejemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; K_2HPO_4 ; NaCl ; MgSO_4 ; H_3BO_3 ; ZnCl_2 ; y CaCl_2).

50 [0096] En algunos modos de realización preferidos, el material vegetal molido incluye cebada, milo, maíz y combinaciones de los mismos, y las etapas de contacto y fermentación se llevan a cabo simultáneamente a un intervalo de pH de 3.5 a 5.5, un intervalo de temperatura entre 30 °C y 45 °C y durante un periodo de tiempo de 48 horas a 90 horas, donde al menos el 50 % del almidón se solubiliza.

Productos finales

[0097] Un producto final preferido del proceso de fermentación instantáneo es un producto alcohol, por ejemplo, etanol. En modos de realización adicionales, los productos finales son los coproductos de fermentación tales como granos secos de destilería (DDG, por sus siglas en inglés) y granos secos de destilería con solubles (DDGS, por sus siglas en inglés), que se pueden utilizar como pienso para animales.

5 **[0098]** En modos de realización adicionales, mediante la utilización de microorganismos de fermentación adecuados como se conoce en la técnica, los productos finales de la fermentación pueden incluir sin carácter limitativo glicerol, 1,3-propanodiol, gluconato, 2-ceto-D-gluconato, 2,5-diceto-D-gluconato, ácido 2-ceto-L-gulónico, ácido succínico, ácido láctico, aminoácidos y derivados de los mismos.

Organismos de fermentación

10 **[0099]** Ejemplos de organismos de fermentación son los microorganismos etanologénicos o los microorganismos productores de etanol tales como las bacterias etanologénicas que expresan alcohol deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa y que se pueden obtener de *Zymomonas mobilis* (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5 000 000; la patente estadounidense 5 028 539, la patente estadounidense 5 424 202; la patente estadounidense 5 514 583 y la patente estadounidense 5 554 520). En modos de realización adicionales, los 15 microorganismos etanologénicos expresan xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, enzimas que convierten xilosa en xilulosa. En modos de realización adicionales, la xilosa isomerasa se utiliza para convertir xilosa en xilulosa. En modos de realización especialmente preferidos, se utiliza un microorganismo capaz de fermentar tanto pentosas como hexosas a etanol. Por ejemplo, en algunos modos de realización el microorganismo puede ser un microorganismo natural o un microorganismo no modificado genéticamente o en otros modos de 20 realización el microorganismo puede ser un microorganismo recombinante.

25 **[0100]** Los microorganismos de fermentación incluyen, pero sin carácter limitativo, cepas bacterianas de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *E. coli*, *Erwinia*, *Pantoea* (por ejemplo, *P. citrea*), *Pseudomonas* y *Klebsiella* (por ejemplo, *K. oxytoca*). (Véase por ejemplo, la patente estadounidense 5 028 539, la patente estadounidense 5 424 202 y WO 95/13362). *Bacillus* es un microorganismo de fermentación preferido. El microorganismo de fermentación utilizado en la etapa de fermentación dependerá del producto final a producir.

30 **[0101]** En otros modos de realización preferidos, el microorganismo productor de etanol es un microorganismo fúngico, tal como Trichoderma, una levadura y específicamente Saccharomyces tal como cepas de *S. cerevisiae* (patente estadounidense 4 316 956). Diversas *S. cerevisiae* están comercialmente disponibles e incluyen sin carácter limitativo FALI (Fleischmann's Yeast), SUPERSTART (Alltech), FERMIOL (DSM Specialties), RED STAR (Lesaffre) y Angel alcohol yeast (Angel Yeast Company, China).

35 **[0102]** Por ejemplo, cuando el ácido láctico es el producto final deseado, se puede utilizar una *Lactobacillus* sp. (*L. casei*); cuando el glicerol o el 1,3-propanodiol son los productos finales deseados, se puede utilizar *E. coli*; y cuando 2-ceto-D-gluconato, 2,5-diceto-D-gluconato, y ácido 2-ceto-L-gulónico son los productos finales deseados, se puede utilizar *Pantoea citrea* como microorganismo de fermentación. La lista anteriormente enumerada es solo a modo de ejemplo y un experto en la materia conocerá una variedad de microorganismos de fermentación que se pueden utilizar de forma adecuada para obtener un producto final deseado.

Recuperación de productos finales

40 **[0103]** El producto final producido según el proceso se puede separar y/o purificar a partir de los medios de fermentación. Los métodos para la separación y la purificación se conocen, por ejemplo sometiendo los medios a extracción, destilación y cromatografía en columna. En algunos modos de realización, el producto final se identifica directamente sometiendo los medios a un análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés).

45 **[0104]** En modos de realización adicionales, la masa se puede separar mediante, por ejemplo, centrifugación en la fase líquida y en la fase sólida y recuperar los productos finales tales como alcohol y sólidos. El alcohol se puede recuperar mediante medios tales como la destilación y la deshidratación con tamices moleculares o ultrafiltración.

[0105] En algunos modos de realización, la utilización de una composición o mezcla de enzimas según la invención en un método de producción de etanol dará como resultado un rendimiento de etanol mayor que 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, y 22 % (V/V).

50 **[0106]** Opcionalmente después de la fermentación, se puede extraer alcohol (por ejemplo, etanol) mediante, por ejemplo, destilación. El etanol se puede utilizar para producir combustible, etanol portable o industrial.

EJEMPLOS

[0107] La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos que no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención como se reivindica. Las Figuras adjuntas han de considerarse partes

integrales de la memoria y la descripción de la invención. Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos, pero no para limitar la invención reivindicada.

[0108] En la descripción y en la sección experimental que sigue, se aplican las siguientes abreviaciones: wt% (concentración porcentual en peso); °C (grados Centígrados); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); dLH₂O (agua desionizada, filtración Milli-Q); g o gm (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); µl (microlitros); mL y ml (millilitros); mm (millímetros); µm (micrometros); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); MW (peso molecular); seg (segundos); min (minuto/minutos); hr (hora/horas); DO (oxígeno disuelto); W/V (peso/volumen); W/W (peso/peso); V/V (volumen/volumen); IKA (IKA Works Inc. 2635 North Chase Parkway SE, Wilmington, NC); Genencor (Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA); Ncm (Newton centímetro) y ETOH (etanol), eq (equivalentes); N (normal); ds o DS (contenido de residuo seco), SAPU (unidad de proteasa de ácido espectrofotométrico, en la que 1 SAPU es la cantidad de actividad de enzima de proteasa que libera un micromol de tirosina por minuto a partir de un sustrato de caseína bajo condiciones del ensayo) y GAU (unidad de glucoamilasa, que se define como la cantidad de enzima que producirá 1 g de azúcar reductor calculado como glucosa por hora a partir de un sustrato de almidón soluble con pH 4.2 y a 60 °C).

