

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 247**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

C12P 7/14 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2012 E 12703420 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2673368**

54 Título: **Proceso para licuefacción de almidón en presencia de piridoxamina**

30 Prioridad:

07.02.2011 US 201161439957 P

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

12.03.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (100.0%)
77 Perry Chapel Church Road P.O. Box 576
Franklinton, NC 27525, US**

72 Inventor/es:

CRAIG, JOYCE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 531 247 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para licuefacción de almidón en presencia de piridoxamina

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación, azúcares y dextrinas a partir de un material que contiene almidón.

10 Estado de la técnica

[0002] Un gran número de productos comerciales que son difíciles de producir sintéticamente se producen hoy mediante la fermentación de organismos. Tales productos incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanediol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diqueto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. La fermentación se usa también comúnmente en las industrias del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), de los productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso), del cuero y del tabaco.

[0003] Un gran número de procesos de producción de productos de fermentación, tales como etanol, por fermentación de azúcares proporcionada por la degradación del material que contiene almidón se conocen en la técnica.

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

[0005] La WO 2008/049615 divulga el uso de vitaminas en un proceso de fermentación para la producción de, por ejemplo, aminoácidos o etanol, donde se usan al menos 4 vitaminas seleccionadas del grupo que consiste en tiamina, cobalamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantoténico, biotina, ácido ascórbico, retinol, procalción, tocoferol, ácido fólico y piridoxamina, y donde el uso de estas vitaminas mejora el índice de crecimiento bacteriano al menos en un 50 por ciento y la concentración de producto al menos en un 10 por ciento en comparación con un proceso de fermentación de referencia, realizado sin adición de vitaminas.

[0006] Corzo-Marinez *et al.* (J. Agric. Food. Chem. 58(1):500-6 (2010)) revelan que la piridoxamina tiene un efecto inhibitorio de los estadios iniciales de la reacción de Maillard durante la formación de conjugados de beta-lactoglobulina con galactosa y tagatosa.

[0007] Vozlyan *et al.* (Cell Mol. Life Sci. 62(15): 1671-1681 (2005)) revelan que la piridoxamina puede inhibir reacciones de glicación y la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs). El mecanismo de acción de piridoxamina incluye la inhibición de la formación de AGE por bloqueo de la degradación oxidativa del intermedio de Amadori de la reacción de Maillard.

[0008] Metz *et al.* (Arch. Biochem. Biophys. 419(1): 41-49(2003)) revelan que la piridoxamina inhibe la formación de productos finales de lipoxidación avanzada en la proteína durante las reacciones de peroxidación lipídica, y tiene un fuerte efecto de reducción de lípidos en ratas diabética inducidas por estreptozotocina y obesas de Zucker, y protege contra el desarrollo de nefropatía en ambos modelos animales.

[0009] Vozlyan *et al.* (NY Acad. Sci. 1043: 807-816 (2005)) revelan que la piridoxamina es un intermedio transitorio crítico en la catálisis de reacciones de transaminación por enzimas dependientes de la vitamina BB.

[0010] Sato *et al.* (Appl. Environ. Microbiol. 58(2): 734-736 (1992)) revelan que la adición de extracto de levadura, una mezcla vitamínica que contiene vitamina B(12), biotina, piridoxamina y ácido p-aminobenzoico mejoraba la formación de etanol pero disminuía la producción de lactato en la fermentación de celulosa por *Clostridium thermocellum*.

[0011] Vozlyan *et al.* (Journal of Biological Chemistry, 277(5): 3397-3403 (2002)) revelan un inhibidor post-Amadori piridoxamina que inhibe químicamente la modificación de proteínas por barrido de productos intermedios de carbonilo de degradación de carbohidratos y lípidos.

[0012] Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso mejorado para producir un producto de fermentación.

Resumen de la invención

[0013] Se describe un proceso de producción de un producto de fermentación a partir de un almidón gelatinizado que contiene material. La presente invención se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:

- 5 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una glucoamilasa; y
- 10 (c) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador.

[0014] La presente invención también se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:

- 15 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación; y
- 20 (c) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador.

[0015] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:

- 25 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa;
- (c) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación; y
- 30 (d) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador para producir el producto de fermentación.

[0016] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de un azúcar, que comprende:

- 35 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina; y
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación.
- 40

[0017] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de un azúcar, que comprende:

- 45 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa; y
- (c) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación.

50 [0018] La presente invención también se refiere a un proceso de producción de una dextrina, que comprende licuefacción de un material que contiene almidón en la dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina.

[0019] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de una dextrina, que comprende:

- 55 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina; y
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa.

60 Descripción detallada de la invención

[0020] Procesos para producir productos de fermentación, dextrinas y azúcares a partir de materiales que contienen almidón.

[0021] Se ha descrito un proceso de producción de un producto de fermentación a partir de un material que contiene almidón gelatinizado. La presente invención se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:

- 5 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una glucoamilasa; y
- 10 (c) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador.

[0022] La presente invención también se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:

- 15 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación; y
- 20 (c) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador.

[0023] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:

- 25 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa;
- (c) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación; y
- 30 (d) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador para producir el producto de fermentación.

[0024] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de un azúcar, que comprende:

- 35 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina; y
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación.
- 40

[0025] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de un azúcar, que comprende:

- 45 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa; y
- (c) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación.

50 [0026] La presente invención también se refiere a un proceso de producción de una dextrina, que comprende licuefacción de un material que contiene almidón en la dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina.

[0027] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un proceso de producción de una dextrina, que comprende:

- 55 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina; y
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa.

60 [0028] En una forma de realización, la piridoxamina está presente en una cantidad de 1-100 microgramos/g de sólidos secos, por ejemplo, 5-50, 10-40, 10-25 microgramos/g de sólidos secos.

65 [0029] El almidón se forma dentro de las células vegetales como gránulos ínfimos insolubles en agua. Cuando se introducen en agua fría, los gránulos de almidón puede absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50°C a 75°C la hinchazón pueden ser reversible. No obstante, con temperaturas más altas comienza una hinchazón irreversible llamada "gelatinización".

5 [0030] El almidón granulado que se va a procesar puede ser una calidad de almidón altamente refinado, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99,5% puro o puede ser materiales que contienen almidón más crudo que comprendan (por ejemplo, molidos) granos enteros, incluyendo fracciones no amiláceas tales como
10 residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como granos enteros, se puede reducir a tamaño de partícula, por ejemplo, por fresado, para descubrir la estructura y permitir más tratamiento. Se prefieren dos procesos, la molienda en seco y en húmedo. En la molienda en seco, se muelen y usan granos enteros. La molienda en húmedo da una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y frecuentemente se aplica en lugares donde el almidón hidrolizado se usa para la producción de, por ejemplo, jarabes. Ambas moliendas en húmedo y en seco se conocen bien en la técnica de tratamiento de almidón y se pueden usar en un proceso de la invención. El tamaño de partícula se reduce a entre 0,05-3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, de forma más preferible al menos 70%, incluso de la forma más preferible al menos 90% del material que contiene almidón pase través de una criba con una pantalla de 0,05-3,0 mm, preferiblemente una pantalla de 0,1-0,5 mm.

15 [0031] Después de reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, un lodo que comprende el material que contiene almidón y agua se forma. La suspensión acuosa puede contener de 10-55 % en peso de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 % en peso de sólidos secos (DS), de forma más preferible 30-40 % en peso de sólidos secos (DS) de material que contiene almidón.

20 [0032] El material que contiene almidón se puede utilizar para producir un azúcar, una dextrina o un producto de fermentación. Generalmente, el material que contiene almidón se licua en una dextrina con una alfa-amilasa, que luego viene seguido de sacarificación (un proceso que convierte la dextrina en un azúcar) y fermentación (un proceso que convierte el azúcar en un producto de fermentación).

25 Tratamiento antes de la licuefacción

30 [0033] En una forma de realización, el material que contiene almidón es tratado con una alfa-amilasa antes de la licuefacción en presencia de piridoxamina. Este tratamiento se puede realizar en cualquier pH y temperatura adecuados para la actividad enzimática durante un periodo de tiempo para permitir que se produzca la reacción enzimática. En una forma de realización, la temperatura está en la gama de 20-75°C, por ejemplo, 20- 65°C o 40-60°C; el pH está en la gama de 4,5-6,5; y el periodo de tiempo está en la gama de 5 minutos - 2 horas, por ejemplo, 5 minutos-1 hora.

35 Licuefacción

[0034] La licuefacción se realiza en presencia de una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana y/o alfa-amilasa fúngica ácida. En una forma de realización, una pululanasa, isoamilasa y/o fitasa se adiciona o adicionan durante la licuefacción.

40 [0035] La dextrina se puede recuperar por métodos bien conocidos en la técnica.

45 [0036] Durante una licuefacción típica, el almidón de cadena larga se degrada en unidades más cortas ramificadas y lineales (maltodextrinas) por una alfa-amilasa. La licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo caliente de tres pasos. El lodo se calienta a entre 60-95°C (por ejemplo, 77- 86°C, 80- 85°C o 83- 85°C) y una más alfa-amilasas se añaden para iniciar la licuefacción (aclareo). El proceso de licuefacción se realiza a 85°C durante 1-2 horas. El pH está generalmente entre 5,5 y 6,2 para asegurar la estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, 1 mM de calcio se añade opcionalmente (para proporcionar aproximadamente 40 ppm de iones libres de calcio). Después de tal tratamiento, el almidón licuado tendrá un "equivalente de dextrosa" (DE) de 10-15.

50 [0037] El lodo se puede cocer posteriormente por chorro a 95-140°C, por ejemplo, 105-125°C, durante aproximadamente 1-15 minutos, por ejemplo, aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. El lodo se enfría luego a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa/s para obtener la hidrólisis final (licuefacción secundaria). El proceso de cocción por chorro se realiza a pH 4,5-6,5, típicamente a un pH entre 5 y 6. La alfa-amilasa se puede adicionar como una única dosis, por ejemplo, antes de la cocción por chorro.

55 [0038] La licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo en caliente de tres pasos. El lodo se calienta a 80-95°C, por ejemplo, 80- 85°C, y una alfa-amilasa se añade para iniciar la licuefacción (aclareo). Luego el lodo se puede cocer por chorro a una temperatura de 95-140°C, por ejemplo, 105-125°C, durante aproximadamente 1-15 minutos, por ejemplo, aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. El lodo se enfría a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a un pH de 4,5-6,5, en particular a un pH de 5 a 6. Todas las alfa-amilasas se pueden adicionar como una única dosis, por ejemplo, antes de la cocción por chorro.

60 Sacarificación

65

5 [0039] La sacarificación se puede realizar utilizando condiciones bien conocidas en la técnica con una enzima de sacarificación, por ejemplo, beta-amilasa, glucoamilasa o amilasa maltogénica, y opcionalmente una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa. Por ejemplo, un paso de sacarificación completa puede durar de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, no obstante, también es común hacer una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de sacarificación completa antes de iniciar la fermentación. La sacarificación se realiza típicamente a una temperatura en la gama de 20-75°C, por ejemplo, 25- 65°C y 40-70°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre aproximadamente 4 y 5, normalmente alrededor de pH 4,5.

10 [0040] En una forma de realización, la sacarificación da como resultado la producción de maltosa.

[0041] En otra forma de realización, sacarificación da como resultado la producción de glucosa.

15 [0042] La glucosa se puede convertir en fructosa.

[0043] Los azúcares se pueden recuperar por métodos bien conocidos en la técnica.

Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

20 [0044] Los pasos de sacarificación y de fermentación se pueden realizar simultáneamente. En esta forma de realización, no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que un organismo fermentador, tal como la levadura, y enzima/s se añaden juntos. La SSF se realiza típicamente en condiciones (por ejemplo, temperatura y/o pH) adecuadas, preferiblemente óptimas, para el organismo u organismos de fermentación en cuestión, por ejemplo, una temperatura de 20-40°C, por ejemplo, 26- 34°C, preferiblemente alrededor de 32°C, cuando el organismo de fermentación es levadura, tal como una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, y el producto de fermentación es etanol.