15 **Materiales y métodos**

Mediciones de viscosidad

[0109] Se utilizó un cocedor-viscosímetro de vidrio, sistema LR-2.ST de IKA, para determinar la viscosidad. En resumen, el viscosímetro consiste en un recipiente de vidrio de doble pared de 2000 ml con un mezclador de ancla que se agita mediante un viscosímetro con control de energía Eurostar de Labortechnik (el intervalo de viscosidad del viscosímetro Viscoklick es 0-600 Ncm). En general, para los ejemplos descritos en el presente documento se vertió en el recipiente del viscosímetro una suspensión que comprendía sustrato de almidón y una cantidad adecuada de enzima. Se registraron la temperatura y la viscosidad durante el calentamiento a 85 °C y se continuó la incubación de 60 a 120 minutos adicionales. La viscosidad medida en Ncm se registró en intervalos.

25 Enzimas

[0110] La glucoamilasa utilizada fue la *Trichoderma reesei* GA (TrGA) que se muestra como SEQ ID Nº1 en la Tabla 1 (véase también la solicitud de patente estadounidense 2006/0003408, publicada el 5 de enero de 2006 y la solicitud de patente estadounidense 2006/0094080, publicada el 4 de mayo de 2006). La proteasa fúngica ácida utilizada en los ejemplos fue una proteína *Trichoderma reesei* con la secuencia de la SEQ ID Nº 14 (véase también la solicitud de patente estadounidense 2006/015342, publicada el 13 de julio de 2006, SEQ ID Nº 10), la alfa amilasa utilizada fue la alfa amilasa *Aspergillus kawachi* (AkAA) mostrada en el presente documento como SEQ ID Nº 5, (patente estadounidense 7 205 138).

[0111] Análisis de carbohidrato mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés): La composición de los productos de reacción de oligosacáridos se midió mediante HPLC (Beckman System Gold 32 Karat Fullerton, CA equipado con una columna de HPLC (Rezex 8 u8% H, Monosacáridos), se mantuvo a 50°C equipada con un detector de índice refractivo (RI, por sus siglas en inglés) (ERC-7515A, Detector de RI (AnsSpec Company Inc.). Los sacáridos se separaron basándose en el peso molecular. Una designación de DP1 es un monosacárido, tal como glucosa; una designación de DP2 es un disacárido, tal como maltosa; una designación de DP3 es un trisacárido, tal como maltotriosa y la designación de "DP4⁺" es un oligosacárido con un grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés) de 4 o superior.

[0112] La actividad de la alfa amilasa (AAU, por sus siglas en inglés) se determinó mediante el grado de hidrólisis del almidón, como se refleja en el grado de disminución de la capacidad de tinción con yodo medida espectrofotométricamente. Una AAU de actividad de alfa-amilasa es la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 10 mg de almidón por minuto bajo condiciones estandarizadas.

45 [0113] La actividad de alfa amilasa se determinó como unidad de almidón soluble (SSU, por sus siglas en inglés) y se basa en el grado de hidrólisis del sustrato de almidón de patata soluble (4 % DS) mediante una alícuota de la muestra de enzimas a un pH de 4.5, a 50 °C. El contenido de azúcar reductor se mide utilizando el método DNS como se describe en Miller, G. L. (1959) Anal. Chem. 31:426 - 428. Se midió la actividad de alfa amilasa en unidades de Liquifon (LU, por sus siglas en inglés) para SPEZYME FRED según el método descrito en la patente estadounidense 5 958 739. En resumen, el método de ensayo utiliza p-nitrofenil maltoheptosido como sustrato con el azúcar terminal no reductor químicamente bloqueado. El índice de liberación de p-nitrofenil es proporcional a la actividad de alfa amilasa y la liberación se monitoriza a 410 nm. La actividad se calcula con respecto a un control estándar.

55 [0114] Unidades de actividad de la glucoamilasa (GAU, por sus siglas en inglés) = El ensayo PNPG se utiliza para medir la actividad de la glucoamilasa.

[0115] Actividad de la proteasa fúngica ácida (SAPU, por sus siglas en inglés) = la actividad de la proteasa fúngica ácida se basa en la liberación de péptidos de caseína solubilizados de una hidrólisis proteolítica de 30

5 minutos de un sustrato de caseína con alto contenido en nitrógeno purificado a pH 3.0 y a 37 °C. El sustrato no hidrolizado se precipita con ácido tricloroacético y se extrae por filtración. La caseína solubilizada se mide después espectrofotométricamente. Una unidad de proteasa ácida del espectrofotómetro (SAPU) es esa actividad que liberará 1 micromol de equivalente de tirosina por minuto por gramo de producto enzimático bajo las condiciones del método.

EJEMPLO 1

Efecto de una mezcla o composición de TrGA, AkAA y AFP en la fermentación de etanol.

[0116] Este ejemplo muestra la sorprendente utilidad de las mezclas de glucoamilasa, alfa amilasa y proteasa fúngica ácida en la fermentación de etanol.

10 [0117] El efecto de la proteasa fúngica ácida (FERMGEN™ de Genencor -Danisco) y una alfa amilasa estable a los ácidos (AkAA con la SEQ ID Nº 5) con glucoamilasa (*Trichoderma reesei* o *A. niger*) se analizó durante la fermentación de la levadura en la eficiencia de conversión de carbono (rendimiento de alcohol). Se estudió el medio que contenía maíz molido entero licuificado. La masa para este estudio se preparó diluyendo el licuado de New Energy (South Bend IN) (39,8 % de DS W/W) a 32 % de DS con vinaza (9,8 % de DS obtenido de New 15 ENergy, South Bend IN). La masa contenía 29,3 % de residuo seco (DS, por sus siglas en inglés) de maíz. El pH de la masa se ajustó a 4.2 con 6 N de ácido sulfúrico. Se añadieron 600 ppm de urea junto con un inóculo de levadura de Etanol Red Star. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces de 500 ml que contenían 300 g de masa. Las enzimas se diluyeron de forma que se añadieron 0,2 ml a los matraces. Todas las dosis de enzima fueron por gramo de residuo seco (DS) de maíz. Los matraces se colocaron en un baño termostático a 32 °C y se mezclaron ocasionalmente. Se utilizaron las concentraciones enzimáticas que se muestran en la Tabla 6.