25 [0045] Otros productos de fermentación se pueden fermentar en condiciones y temperaturas bien conocidas por personas expertas en la técnica, adecuadas para el organismo fermentador en cuestión. Según la invención, la temperatura se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación.

30 Fermentación

[0046] Diferentes tipos de organismos fermentativos se pueden utilizar para fermentar azúcares derivados de material que contiene almidón. Fermentaciones se llevan a cabo de forma convencional utilizando levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, como organismo fermentador. No obstante, bacterias y hongos filamentosos también se pueden usar como organismos fermentativos. Algunas bacterias tienen mayor una temperatura de fermentación óptima que, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, las fermentaciones se pueden realizar en tales casos a temperaturas tan altas como 75°C, por ejemplo, entre 40-70°C, tal como entre 50-60°C. No obstante, bacterias con una temperatura significativamente inferior óptima bajas hasta aproximadamente la temperatura ambiente (alrededor de 20°C) son también conocidas.

45 [0047] Para la producción de etanol utilizando levadura, la fermentación se puede realizar durante 24 a 96 horas, en particular durante 35 a 60 horas. En una forma de realización la fermentación se realiza a una temperatura entre 20 a 40°C, preferiblemente 26 a 34°C, en particular alrededor de 32°C. La temperatura se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación, en una forma de realización el pH es de pH 3 a 7, por ejemplo, 3,5 a 6,4 a 5 y alrededor de 5.

[0048] Otros productos de fermentación se pueden fermentar a temperaturas conocidas por el experto en la materia que sean adecuadas para el organismo fermentador en cuestión.

50 [0049] Las condiciones de fermentación se determinen basadas en, por ejemplo, el tipo de material vegetal, los azúcares fermentables disponibles, el organismo u organismos de fermentación y/o el producto de fermentación deseado. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar condiciones de fermentación adecuadas. La fermentación puede según la invención efectuarse en condiciones usadas de forma convencional. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos anaeróbicos.

60 [0050] Los procesos de la invención se pueden realizar como un lote o como un proceso continuo. Las fermentaciones de la invención se pueden llevar a cabo en un sistema de ultrafiltración donde el producto retenido es mantenido en recirculación en presencia de sólidos, agua y el organismo fermentador, y donde el permeato es el producto de fermentación deseado que contiene líquido. Igualmente se contemplan procesos llevados a cabo en reactores de membrana continua con membranas de ultrafiltración y donde el producto retenido es mantenido en recirculación en presencia de sólidos, agua y el organismo u organismos de fermentación y donde el permeato es el producto de fermentación que contiene líquido.

65 [0051] Después de la fermentación, el organismo fermentador se puede separar del lodo fermentado y reciclado.

Medio de fermentación

[0052] La frase "medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al entorno donde se realiza la fermentación y comprende el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidratos que es metabolizada por el organismo u organismos de fermentación, y puede incluir el organismo u organismos de fermentación.

[0053] El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimuladores de crecimiento para el organismo u organismos de fermentación. Los nutrientes y estimuladores de crecimiento se han usado ampliamente en la técnica de la fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco, vitaminas y minerales o combinaciones de los mismos.

[0054] Tras la fermentación, los medios de fermentación o el medio de fermentación pueden comprender además el producto de fermentación.

Organismos fermentativos

[0055] El término "organismo fermentativo" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, incluyendo levadura y hongos filamentosos, adecuados para producir un producto de fermentación deseado. Los organismos fermentativos adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir azúcares fermentables, tales como glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa o arabinosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

[0056] Ejemplos de organismos fermentativos incluyen organismos fúngicos tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas del género *Saccharomyces*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis*, tal como *Pichia stipitis* CBS 5773 o *Pichia pastoris*; una cepa del género *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida arabinofermentans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis* o *Candida boldinii*. Otros organismos fermentativos incluyen cepas de *Hansenula*, en particular *Hansenula polymorpha* o *Hansenula anomela*; *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces fragilis* o *Kluyveromyces marxianus*; y *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*.

[0057] Organismos fermentativos bacterianos preferidos incluyen cepas de *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*, cepas de *Zymomonas*, en particular *Zymomonas mobilis*, cepas de *Zymobacter*, en particular *Zymobacter palmae*, cepas de *Klebsiella* en particular *Klebsiella oxytoca*, cepas de *Leuconostoc*, en particular *Leuconostoc mesenteroides*, cepas de *Clostridium*, en particular *Clostridium butyricum*, cepas de *Enterobacter*, en particular *Enterobacter aerogenes* y cepas de *Thermoanaerobacter*, en particular *Thermoanaerobacter* BG1L1 (Appl. Microbiol. Biotech. 77: 61-86) y *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum* o *Thermoanaerobacter mathranii*. Cepas de *Lactobacillus* están también previstas como son las cepas de *Corynebacterium glutamicum* R, *Bacillus thermoglucosidaisus* y *Geobacillus thermoglucosidesius*.

[0058] En una forma de realización, el organismo fermentador es un organismo fermentador de azúcar C6, tal como una cepa de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0059] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade al medio de fermentación de modo que el recuento de organismo fermentador viable, tal como levadura, por mL de medio de fermentación esté en el rango de 10^6 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , especialmente aproximadamente 5×10^7 .

[0060] La levadura es el organismo fermentador preferido para la fermentación de etanol. Preferidas son las cepas de *Saccharomyces*, especialmente las cepas de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente las cepas que son resistentes a niveles altos de etanol, es decir, hasta, por ejemplo, aproximadamente 10, 12, 15 o 20 % vol. o más de etanol.

[0061] La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, las levaduras RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponibles en Fermentis/Lesaffre, EE.UU.), FALI (disponible en Fleischmann's Yeast, EE.UU.), levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible en Ethanol Technology, WI, EE.UU.), BIOFERM AFT y XR (disponible en NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU.), GERT STRAND (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible en DSM Specialties).