20 [0118] Durante la fermentación, se extrajeron aproximadamente 2 ml de muestras de cerveza (caldo) para realizar un análisis de HPLC. En un tubo de tapón de rosca se añadieron 0,5 ml de sobrenadante de la muestra a 4,45 ml de agua y 0,05 ml de 1N de ácido sulfúrico. El tubo se tapó y se colocó en agua a 75 °C durante 15 minutos para inactivar la actividad enzimática. Después de calentarla, la muestra diluida se filtró a través de un filtro de 0,2 micras para realizar un análisis de HPLC. La separación en la HPLC se llevó a cabo en una columna ácida de Phenominex a 60 °C a 0,6 ml por minuto de fase móvil de 0,01 N de ácido sulfúrico, utilizando una inyección de 20 ul de la muestra. Después de 71 horas, las fermentaciones finalizaron y la cerveza se desechará.

25 [0119] Los resultados de la HPLC en la Tabla 6 muestran el efecto de la amilasa estable a los ácidos (AkAA) y la proteasa fúngica ácida (FERMGEN/AFP) durante la fermentación de la levadura (0,25 GAU de TrGA/gds de maíz, 32 % de residuo seco, pH 4.3, 32 °C). El grado de polimerización, o DP, por sus siglas en inglés, es el número de unidades de repetición en una cadena de polímero media en un tiempo t en una reacción de polimerización. La longitud está en unidades de monómero. El grado de polimerización es una medida de peso molecular. Ejemplos de DP-1 son los monosacáridos, tales como la glucosa y la fructosa. Ejemplos de DP-2 son los disacáridos, tales como la maltosa y la sacarosa. DP-3 se refiere a maltotriosa. DP>3 denota polímeros con un grado de polimerización mayor que 3. DP-1, DP-2 y DP-3 en la Tabla 6 son azúcares que resultan de la hidrólisis del almidón.

30 [0120] El ácido láctico es un ácido orgánico producido en la fermentación de carbohidratos por las bacterias *Lactobacillus*. La producción de ácido láctico es una razón principal de la pérdida de rendimiento en la fermentación de etanol contaminado. Como tal, el ácido láctico se monitoriza rutinariamente. El glicerol es un 35 subproducto de las fermentaciones de etanol; se monitoriza rutinariamente como un indicador de la salud de la levadura.

[0121] Los resultados de la Tabla 6 muestran que cuando el nivel de AkAA en la mezcla de enzimas aumentó, aumentaron el grado de reducción de azúcar más alto (>DP3) y en consecuencia el grado de producción de etanol y finalmente el rendimiento de etanol.

Tabla 6: resultados de la HPLC

Ferm	TrGA GAU/g	AKAA sSU/g	Ferm Gen SAPU/g	Urea PPm	Hr	% W/V	% W/V	% W/V	% W/N	% W/V	% W/V	% V/V
						% DP>3	DP3	DP-2	DP-1	Láctico	Glicerol	Etanol
1	0,25	0,00	0,000	600	0	21,79	4,51	3,12	1,24	0,46	0,59	0,05
1	1			20	7,49	4,62	4,71	3,16	0,48	0,91	1,65	
1	1			30	5,33	0,59	6,80	0,31	0,49	1,30	8,69	
1	1			48	1,97	0,37	0,39	0,42	0,49	1,48	12,19	
1	1			71	0,94	0,23	0,32	0,05	0,46	1,63	15,97	
2	0,25	0,50	0,000	600	7	14,04	4,82	5,14	3,29	0,47	0,88	1,59
2	2			20	6,96	0,65	7,22	0,31	0,48	1,29	8,50	
2	2			30	1,81	0,62	3,11	0,78	0,49	1,47	11,97	
2	2			48	1,73	0,42	0,42	0,63	0,50	1,63	15,69	
2	2			71	0,87	0,24	0,34	0,04	0,49	1,66	16,89	
3	0,25	1,00	0,000	600	7	13,76	4,99	5,44	3,24	0,43	0,85	1,61
3	3			20	6,86	0,69	7,57	0,32	0,49	1,30	8,42	
3	3			30	4,56	0,66	3,49	0,62	0,49	1,47	11,97	
3	3			48	1,71	0,45	0,45	0,82	0,51	1,66	15,77	
3	3			71	0,89	0,25	0,36	0,04	0,49	1,69	17,16	
4	0,25	2,00	0,000	600	7	12,93	5,23	5,92	3,26	0,49	0,91	1,57
4	4			20	6,61	0,74	7,94	0,33	0,51	1,37	8,42	
4	4			30	4,25	0,71	3,86	0,63	0,50	1,50	12,05	
4	4			48	1,49	0,46	0,45	0,49	0,49	1,64	16,09	
4	4			71	0,89	0,26	0,36	0,04	0,48	1,68	17,43	
5	0,25	3,00	0,000	600	7	11,94	5,46	6,73	3,35	0,48	0,89	1,61
5	5			20	6,28	0,76	8,49	0,35	0,48	1,30	8,47	
5	5			30	3,92	0,74	4,05	0,93	0,48	1,47	12,03	
5	5			48	1,42	0,48	0,48	1,06	0,50	1,65	15,81	
5	5			71	0,89	0,26	0,37	0,04	0,50	1,69	17,37	
6	0,25	0,00	0,025	600	7	14,59	4,64	4,69	3,23	0,46	0,86	1,59
6	6			20	7,37	0,62	6,85	0,29	0,49	1,28	8,77	
6	6			30	5,42	0,57	2,60	0,45	0,51	1,45	12,23	
6	6			48	2,01	0,38	0,39	0,31	0,50	1,56	15,96	
6	6			71	0,91	0,23	0,31	0,04	0,48	1,55	16,97	

ES 2 526 116 T3

Ferm	TrGA GAU/g	AkAA SSU/g	Ferm Gen SAPU/g	Urea PPm	Hr	% W/N DP>3	% W/N DP3	% W/N DP-2	% W/N DP-1	% W/N Láctico	% W/N Glicerol	% V/V Etanol
7	0,25	0,50	0,025	600	7	14,03	4,81	5,17	3,32	0,48	0,90	1,59
7	7			20	7,09	0,66	7,17	0,30	0,51	1,30	8,72	
7	7			30	4,81	0,62	2,94	0,52	0,47	1,41	12,35	
7	7			48	1,60	0,39	0,41	0,35	0,49	1,57	16,19	
7	7			71	0,90	0,23	0,33	0,04	0,17	1,57	17,22	
8	0,25	1,00	0,025	600	7	13,47	4,89	5,35	3,25	0,46	0,85	1,55
8	8			20	6,86	0,69	7,34	0,31	0,49	1,27	8,68	
8	8			30	4,55	0,65	3,21	0,56	0,49	1,41	12,24	
8	8			48	1,54	0,41	0,42	0,66	0,50	1,58	16,13	
8	8			71	0,89	0,25	0,34	0,04	0,49	1,59	17,09	
9	0,25	2,00	0,025	600	7	12,46	5,08	5,79	3,23	0,45	0,84	1,56
9	9			20	6,70	0,75	7,87	0,32	0,51	1,32	8,93	
9	9			30	4,01	0,68	3,43	0,59	0,48	1,40	12,02	
Ferm	TrGA GAU/g	AkAA SSU/g	Ferm Gen SAPU/g	Urea PPm	Hr	% W/N	% W/N	% W/N	% W/N	% W/N	% W/N	% V/V
9	9			48	1,37	0,41	0,43	0,58	0,48	1,55	16,09	
9	9			71	0,89	0,25	0,35	0,08	0,47	1,61	17,18	
10	0,25	3,00	0,025	600	7	11,95	5,39	6,27	3,22	0,47	0,88	1,58
10	10			20	6,29	0,76	7,85	0,32	0,50	1,28	8,60	
10	10			30	3,91	0,74	3,77	0,79	0,49	1,43	12,37	
10	10			48	1,33	0,43	0,43	0,25	0,50	1,59	16,53	
10	10			71	0,88	0,26	0,34	0,08	0,47	1,58	17,22	
11	0,25	0,00	0,050	600	7	14,60	4,71	4,84	3,33	0,48	0,91	1,66
11	11			20	7,33	0,63	6,73	0,30	0,50	1,27	8,95	
11	11			30	5,27	0,57	2,39	0,43	0,50	1,42	12,59	
12	0,25	0,50	0,050	600	7	13,93	4,81	5,19	3,33	0,47	0,88	1,63
12	12			20	6,95	0,66	7,01	0,30	0,46	1,24	8,79	
12	12			30	4,77	0,63	2,84	0,51	0,49	1,41	12,51	
12	12			48	1,55	0,37	0,41	0,39	0,49	1,54	16,33	
12	12			71	0,90	0,24	0,33	0,08	0,49	1,56	17,41	

ES 2 526 116 T3

	TrGAA	AkAA	Ferm Gen	Urea	% W/N	% V/N						
13	0,25	1,00	0,050	600	7	13,37	4,93	5,57	3,41	0,89	1,66	
13				20	6,64	0,67	7,07	0,32	0,51	1,30	8,88	
13				30	4,31	0,66	2,87	0,50	0,50	1,45	12,65	
13				48	1,33	0,35	0,40	0,36	0,47	1,51	16,04	
13				71	0,88	0,24	0,33	0,09	0,48	1,56	17,19	
14	0,25	2,00	0,050	600	7	12,62	5,18	5,99	3,35	0,48	0,90	1,64
14				20	6,50	0,72	7,60	0,32	0,50	1,30	8,86	
14				30	4,06	0,71	3,42	0,63	0,51	1,45	12,49	
14				48	1,36	0,41	0,43	0,56	0,49	1,55	16,33	
14				71	0,93	0,26	0,36	0,10	0,52	1,66	18,14	
15	0,25	3,00	0,050	600	7	12,11	5,52	6,87	3,35	0,47	0,89	1,69
15				20	6,18	0,76	7,72	0,31	0,49	1,28	8,85	
15				30	3,73	0,73	3,51	0,63	0,49	1,42	12,49	
15				48	1,24	0,40	0,42	0,49	0,51	1,58	16,00	
15				71	0,88	0,26	0,34	0,09	0,48	1,57	17,06	
16	0,25	0,00	0,100	600	7	14,46	4,65	4,79	3,31	0,46	0,86	1,64
16				20	7,32	0,62	6,58	0,27	0,45	1,22	8,90	
16				30	5,16	0,57	2,25	0,40	0,49	1,38	12,49	
16				48	1,75	0,34	0,38	0,16	0,49	1,51	16,21	
16				71	0,90	0,23	0,31	0,08	0,49	1,54	17,19	
17	0,25	0,50	0,100	600	7	13,93	4,79	5,18	3,29	0,48	0,90	1,64
17				20	6,92	0,66	6,87	0,28	0,50	1,27	8,82	
17				30	4,78	0,63	2,75	0,48	0,50	1,40	12,70	
17				48	1,51	0,37	0,40	0,27	0,49	1,52	16,26	
17				71	0,89	0,24	0,32	0,09	0,49	1,55	17,38	
18	0,25	1,00	0,100	600	7	13,40	4,91	5,49	3,32	0,47	0,87	1,66
18				20	6,69	0,67	7,05	0,28	0,49	1,26	8,90	
18				30	4,37	0,65	2,92	0,53	0,49	1,40	12,54	
18				48	1,38	0,36	0,42	0,26	0,50	1,54	16,53	
18				71	0,87	0,24	0,33	0,10	0,48	1,53	17,32	
19	0,25	2,00	0,100	600	7	12,65	5,17	5,98	3,29	0,46	0,87	1,66