[0062] Según la invención, el organismo fermentador capaz de producir un producto de fermentación deseado a partir de azúcares fermentables, incluyendo glucosa, fructosa, maltosa, xilosa, manosa o arabinosa, se cultiva preferiblemente bajo condiciones precisas en un índice de crecimiento particular. Cuando el organismo fermentador es introducido en/adiciona al medio de fermentación, el organismo fermentador inoculado pasa por varios estadios. Inicialmente no se produce crecimiento. Este periodo se denomina "fase de latencia" y se puede considerar un periodo de adaptación. Durante la fase siguiente denominada "fase exponencial" el índice de crecimiento aumenta gradualmente. Después de un periodo de crecimiento máximo el índice cesa y el organismo fermentador entra en "fase estacionaria". Después de otro periodo de tiempo el organismo fermentador entra en "fase de muerte" donde el número de células viables declina.

Productos de fermentación

5 [0063] El término "producto de fermentación" se refiere a un producto producido por un método o proceso que incluye la fermentación utilizando un organismo fermentador. Productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; 10 vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol de combustible; etanol bebible, es decir, licores neutros potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, *porters*, cerveza rubia, amargas, licores de malta, cerveza *happoushu*, cerveza alta en alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación de alcoholes. El producto de fermentación, tal como el etanol, obtenidos según la invención, se pueden usar preferiblemente como combustible. No obstante, en el caso del etanol éste también se puede usar como etanol potable.

20 Recuperación

[0064] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por destilación.

25 [0065] En particular, el medio de fermentación se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado se puede extraer del medio de fermentación por técnicas de filtración de membrana o micro. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por decapado. Métodos para recuperación se conocen bien en la técnica.

30 Materiales que contienen almidón

[0066] Cualquier materia prima que contenga almidón adecuada, incluyendo almidón granulado (almidón crudo no cocinado), se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente basada en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materias primas que contienen almidón, adecuadas para usar en procesos de la presente invención, incluyen cebada, alubias, mandioca, cereales, maíz, milo, guisantes, patatas, arroz, centeno, sagú, sorgo, batatas, tapioca, trigo y granos enteros o cualquier mezcla ha de los mismos. El material que contiene almidón también puede ser de un tipo ceroso o no ceroso de maíz y cebada.

40 Enzimas

[0067] Aunque no se menciona específicamente en el contexto de un proceso de la invención, debe entenderse que la enzima o enzimas se usan en una "cantidad efectiva".

45 Alfa-amilasa

[0068] Según la invención, cualquier alfa-amilasa se puede utilizar, tal como las de origen fúngico, bacteriano o vegetal. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa fúngica ácida o alfa-amilasa bacteriana ácida. El término "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene actividad óptima en un pH en la gama de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o de la forma más preferible de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

55 [0069] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana preferiblemente deriva del género *Bacillus*.

[0070] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* es derivada a partir de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, o *Bacillus subtilis*, pero también puede ser derivada a partir de otra especie de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* SEC ID n°: 5 en la WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEC ID n°: 4 en la WO 99/19467, y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEC ID n°: 3 en la WO 99/19467. En una forma de realización, la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, por ejemplo, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% con cualquiera de las secuencias mostradas en la SEC ID n°: 3, 4 o 5, respectivamente, en la WO 99/19467.

65

[0071] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrida, especialmente la descrita en cualquiera de la WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/80059 y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa específica se describe en las patentes de EE.UU. números 6.093.562, 6.187.576 y 6.297.038 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) que tienen una eliminación de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una eliminación doble descrita en la WO 96/23873 - véase, por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* expuesta en la SEC ID n°: 3 descrita en la WO 99/19467 o la eliminación de los aminoácidos R179 y G180 usando la SEC ID n°: 3 en la WO 99/19467 para numeración. Más preferidas incluso son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una eliminación doble que se corresponde con delta(181-182) y además comprenden una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEC ID n°: 3 descrita en la WO 99/19467.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0072] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos de C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en SEC ID n°: 4 de la WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos de N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en SEC ID n°: 5 de la WO 99/19467), con una o más, especialmente todas, las siguientes sustituciones: G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en SEC ID n°: 4 de la WO 99/19467). También se prefieren las variantes que tienen una o más de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras estructuras de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o la eliminación de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente la eliminación de E178 y G179 (usando SEC ID n°: 5 de la WO 99/19467 para numeración de posición).

[0073] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se dosifica en una cantidad de 0,0005-5 KNU por g de DS (sólidos secos), preferiblemente 0,001-1 KNU por g de DS, tal como alrededor de 0,050 KNU por g de DS:

Alfa-amilasas fúngicas

[0074] Alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tales como alfa-amilasas de *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*.

[0075] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa que muestra una identidad alta, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°: 10 en la WO 96/23874.

[0076] Otra alfa-amilasa ácida preferida está derivada de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa fúngica ácida es una de *Aspergillus niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TeEMBL con el número de registro primario P56271 y descrito en la WO 89/01969 (Ejemplo 3). Una alfa-amilasa fúngica ácida disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0077] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas incluyen las derivadas a partir de una cepa de *Meripilus* y *Rhizomucor*, preferiblemente una cepa de *Meripilus giganteus* o *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178).

[0078] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa es derivada de *Aspergillus kawachii* y descrita por Kaneko *et al.*, 1996, J. Ferment. Bioeng. 81; 292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL: #AB008370.

[0079] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprenda un dominio de unión al almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, no híbrido), o una variante de los mismos. En una forma de realización, la alfa-amilasa de tipo salvaje es derivada de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-amilasas híbridas fúngicas

[0080] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las descritas en la WO 2005/003311, publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0054071 (Novozymes) y la WO 2006/069290 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico (CD) de alfa-amilasa y un dominio/módulo de enlace a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón, y opcionalmente un enlazador.