ES 2 526 116 T3

TrGA	AkAA	Ferm Gen	Urea	% W/N	% VN					
19			20	6,46	0,72	7,46	0,28	0,46	1,25	9,02
19			30	3,96	0,70	3,23	0,53	0,51	1,43	12,64
19			48	1,29	0,38	0,42	0,33	0,48	1,52	16,48
19			71	0,88	0,25	0,34	0,10	0,48	1,56	17,46
20	0,25	3,00	600	7	12,11	5,18	6,73	3,25	0,48	0,89
20			20	6,15	0,75	7,60	0,30	0,48	1,24	8,83
20			30	3,72	0,72	3,45	0,57	0,48	1,38	12,62
20			48	1,27	0,39	0,42	0,40	0,47	1,53	16,66
20			71	0,90	0,26	0,34	0,10	0,47	1,56	17,58
21	0,25	0,00	0,200	600	7	14,76	4,70	4,79	3,28	0,89
21			20	7,40	0,65	6,59	0,28	0,50	1,26	9,04
21			30	5,28	0,57	2,22	0,34	0,50	1,40	12,92
21			48	1,79	0,34	0,37	0,15	0,48	1,49	16,29
21			71	0,93	0,23	0,30	0,08	0,47	1,49	17,39
22	0,25	0,50	0,200	600	7	14,35	4,88	5,22	3,26	0,48
22			20	6,94	0,67	6,36	0,27	0,51	1,27	8,76
22			30	4,77	0,61	2,63	0,42	0,49	1,37	12,4
22			48	1,50	0,36	0,39	0,21	0,49	1,51	16,62
22			71	0,90	0,24	0,31	0,08	0,50	1,54	17,45
23	0,25	1,00	0,200	600	7	13,73	4,95	5,47	3,28	0,48
23			20	6,77	0,68	6,86	0,27	0,48	1,24	8,96
23			30	4,40	0,65	2,76	0,43	0,49	1,40	12,92
23			48	1,40	0,36	0,41	0,15	0,49	1,55	17,05
23			71	0,91	0,25	0,32	0,08	0,48	0,90	1,62
24	0,25	2,00	0,200	600	7	12,90	5,20	5,95	3,27	0,46
24			20	6,43	0,72	7,23	0,28	0,49	1,25	8,75
24			30	4,07	0,70	3,25	0,47	0,51	1,40	12,77
24			71	0,91	0,25	0,32	0,08	0,48	1,53	17,15
24			48	1,26	0,37	0,39	0,33	0,46	1,42	15,77
24			71	0,90	0,26	0,33	0,11	0,49	1,54	17,56
25	0,25	3,00	0,200	600	7	11,96	5,39	6,08	3,27	0,46
25			20	6,30	0,76	7,65	0,29	0,49	1,26	9,01
25			30	3,74	0,73	3,39	0,56	0,50	1,41	12,79
25			48	1,25	0,39	0,42	0,31	0,49	1,54	16,89
25			71	0,91	0,26	0,34	0,12	0,55	1,55	17,62

EJEMPLO 2**Estudios de balance de masa**

[0122] El efecto de la proteasa fúngica ácida (FERMGEN de Danisco US, Inc, Genencor Division) y la alfa amilasa estable a los ácidos (SEQ ID Nº 5) con glucoamilasa (*Trichoderma reesei*) durante la fermentación de la levadura en el medio de eficiencia de la conversión de carbono (rendimiento de alcohol) que contenía maíz molido entero licoificado se estudió de forma adicional en los estudios de balance de masa.

[0123] El licuado (sustrato de maíz molido entero licoificado) se preparó añadiendo vinaza al licuado de maíz molido entero para obtener un residuo seco final del 32 %. El pH se ajustó a 4.3 con 6 N de ácido sulfúrico. A la masa se le añadieron 400 ppm de urea junto con un inóculo de levadura de Etanol Red Star de 0,05 % en peso. La masa se dividió en cantidades de 1200 gramos y se dosificó con enzima a un nivel de 0,325 GAU/g de residuo seco como se describe en la Tabla 8. Se añadieron de forma cuantitativa aproximadamente 800 gramos de masa a cada uno de los cuatro matraces volumétricos de un litro. Además, en matraces de Erlenmeyer de 250 ml se colocaron aproximadamente 150 gramos en cada una. Los matraces de un litro se taparon con tapones de goma provistos de una aguja para permitir la salida del CO₂, se colocaron en una incubadora a 32 °C y se pesaron periódicamente. Los matraces de 250 ml se colocaron en un agitador con aire forzado a 32 °C a 150 rpm y se tomaron muestras periódicamente para analizarlas mediante HPLC. Al final de la fermentación de los recipientes de un litro, se extrajo una alícuota para analizarla mediante HPLC. El contenido del matraz se transfirió de forma cuantitativa a matraces de Erlenmeyer de 2 L utilizando aproximadamente 500 ml de agua desionizada. Los matraces se fijaron entonces a un equipo de destilación y se dejaron destilar. Se recogieron aproximadamente 800 ml de destilado en un matraz volumétrico de 1 L y se diluyó a volumen. Entonces se tomó una muestra para analizarla mediante HPLC. El residuo restante después de la destilación se transfirió a un recipiente tarado y se secó durante la noche a 104 °C. El residuo seco (DDGS) se recogió y se ensayó para determinar el almidón residual.

[0124] Los datos de la HPLC sobre el efecto de las concentraciones de AkAA y AFP a 0,325 GAU de TrGA/gds de maíz en el rendimiento de alcohol y la composición del perfil de azúcar durante la fermentación se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Efecto de las concentraciones de AkAA y AFP a 0,325 GAU de TrGA/gds bajo fermentación de levadura en el rendimiento de alcohol final. Las relaciones mostradas en la Tabla 8 bajo la columna titulada "Desc." son GAU:SSU:SAPU.

#	Desc.	hr	% W/V DP>3	% W/V DP-3	% W/V DP-2	% W/V DP-1	% W/V Láctico	% W/V Glicerol	% W/V acético	% V/V Etanol
1	600:7300:240	16	8,10	0,65	7,11	0,43	0,20	1,44	0,01	7,98
		24	5,48	0,56	4,47	0,33	0,17	1,51	0,00	10,48
		40	1,78	0,31	0,33	0,11	0,13	1,60	0,04	15,91
		48	1,15	0,19	0,26	0,08	0,10	1,66	0,07	15,92
		64	1,07	0,18	0,27	0,12	0,06	1,72	0,07	17,29
2	600:5000:240	16	7,44	0,56	6,01	0,41	0,16	1,40	0,00	8,15
		24	5,11	0,50	3,48	0,33	0,14	1,51	0,01	11,17
		40	1,34	0,21	0,29	0,09	0,08	1,59	0,07	15,49
		48	1,05	0,17	0,30	0,08	0,05	1,58	0,09	15,70
		64	0,99	0,16	0,31	0,11	0,03	1,58	0,09	16,36
3	600:250D:2.40	16	7,84	0,53	5,57	0,49	0,18	1,42	0,00	8,21
		24	5,64	0,48	3,17	0,35	0,18	1,56	0,03	11,20
		40	1,46	0,19	0,26	0,06	0,10	1,62	0,05	15,47
		48	1,05	0,15	0,27	0,05	0,06	1,60	0,06	15,85
		64	0,98	0,15	0,31	0,12	0,06	1,61	0,08	16,56
4	600:1000:240	16	8,35	0,49	5,38	0,42	0,19	1,40	0,00	8,04
		24	6,33	0,47	3,04	0,37	0,21	1,56	0,03	10,85
		40	1,85	0,21	0,26	0,07	0,14	1,61	0,03	15,06
		48	1,14	0,16	0,25	0,08	0,12	1,64	0,05	15,56
		64	0,95	0,15	0,29	0,11	0,10	1,63	0,06	16,41
5	600:0:240	16	8,66	0,45	5,00	0,37	0,18	1,40	0,00	8,06
		24	6,96	0,42	2,52	0,30	0,18	1,53	0,02	10,73
		40	2,37	0,22	0,25	0,10	0,13	1,58	0,05	14,55
		48	1,28	0,16	0,23	0,06	0,07	1,54	0,04	15,21
		64	1,03	0,14	0,27	0,07	0,05	1,59	0,08	16,15