[0081] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas incluyen los descritos en las tablas 1 a 5 de los ejemplos en la WO 2006/069290, incluyendo la variante Fungamyl con el dominio catalítico JA118 y el SBD de *Athelia rolfsii*. Alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG y SBD de *Athelia rolfsii*, alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con

enlazador de glucoamilasa y SBD de *Aspergillus niger* (que se describe en la tabla 5 como una combinación de secuencias de aminoácidos de SEC ID n°: 20, SEC ID n°: 72 y SEC ID n°: 96 en la solicitud de EE.UU. n° 11/316,535) o como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290, y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID n°: 102 en la WO 2006/069290). Otras alfa-amilasas híbridas están catalogadas en las tablas 3, 4, 5 y 6 del ejemplo 4 en la solicitud de EE.UU. n° 11/316,535 y la WO 2006/069290.

[0082] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0054071, incluyendo los descritos en la tabla 3 de la página 15, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

[0083] Otras alfa-amilasas muestran un alto grado de identidad de secuencia con cualquiera de las alfa-amilasas mencionadas anteriormente, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzima madura descritas anteriormente.

[0084] Una alfa-amilasa ácida se puede añadir, según la invención en una cantidad de 0,001 a 10 AFAU/g de DS, preferiblemente de 0,01 a 5 AFAU/g de DS, especialmente de 0,3 a 2 AFAU/g de DS o de 0,001 a 1 FAU-F/g de DS, preferiblemente de 0,01 a 1 FAU-F/g de DS.

Productos de alfa-amilasa comerciales

[0085] Composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X, LIQUOZYME™ SC y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ DELTA AA, GC358, GC980 y SPEZYME™ RSL (Danisco A/S), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida con el nombre comercial SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

Enzima generadora de fuente de carbohidratos

[0086] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye glucoamilasa (un generador de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (ambos generadores de maltosa) y también pululanasa y alfa-glucosidasa. Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que puede ser usado como una fuente de energía por el organismo u organismos de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como etanol. El carbohidrato generado se puede convertir directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención, una mezcla de enzimas generadores de fuente de carbohidratos se pueden utilizar. Mezclas especialmente contempladas son mezclas que comprenden al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, incluso más preferida una alfa-amilasa fúngica ácida.

[0087] La proporción entre actividad de glucoamilasa (AGU) y actividad de alfa-amilasa fúngica ácida (FAU-F) (es decir, AGU por FAU-F) puede en una forma de realización preferida de la invención estar entre 0,1 y 100 AGU/FAU-F, en particular entre 2 y 50 AGU/FAU-F, tal como en la gama de 10-40 AGU/FAU-F, especialmente cuando se hace en una fermentación de una única fase (hidrólisis de almidón crudo - RSH), es decir, cuando la sacarificación del paso (a) y la fermentación del paso (b) se realizan simultáneamente (es decir, sin un paso de licuefacción).

[0088] En un proceso de almidón a etanol convencional (es decir, incluyendo un paso de licuefacción (a)) la proporción puede ser preferiblemente tal y como se define en la EP 140,410-B1, especialmente cuando la sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente.

Glucoamilasas

[0089] Una glucoamilasa puede ser derivada a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada a partir de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 o G2 (Boel *et al.*, 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como las descritas en la WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en la WO 84/02921, glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Hata *et al.*, 1991, Agric. Biol. Chem. 55(4): 941-949) o variantes o fragmentos de los mismos. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen *et al.*, 1996, Prot. Eng. 9: 499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al.*, 1995, Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen *et al.*, 1994, Biochem. J. 301: 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe *et al.*, 1996, Biochemistry 35: 8698-8704); e introducción de Pro residuos en la posición A435 y S436 (Li *et al.*, 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204).

[0090] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (anteriormente denominado *Corticium rolfsii*) (véase patente de EE.UU. n° 4.727.026 y (Nagasaka *et al.*, 1998, Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces duponti*, *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE.UU. n° Re. 32.153) y *Talaromyces thermophilus* (patente de EE.UU. n° 4.587.215).

[0091] Glucoamilasas bacterianas incluyen glucoamilasas de *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135138) y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831). *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea* y *Leucopaxillus giganteus*, todas descritas en la WO 2008/069289; o *Peniophora rufomarginata* descritas en PCT/US2007/066618; o una mezcla de las mismas. Una glucoamilasa híbrida se puede utilizar en la presente invención. Ejemplos de glucoamilasas híbridas se describe en la WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1.

[0092] La glucoamilasa puede tener un alto grado de identidad de secuencia con cualquiera de las glucoamilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzimas maduras mencionadas anteriormente.

[0093] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U, SPIRIZYME ULTRA™ y AMG™ E (de Novozymes A/S, Dinamarca); OPTIDEX™ 300, GC480™ y GC147™ (de Genencor Int., EE.UU.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

[0094] Glucoamilasas se pueden añadir en una cantidad de 0,02-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g de DS, especialmente entre 0,1-5 AGU/g de DS, tal como 0,1-2 AGU/g de DS, tal como 0,5 AGU/g de DS o en una cantidad de 0,0001-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,001-10 AGU/g de DS, especialmente entre 0,01-5 AGU/g de DS, tal como 0,1-2 AGU/g de DS.

Beta-amilasas

[0095] Una beta-amilasa (E.C 3.2.1.2) es el nombre generalmente dado a las amilasas maltogénicas exoactuantes, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en la amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados. Se retiran unidades de maltosa sucesivamente de los extremos de cadena no reductores de una manera gradual hasta que la molécula se degrada o, en el caso de la amilopectina, hasta que se alcanza un punto de derivación. La maltosa liberada tiene la configuración beta-anomérica, de ahí el nombre beta-amilasa.

[0096] Las beta-amilasas se han aislado a partir de varias plantas y microorganismos (Fogarty y Kelly, 1979, Progress in industrial Microbiology 15: 112-115). Estas beta-amilasas se caracterizan por tener una temperatura óptima en la gama de 40°C a 65°C y un pH óptimo en la gama de 4,5 a 7. Una beta-amilasa disponible comercialmente de cebada es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EE. UU.

Amilasas maltogénicas

[0097] La amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina a maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible en Novozymes A/S. Alfa-amilasas maltogénicas se describen en patente de EE.UU. n°: 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628.

[0098] La amilasa maltogénica se puede añadir en una forma de realización preferida en una cantidad de 0,05- 5 mg total proteína/gramo de DS o 0,05- 5 MANU/g de DS.