[0125] Los datos de la Tabla 8 mostraron que la adición de la proteasa fúngica ácida (AFP) dio como resultado un índice aumentado de la producción de alcohol, pero la adición de alfa amilasa (AkAA) produjo una producción de alcohol aún mayor en comparación con el control. Los datos del balance de masa resumidos en la Tabla 8 mostraron que la mezcla de triple enzima que contenía TrGA, ASP y AkAA dio como resultado una mayor eficiencia de conversión de carbono (2,67 %) en comparación con TrGA en combinación con AFP o AkAA sola.

5

Tabla 8: Datos del balance de masa de la fermentación de levadura con diferente relación de enzimas

#	Descripción	GA:SSU:SAPU	Etanol GPB			DDGS	Almidón Residual
			HPLC	CO2	Destil.		
1	NBA2	600:7300:240	2,47	2,66	2,45	18,43	6,89
2	NBA3	600:5000:240	2,43	2,66	2,45	18,49	5,28
3	NBA4	600:2500:240	2,40	2,64	2,44	18,51	5,43
4	NBA5	600:1000:240	2,37	2,64	2,38	18,52	6,22
5	NBA6	600:0:240	2,37	2,59	2,37	19,19	7,60

[0126] El rendimiento del alcohol de la destilación mostró la misma tendencia que los valores de CO₂ que mostraban que las mezclas que contenían 7300 y 5000 SSU/g de alfa amilasa eran equivalentes entre sí y mejores que el control en términos de valor final de los galones de etanol por bushel de maíz (véase la Tabla 8). Los datos de la Tabla 8 muestran que al aumentar la dosis de AkAA aumentó el nivel de etanol al final de la fermentación. El análisis de HPLC de la cerveza final mostró claramente la misma tendencia, no obstante, no en el grado de los valores de CO₂ y destilación.

10

[0127] Las concentraciones finales de alcohol obtenidas utilizando composiciones de enzimas diferentes bajo las condiciones de fermentación de la levadura utilizando maíz molido entero licuificado se compararon con las de TrGA y se mostraron en la Figura 1. La Figura 1 mostró el efecto de la adición de la proteasa fúngica ácida (SAPS) y de la alfa amilasa estable a los ácidos (SSU) a la TrGA en el rendimiento de alcohol final durante la fermentación de la levadura de maíz molido entero licuificado. Las mezclas de enzimas diferentes como se numeran en la figura fueron: 1:TrGA, 0,25 GAU/gds de maíz, 2: No #1 +0,05 SAPU AFP/gds de maíz, 3: No # 1 +2,0 SSU de alfa amilasa/gds. de maíz, y 4: No #1+0,05 SAPU, AFP +2,0 SSU de alfa amilasa/gds de maíz.

15

[0128] Los resultados mostraron inesperadamente que la eficiencia de conversión de carbono (rendimiento de alcohol por gramo de residuo seco de maíz) dependía de la composición de mezcla de enzimas. El aumento en el rendimiento de alcohol con TrGA que contenía AFP o AkAA no fue aditivo, pero mostró beneficios sinérgicos inesperados.

20

LISTA DE SECUENCIAS

[0129]

<110> BRENEMAN, SUZANNE LANTERO, ORESTE J. JR. SHETTY, JAYARAMA

<120> MEZCLAS DE ENZIMAS PARA FERMENTACIÓN

<130> 02718.0021.00PC00

25

<140> PCTUS0879827

< 141> 2008-10-14

<150> US 60/981,035

< 151> 2007-10-18

<160> 14

30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 599

< 212> PRT

< 213> *Trichoderma reesei*

35

<400> 1

40

ES 2 526 116 T3

Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn
1 5 10 15

Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser
20 25 30

5

Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Asp Pro Asp Tyr Tyr
35 40 45

Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile Asp
50 55 60

10

Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly
85 90 95

15

Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr
100 105 110

Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro
115 120 125

ES 2 526 116 T3

Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn
130 135 140

Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Val Ile Trp Pro Ile Val Arg
145 150 155 160

5

Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe Asp
165 170 175

Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Asn Gln
180 185 190

10

His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ala Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly Gln
195 200 205

Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Ser Val Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu
210 215 220

15

Gln Arg Phe Trp Val Ser Ser Gly Gly Tyr Val Asp Ser Asn Ile Asn
225 230 235 240

Thr Asn Glu Gly Arg Thr Gly Lys Asp Val Asn Ser Val Leu Thr Ser
245 250 255

20

Ile His Thr Phe Asp Pro Asn Leu Gly Cys Asp Ala Gly Thr Phe Gln
260 265 270

Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Val Val Asp Ser
275 280 285

25

Phe Arg Ser Ile Tyr Gly Val Asn Lys Gly Ile Pro Ala Gly Ala Ala
290 295 300

Val Ala Ile Gly Arg Tyr Ala Glu Asp Val Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro
305 310 315 320

30

Trp Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

Tyr Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ala Thr Ser Leu
340 345 350

ES 2 526 116 T3

Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Thr Ala Gly Thr Tyr Ser
355 360 365

Ser Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Ile Asn Ala Val Ser Thr Tyr
370 375 380

5

Ala Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp Gly
385 390 395 400

Ser Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Ser Gly Thr Pro Leu Ser Ala
405 410 415

10

Leu His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Ala Arg
420 425 430

Arg Ala Gly Ile Val Pro Pro Ser Trp Ala Asn Ser Ser Ala Ser Thr
435 440 445

15

Ile Pro Ser Thr Cys Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser Arg
450 455 460

Pro Thr Ala Thr Ser Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly Val
465 470 475 480

20

Pro Ser Gly Thr Pro Tyr Thr Pro Leu Pro Cys Ala Thr Pro Thr Ser
485 490 495

Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr Gln Phe Gly Gln Thr
500 505 510

25

Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Leu Gly Asn Trp Ser Thr Ser
515 520 525

Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Ala Asp Asn His Pro Leu
530 535 540

Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp Val Val Glu Tyr Lys
545 550 555 560

30

Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro
565 570 575

ES 2 526 116 T3

Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys Val Thr Gln Val Val
580 585 590

Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser
595

5

<210> 2
< 211> 453
< 212> PRT
< 213> *Trichoderma reesei*

10 <400> 2

Ser Val Asp Asp Phe Ile Ser Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Asn Asn
1 5 10 15

15 Leu Leu Cys Asn Val Gly Pro Asp Gly Cys Arg Ala Phe Gly Thr Ser
20 25 30

Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ile Asp Pro Asp Tyr Tyr
35 40 45

20 Tyr Met Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Phe Lys Asn Leu Ile Asp
50 55 60

Arg Phe Thr Glu Thr Tyr Asp Ala Gly Leu Gln Arg Arg Ile Glu Gln
65 70 75 80

25 Tyr Ile Thr Ala Gln Val Thr Leu Gln Gly Leu Ser Asn Pro Ser Gly
85 90 95

Ser Leu Ala Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Leu Thr
100 105 110

30 Leu Lys Pro Phe Thr Gly Asn Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro
115 120 125

Ala Leu Arg Ala Ile Ala Leu Ile Gly Tyr Ser Lys Trp Leu Ile Asn
130 135 140

Asn Asn Tyr Gln Ser Thr Val Ser Asn Val Ile Trp Pro Ile Val Arg
145 150 155 160

35

Asn Asp Leu Asn Tyr Val Ala Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Phe Asp
165 170 175

ES 2 526 116 T3

Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser Ser Phe Phe Thr Val Ala Asn Gln
180 185 190

His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ala Thr Leu Ala Ala Thr Leu Gly Gln
195 200 205

5

Ser Gly Ser Ala Tyr Ser Ser Val Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu
210 215 220

Gln Arg Phe Trp Val Ser Ser Gly Gly Tyr Val Asp Ser Asn Ile Asn
225 230 235 240

10

Thr Asn Glu Gly Arg Thr Gly Lys Asp Val Asn Ser Val Leu Thr Ser
245 250 255

Ile His Thr Phe Asp Pro Asn Leu Gly Cys Asp Ala Gly Thr Phe Gln
260 265 270

15

Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Val Val Asp Ser
275 280 285

Phe Arg Ser Ile Tyr Gly Val Asn Lys Gly Ile Pro Ala Gly Ala Ala
290 295 300

20

Val Ala Ile Gly Arg Tyr Ala Glu Asp Val Tyr Tyr Asn Gly Asn Pro
305 310 315 320

Trp Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile
325 330 335

25

Tyr Val Trp Lys Lys Thr Gly Ser Ile Thr Val Thr Ala Thr Ser Leu
340 345 350

Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Pro Gly Val Thr Ala Gly Thr Tyr Ser
355 360 365

30

Ser Ser Ser Ser Thr Phe Thr Asn Ile Ile Asn Ala Val Ser Thr Tyr
370 375 380

Ala Asp Gly Phe Leu Ser Glu Ala Ala Lys Tyr Val Pro Ala Asp Gly
385 390 395 400

ES 2 526 116 T3

Ser Leu Ala Glu Gln Phe Asp Arg Asn Ser Gly Thr Pro Leu Ser Ala
405 410 415

Leu His Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Ala Arg
420 425 430

5

Arg Ala Gly Ile Val Pro Pro Ser Trp Ala Asn Ser Ser Ala Ser Thr
435 440 445

Ile Pro Ser Thr Cys
450

10

<210> 3
< 211> 38
< 212> PRT
< 213> *Trichoderma reesei*

15 <400> 3

Ser Gly Ala Ser Val Val Gly Ser Tyr Ser Arg Pro Thr Ala Thr Ser
1 5 10 15

20

Phe Pro Pro Ser Gln Thr Pro Lys Pro Gly Val Pro Ser Gly Thr Pro
20 25 30

Tyr Thr Pro Leu Pro Cys
35

25

<210> 4
< 211> 108
< 212> PRT
< 213> *Trichoderma reesei*

<400> 4

30

Ala Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe His Glu Leu Val Ser Thr
1 5 10 15

Gln Phe Gly Gln Thr Val Lys Val Ala Gly Asn Ala Ala Ala Leu Gly
20 25 30

35

Asn Trp Ser Thr Ser Ala Ala Val Ala Leu Asp Ala Val Asn Tyr Ala
35 40 45

Asp Asn His Pro Leu Trp Ile Gly Thr Val Asn Leu Glu Ala Gly Asp
50 55 60

ES 2 526 116 T3

Val Val Glu Tyr Lys Tyr Ile Asn Val Gly Gln Asp Gly Ser Val Thr
65 70 75 80

Trp Glu Ser Asp Pro Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ala Val Ala Cys
85 90 95

5

Val Thr Gln Val Val Lys Glu Asp Thr Trp Gln Ser
100 105

<210> 5

< 211> 619

10 < 212> PRT

< 213> *Aspergillus kawachii*

<400> 5

15

Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile Tyr Phe Leu Leu Thr
1 5 10 15

Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr Ala Thr Cys Asn Thr
20 25 30

20

Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln Gly Ile Ile Asn His
35 40 45

Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Ser Pro
50 55 60

25

Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ser Asp Gly Glu Ala Tyr His
65 70 75 80

Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asn Val Asn Ser Asn Phe Gly Thr
85 90 95

30

Ala Asp Asp Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu His Ala Arg Gly Met
100 105 110

Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asn His Met Gly Tyr Ala Gly Asn
115 120 125

Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro Phe Asp Ser Ser Ser
130 135 140

ES 2 526 116 T3

Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp Asp Asn Leu Thr Met
145 150 155 160