Fitasas

[0099] Cualquier fitasa se puede utilizar en un proceso de la presente invención. Las fitasas son enzimas que degradan los fitatos y/o ácido fítico hidrolizando específicamente el enlace de éster entre inositol y fósforo. La actividad de fitasa se acredita con fósforo y disponibilidad iónica en muchos ingredientes. En algunas formas de realización, la fitasa es capaz de liberar al menos un fosfato inorgánico a partir de un hexafosfato de inositol (por ejemplo, ácido fítico). Las fitasas se pueden reagrupar según su preferencia por una posición específica del grupo de éster de fosfato de la molécula de fitato en la que la hidrólisis se inicia (por ejemplo, 3-fitasa (EC 3.1.3.8) o 6-fitasa (EC 3.1.3.26). Un ejemplo de fitasa es mio-inositol-hexaquisfosfato-3-fosfohidrolasa.

[0100] Las fitasas se pueden obtener a partir de microorganismos tales como organismos fúngicos y bacterianos. Por ejemplo, la fitasa se puede obtener a partir de hongos filamentosos tales como *Aspergillus* (p. ej., *A. ficuum*, *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. terreus*), *Cladosporium*, *Mucor* (por ejemplo, *Mucor piriformis*), *Myceliophthora* (por ejemplo, *M. thermophila*), *Penicillium* (por ejemplo, *P. hordel* (ATCC n° 22053), *P. piceum* (ATCC n° 10519) o *P. brevi-compactum* (ATCC n° 48944), *Talaromyces* (por ejemplo, *T. thermophilus*), *Thermomyces* (WO 99/49740) y *Trichoderma spp.* (por ejemplo, *T. reesei*).

[0101] En una forma de realización, la enzima de degradación de fitato se obtiene a partir de levadura (por ejemplo, *Arxula adenivorans*, *Pichia anomala*, *Schwanniomyces occidentalis*), bacterias gram-negativas (por ejemplo,

Escherichia coli, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*) y bacterias gram-positivas (por ejemplo, *Bacillus spp.* tales como *Bacillus subtilis*).

[0102] La fitasa también se puede obtener a partir de *Citrobacter*, *Enterbacter* o *Penlophora*.

[0103] En una forma de realización, la fitasa es derivada de *Buttiauxiella spp.* tal como *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferregutiae*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae* y *B. warmboldiae*. En algunas formas de realización, la fitasa es una fitasa descrita en la WO 2006/043178 o la solicitud de EE.UU. n° 11/714, 487.

[0104] En una forma de realización preferida, la fitasa tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% y al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID n°: 31 de la solicitud de EE.UU. n° 12/263.886.

[0105] Fitasas disponibles comercialmente son NATUPHOS (BASF), RONOZYME P (Novozymes A/S), PHZYME (Danisco A/S, Diversa) y FINASE (AB Enzymes). El método para determinar la actividad de fitasa microbiana y la definición de una unidad de fitasa se describe en Engelen *et al.*, 1994, Journal of AOAC International 77: 760-764. La fitasa puede ser una fitasa de tipo salvaje, una variante activa o fragmento activo de la misma.

Pululanasa

[0106] Cualquier pululanasa se puede utilizar en un proceso de la presente invención. En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa GH57, por ejemplo, una pululanasa obtenida a partir de una cepa de *Thermococcus*, incluyendo *Thermococcus sp.* AM4, *Thermococcus sp.* HJ21, *Thermococcus barophilus*, *Thermococcus gammatolerans*, *Thermococcus hydrothermalis*; *Thermococcus kodakarensis*, *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus onnurineus*; o de una cepa de *Pyrococcus*, tal como *Pyrococcus abissi* y *Pyrococcus furiosus*.

Proteasas

[0107] Se puede añadir una proteasa durante la sacarificación, fermentación, sacarificación y fermentación simultáneas. La proteasa puede ser cualquier proteasa. En una forma de realización preferida, la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen fúngico o bacteriano. Se prefiere una proteasa fúngica ácida, pero también se pueden usar otras proteasas.

[0108] Proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

[0109] La proteasa fúngica ácida puede ser derivada de *Aspergillus*, *Candida*, *Cariolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. En particular, la proteasa puede ser derivada de *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), *Aspergillus awamori* (Hayashida *et al.*, 1977, Agric. Biol. Chem. 42(5), 927-933), *Aspergillus niger* (véase, por ejemplo, Koaze *et al.*, 1964, Agr. Biol. Chem. Japan 28: 216), *Aspergillus saitoi* (véase, por ejemplo, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japan 28: 66), o *Aspergillus oryzae*, tal como la proteasa pepA; y proteasas ácidas de *Mucor miehei* o *Mucor pusillus*.

[0110] La proteasa puede ser una proteasa neutra o alcalina, tal como una proteasa derivada a partir de una cepa de *Bacillus*. Una proteasa particular se deriva a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible en el Swissprot con n° de registro P08832. Las proteasas pueden tener al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos obtenible en el Swissprot con número de registro P06632, tal como al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o particularmente al menos 99% de identidad.

[0111] La proteasa puede tener al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID n°: 1 en la WO 2003/048353, tal como al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o particularmente al menos 99% de identidad.

[0112] La proteasa puede ser una proteasa de tipo papaína seleccionada del grupo que consiste en las proteasas dentro de E.C. 3.4.22.* (proteasa de cisteína), tal como EC 3,4,22,2 (papaína), EC 3,4,22,6 (quimopapaína), EC 3.4.22.2 (asclepapaína), EC 3.4.22.14 (actinidapaína), EC 3.4.22.15 (catepsina L), EC 3.4.22.25 (glicil endopeptidasa) y EC 3.4.22.30 (caricaína).

[0113] En una forma de realización, la proteasa es una preparación de proteasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización, la proteasa se deriva de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor miehei*. En otra forma de realización contemplada, la proteasa es una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, y una proteasa derivada de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor miehei*.