Val Gln Asp Cys Trp Glu Gly Asp Thr Ile Val Ser Leu Pro Asp Leu
165 170 175

5 Asn Thr Thr Glu Thr Ala Val Arg Thr Ile Trp Tyr Asp Trp Val Ala
180 185 190

Asp Leu Val Ser Asn Tyr Ser Val Asp Gly Leu Arg Ile Asp Ser Val
195 200 205

10 Glu Glu Val Glu Pro Asp Phe Phe Pro Gly Tyr Gln Glu Ala Ala Gly
210 215 220

Val Tyr Cys Val Gly Glu Val Asp Asn Gly Asn Pro Ala Leu Asp Cys
225 230 235 240

15 Pro Tyr Gln Lys Tyr Leu Asp Gly Val Leu Asn Tyr Pro Ile Tyr Trp
245 250 255

Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Glu Ser Ser Ser Gly Ser Ile Ser Asn Leu
260 265 270

Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys Ser Asp Pro Thr Leu
275 280 285

20 Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Ala Ser Tyr
290 295 300

Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu Ser Tyr Ile Phe Leu
305 310 315 320

25 Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu Glu Gln His Tyr Ser
325 330 335

Gly Gly Asp Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr Trp Leu Ser Gly Tyr
340 345 350

30 Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala Thr Thr Asn Ala Ile
355 360 365

Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Asp Tyr Ile Thr Tyr Ala Asn

ES 2 526 116 T3

370 375 380
Asp Pro Ile Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala Met Arg Lys Gly Thr
385 390 395 400

5 Ser Gly Ser Gln Ile Ile Thr Val Leu Ser Asn Lys Gly Ser Ser Gly
 405 410 415

 Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly Tyr Thr Ser Gly Thr
 420 425 430

 Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val Thr Val Asp Ser Asn
10 435 440 445

 Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu Pro Arg Val Leu Leu
 450 455 460

 Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys Gly Gly Ser Gly Asn
 465 470 475 480

15 Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Ser Lys Ala Thr Thr
 485 490 495

 Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Ser Ser Ser Cys Thr
 500 505 510

20 Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile Thr Phe Glu Glu Leu Val Thr Thr
 515 520 525

 Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu Ser Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly
 530 535 540

 Glu Trp Asp Thr Ser Asp Ala Val Lys Leu Ser Ala Asp Asp Tyr Thr
25 545 550 555 560

 Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val Thr Val Ser Leu Pro Val Gly Thr
 565 570 575

 Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys Val Asp Glu Gly Gly Ser Val Thr
 580 585 590

30 Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Glu Cys Gly Ser
 595 600 605

ES 2 526 116 T3

Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Trp Arg
610 615

<210> 6

< 211> 37

5 < 212> PRT

< 213> *Aspergillus kawachii*

<400> 6

10 Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Ser Lys Ala Thr Thr
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Ser Ser Ser Cys Thr
20 25 30

Ala Thr Ser Thr Thr
35

15

<210> 7

< 211> 480

< 212> PRT

< 213> *Aspergillus kawachii*

20 <400> 7

Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile Tyr Phe Leu Leu Thr
1 5 10 15

25 Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr Ala Thr Cys Asn Thr
20 25 30

Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln Gly Ile Ile Asn His
35 40 45

30

Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ser Asp Gly Glu Ala Tyr His
65 70 75 80

35

Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asn Val Asn Ser Asn Phe Gly Thr
85 90 95

Ala Asp Asp Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu His Ala Arg Gly Met

40

ES 2 526 116 T3

100 105 110

Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asn His Met Gly Tyr Ala Gly Asn
115 120 125

5

Gly Asn

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende:

- (i) una glucoamilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 1;
- 5 (ii) una alfa amilasa estable a los ácidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 5; y
- (iii) una proteasa fúngica ácida que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 14,

10 en la que la relación de la glucoamilasa, la alfa amilasa estable a los ácidos y la proteasa fúngica ácida es de 1:1,5:0,1 a 1:8:1, como se mide por GAU:SSU:SAPU, y en la que GAU representa una unidad glucoamilasa, SSU representa una unidad almidón soluble y SAPU representa una unidad proteasa ácida espectrofotométrica.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que la relación de la glucoamilasa, la alfa amilasa estable a los ácidos y la proteasa fúngica ácida es de 1:2:0,2 a 1:5:0,6, como se mide por GAU:SSU:SAPU.

15 **3.** Composición según la reivindicación 1, en la que la glucoamilasa comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 1.

4. Composición según la reivindicación 1, en la que la alfa amilasa estable a los ácidos comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 5.

20 **5.** Composición según la reivindicación 1, en la que la proteasa fúngica ácida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 14.

25 **6.** Composición según la reivindicación 1, que comprende además una enzima adicional seleccionada del grupo consistente en: una segunda glucoamilasa, una segunda alfa amilasa, una celulasa, una hemicelulasa, una xilanasa, una segunda proteasa, una fitasa, una pululanasa, una beta amilasa, una lipasa, una cutinasa, una pectinasa, una beta-glucanasa, una galactosidasa, una esterasa, una ciclodextrina transglicosiltransferasa, y combinaciones de las mismas.

7. Método para producir productos finales a partir de azúcares fermentables, que comprende las etapas consistentes en:

- a) poner en contacto una suspensión que comprende un grano molido que contiene almidón con una alfa amilasa para producir un licuado;
- 30 b) poner en contacto el licuado con una composición como se define en la reivindicación 1, para producir azúcares fermentables; y
- c) fermentar los azúcares fermentables en presencia de un organismo de fermentación para producir productos finales.

8. Método según la reivindicación 7, en el que dicho producto final es alcohol.

35 **9.** Método según la reivindicación 7, en el que la relación de la glucoamilasa, la alfa amilasa estable a los ácidos y la proteasa fúngica ácida es de 1:2:0,2 a 1:5:0,6, como se mide por GAU:SSU:SAPU.

10. Método según la reivindicación 7, en el que las etapas (b) y (c) se producen secuencialmente.

11. Método según la reivindicación 7, en el que las etapas (b) y (c) se producen simultáneamente.

12. Método según la reivindicación 7, en el que la etapa (b) se lleva a cabo a 30 °C-65 °C y a un pH de 3.0-5.0.

40 **13.** Método según la reivindicación 7, en el que la etapa (c) se lleva a cabo a 15 °C-40 °C y a un pH de 3.0-6.5.

Figura 1