[0114] Proteasas de ácido aspártico se describen en, por ejemplo, Handbook of Proteolytic Enzymes, Edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Chapter 270. Ejemplos adecuados de proteasas de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, los descritos en Berka *et al.*, 1990, Gene 96: 313; Berka *et al.*, 1993, Gene 125: 195-198; y Gomi *et al.*, 1993, Biosol. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

5

[0115] Productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, FLAVOURZYME™, PROMIX™, NEUTRASE®, RENNILASE®, NOVOZYM™ FM 2,0L y iZyme BA (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106™ y SPEZYME™ FAN de Genencor Int., Inc., EE. UU.

10

[0116] La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001-1 mg de proteína enzimática por g de DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 mg de proteína enzimática por g de DS. Alternativamente, la proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001 a 1 LAPU/g de DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 LAPU/g de DS y/o 0,0001 a 1 mAU-RH/g de DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 mAU-RH/g de DS.

15

Materiales y métodos

Métodos:

Identidad

20

[0117] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias polinucleótidas es descrita por el parámetro "identidad".

25

[0118] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el programa informático LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización del espacio de 10 y penalización de longitud del espacio de 10. Parámetros de alineamiento de pareja son Ktuple=1, penalización de espacio=3, ventanas=5 y diagonales=5.

30

[0119] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias polinucleótidas se determina por el método Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) utilizando el programa informático LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización del espacio de 10 y penalización de longitud del espacio de 10. Los parámetros de alineamiento de pareja son Ktuple=3, penalización del espacio=3 y ventanas=20.

35

Actividad de glucoamilasa

[0120] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades de glucoamilasa (AGU).

40

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0121] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4,3, sustrato; maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

45

[0122] Se puede utilizar un sistema autoanizador. Se añade mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

50

Incubación AMG:	
Substrato:	maltosa 23,2 mM
Tampón:	acetato 0,1 M
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Rango de trabajo de enzima:	0,5-4,0 AGU/mL

55

60

65

Reacción de color:	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0,21 mM
Tampón:	fosfato 0,12 M; 0,15 M NaCl
pH:	7.60 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

5 [0123] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se hace más débil y cambia gradualmente a marrón rojizo, que se compara con una muestra de vidrio coloreada.

10 [0124] Una Unidad Kilo Novo (KNU) de amilasa alfa se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M de Ca²⁺; y pH 5,6) dextriniza 5.260 mg de sustancia seca de almidón soluble Merck Amylum.

15 Actividad de alfa-amilasa ácida

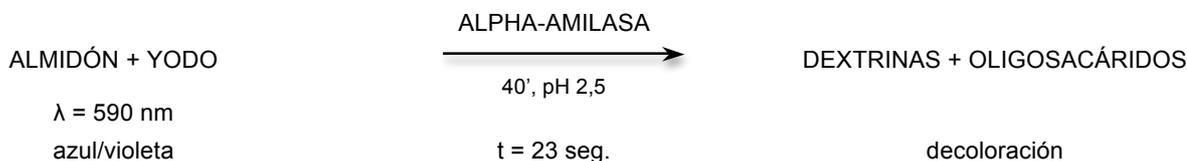
[0125] Cuando se usa según la presente invención, la actividad de una alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida) o FAU-F.

20 Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0126] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con respecto a un estándar enzimático. 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5.260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándar mencionadas más adelante.

25 [0127] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes. La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción de la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.

30



35

Condiciones estándar/condiciones de reacción:	
Substrato:	Almidón soluble, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/L
CaCl ₂ :	1.85 mM
pH:	2.50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40° C

Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Rango de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

Determinación de FAU-F

- 5 [0128] FAU-F unidades de alfa-amilasa fúngica (Fungamyl) se mide con respecto a un estándar enzimático de una fuerza declarada,

Condiciones de reacción	
Temperatura	37° C
pH	7,15
Longitud de onda	405 nm
Tiempo de reacción	5 min
Tiempo de medición	2 min

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

[0129] La actividad proteolítica se puede determinar con hemoglobina desnaturalizada como sustrato. En el método Anson-Hemoglobin para la determinación actividad proteolítica hemoglobina desnaturalizada es digerida, y la hemoglobina no digerida se precipita con ácido trihaloroacético (ATC). La cantidad de producto soluble de ATC se determina con reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y triptófano.

[0130] Una unidad de Anson (AU-RH) se define como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (es decir, 25°C, pH 5,5 y 10 minutos de tiempo de reacción) digiere hemoglobina en un índice inicial de manera que se libere por minuto una cantidad de producto soluble de ATC que de el mismo color con reactivo de fenol que un miliequivalente de tirosina.

[0131] El método AU(RH) se describe en EAL-SM-0350 y está disponible en Novozymes A/S, Dinamarca bajo pedido.

- 25 Método de ensayo de proteasa (LAPU)

[0132] 1 Unidad de Leucina Amino Peptidasa (LAPU) es la cantidad de enzima que descompone 1 microM de sustrato por minuto en las siguientes condiciones: 26 mM de L-leucina-p-nitroanilida como sustrato, 0,1 M tampón de Tris (pH 8,0), 37°C, 10 minutos de tiempo de reacción.

- 30 [0133] LAPU se describe en EB-SM-0298,02/01 disponible en Novozymes A/S Dinamarca, bajo pedido.

Determinación de actividad de amilasa maltogénica (MANU)

[0134] Una MANU (Unidad Novo de amilasa maltogénica) se puede definir como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de maltosa por minuto a una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378) por ml de 0,1 M tampón de citrato, pH 5,0 a 37°C durante 30 minutos.

Materiales

- 40 [0135] Alfa-amilasa A (AA): alfa-amilasa híbrida que consiste en alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S). Glucoamilasa (GA): glucoamilasa derivada de *Trametes cingulata* descrita en SEC ID n°: 2 en la WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S. Levadura: RED STAR™ disponible de Red Star/Lesaffre, EE.UU.

45 Ejemplos

Ejemplo 1. Efecto de la adición de piridoxamina en el rendimiento de etanol en la fermentación de puré de maíz licuado

- 50 [0136] Piridoxamina (Sigma #P9380) se evaluó para su capacidad de aumentar los rendimientos de etanol a partir de puré de maíz hecho en laboratorio cuando se añadía en el momento de la licuefacción o al principio de la fermentación.

5 [0137] Se hicieron purés licuados usando maíz y agua de proceso obtenidos a partir de una planta de etanol comercial en el Medio-Oeste de los Estados Unidos (Corn LP, Goldfield, IA). Todos los purés contenían 32% de sólidos secos (DS) y fueron licuados a un pH de 5,8 durante 120 minutos al baño maría a 85°C, usando el producto de alfa-amilasa Liquozyme SC DS (Novozymes) a una dosis de 0,02% p/p de maíz. Los purés experimentales se trataron con piridoxamina en dosis de 10 microgramos/g de DS y 50 microgramos/g de DS de piridoxamina en 110 g de puré. Durante la licuefacción, los purés se agitaron enérgicamente cada 2 minutos durante los primeros 20 minutos y nuevamente a intervalos de 30 minutos hasta que el tiempo total de licuefacción igualó las 2 horas. Todos los purés se congelaron luego durante toda la noche.

10 [0138] A cada puré descongelado, se añadió urea en una concentración final de 1.000 ppm, y se añadió penicilina en una concentración final de 3 ppm. Para probar los efectos de piridoxamina en la sacarificación y fermentación simultánea (SSF), partes alícuotas separadas de puré licuado se dosificaron con 10 microgramos/g de DS y 50 microgramos/g de DS de piridoxamina, respectivamente. Los purés fueron fermentados de la siguiente manera:

15 [0139] Para fermentación, entre 4 y 5 gramos de cada puré se añadió a 6 tubos prepesados por tratamiento. Cada tubo tenía un agujero taladrado en su tapa para permitir la liberación de CO₂. Cien microlitros de levadura Fermentis Red Star (5,5 g de levadura en 100 mL de agua del grifo incubada a 32°C durante 30 minutos) se añadió a cada tubo, y el producto de glucoamilasa Spirizyme Ultra™ (Novozymes) se añadió a cada tubo para conseguir una dosis de 0,5 AGU/g de DS.

20 [0140] Después de 24 horas, se sacrificó una copia de cada puré para análisis por HPLC usando 50 microlitros de 40% v/v H₂SO₄. Los tubos fueron centrifugados a 1500 x g durante 10 minutos, y los sobrenadantes fueron filtrados usando filtros de jeringa de Whatman con membranas de 0,45 micras, luego diluidos 1: 5 para análisis HPLC. Las muestras restantes se sacrificaron después de 54 horas de la misma manera pero fueron sometidas a análisis de HPLC sin dilución. Se midieron las concentraciones de etanol y de oligosacáridos por HPLC utilizando una columna HPX-87H (Blo-Rad) calentada a 65°C con un fase móvil de 5 mM de ácido sulfúrico a una velocidad de flujo de 0,6 ml/mln, con detección de índice de refracción a 50°C.

30 [0141] Los resultados de dos experimentos separados se muestran en las tablas a continuación.

Tratamiento	Dosis	Punto de adición	EtOH, p/v %	*Nivel
Control	0		11,86	B
Piridoxamina	10	Liq	12,19	A
Piridoxamina	50	Liq	12,23	A
Piridoxamina	10	SSF	11,89	B
Piridoxamina	50	SSF	11,79	B
Tratamiento	Dosis	Punto de adición	EtOH, p/v %	*Nivel
Control	0		11,84	B
Piridoxamina	10	Liq	12,01	A
Piridoxamina	50	Liq	11,86	B
Piridoxamina	10	SSF	11,75	C
Piridoxamina	50	SSF	11,75	C
*Los niveles indican importancia estadística: los resultados en un experimento que comparten una letra no son estadísticamente diferentes uno de otro.				

35 [0142] Tres de los cuatro resultados (ambas dosis de 10 microgramos/g de DS y una dosis de 50 microgramos/g de DS de piridoxamina) demuestran que la adición de piridoxamina al comienzo de la licuefacción del puré de maíz dio como resultado un aumento estadístico significativo en el rendimiento de etanol. La adición de piridoxamina al comienzo de la SSF (después de la licuefacción) no supuso un aumento en el rendimiento de etanol.

REIVINDICACIONES

1. Proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:
- 5 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación; y
- 10 (c) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador.
2. Proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende:
- 15 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa;
- (c) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación; y
- 20 (d) fermentación del azúcar utilizando un organismo fermentador para producir el producto de fermentación.
3. Proceso de producción de un azúcar, que comprende:
- 25 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en una dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina; y
- (b) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación.
4. Proceso de producción de un azúcar, que comprende:
- 30 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina;
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa; y
- 35 (c) sacarificación de la dextrina en un azúcar con una enzima de sacarificación.
5. Proceso según la reivindicación 3 o 4, donde el azúcar es maltosa o glucosa.
6. Proceso de producción de un dextrina, que comprende:
- 40 (a) licuefacción de un material que contiene almidón en la dextrina con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina.
7. Proceso de producción de una dextrina, que comprende:
- 45 (a) tratamiento de un material que contiene almidón con una alfa-amilasa en presencia de piridoxamina; y
- (b) licuefacción del material que contiene almidón tratado en una dextrina con una alfa-amilasa.
- 50 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la piridoxamina está presente en una cantidad de 1-100 microgramos/g de sólidos secos.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde el material que contiene almidón se trata con una alfa-amilasa a una temperatura de 20-75°C.
- 55 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el material que contiene almidón o el material que contiene almidón licuado tratado se licua en una dextrina a una temperatura de 65-110°C.
- 60 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la licuefacción se realiza en presencia de una fitasa, una pululanasa y/o una isoamilasa.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la enzima de sacarificación es una beta-amilasa, glucoamilasa o alfa-amilasa maltogénica.
- 65 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la sacarificación y/o la fermentación se realizan en presencia de una proteasa.

14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la sacarificación se realiza a una temperatura en el rango de 20-75°C.
- 5 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además una pre-sacarificación antes de la sacarificación.
16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente.
- 10 17. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el producto de fermentación se selecciona del grupo que consiste en alcoholes, ácidos orgánicos, cetonas, gases, antibióticos, enzimas, vitaminas y hormonas.