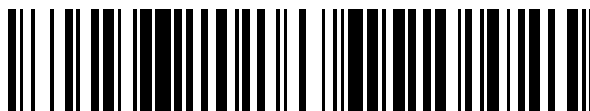


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 750**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12G 3/02 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2003 E 10180881 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2295545**

54 Título: **Composiciones y métodos de fermentación**

30 Prioridad:

26.09.2002 US 413730 P

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

13.07.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (100.0%)
77 Perry Chapel Church Road
Franklinton, North Carolina 27525, US**

72 Inventor/es:

GRICHCKO, VARVARA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 540 750 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

Composiciones y métodos de fermentación

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a métodos y composiciones enzimáticos para producir productos de fermentación, incluidos los métodos y composiciones para mejorar el rendimiento de la levadura durante los procesos de fermentación.

10

Antecedentes de la invención

15

[0002] Los procesos de fermentación se utilizan para hacer un gran número de productos comerciales, incluidos los alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H₂ y CO₂), y compuestos más complejos, incluidos, por ejemplo, los antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, beta-caroteno); hormonas, y otros compuestos que son difíciles de producir sintéticamente. Los procesos de fermentación se usan también comúnmente en el alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino), en la industria lechera (p. ej., en la producción de yogur y queso), en la industria del cuero, y del tabaco.

20

[0003] EP1122303A1 describe un proceso para producir cerveza que tiene estabilidad de sabor mejorada por adición de un eliminador de oxígeno, tal como enzima de lacasa antes de y/o durante la fase de maceración de la fermentación.

25

[0004] Hay una necesidad de mejorar adicionalmente los procesos de fermentación y de procesos mejorados que incluyan una fase de fermentación.

Resumen de la invención

30

[0005] Se describen métodos y composiciones para producir un producto de fermentación. Se describen métodos y composiciones para mejorar el rendimiento de la levadura durante procesos de fermentación, incluyendo el nivel y/o el rendimiento del proceso de fermentación. Se describen métodos y composiciones para producir etanol.

35

[0006] Un aspecto de la invención proporciona un método para producir etanol a partir de material que contiene almidón, comprendiendo el método un paso de fermentación, que comprende un el contacto con un microorganismo en fermentación o medios de fermentación usados en el paso de fermentación con al menos una lacasa (EC 1.10.3.2), donde el material que contiene almidón es seleccionado del grupo que consiste en tubérculos, raíces, granos enteros, maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo o cereales. La lacasa se aplica en una cantidad efectiva durante la fermentación y/o la lacasa se aplica en una cantidad efectiva antes de la fermentación, tal como durante la propagación de microorganismos de fermentación. Aunque no limitados a ninguna teoría de operación, se cree que el uso de al menos una lacasa en el proceso de fermentación promueve la oxigenación de inhibidores y depleción de oxígeno, de forma tal que promueve la creación de un ambiente anaeróbico más adecuado para los microorganismos de fermentación.

40

45

[0007] En una forma de realización preferida, los procesos fermentativos de la presente invención se usan en combinación con un proceso de licuefacción y/o un proceso de sacarificación, en los que se usan actividades enzimáticas adicionales, tales como, la actividad alfa-amilasa y glucoamilasa para el procesamiento del sustrato de almidón.

50

[0008] Otro aspecto más de la presente invención se refiere a la adición de estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentativos en combinación con procesos enzimáticos descritos aquí para mejorar más los procesos de fermentación. Estimuladores preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales.

Descripción detallada de la invención

55

[0009] "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o a cualquier proceso que comprende una fase de fermentación usada para producir etanol. Los procesos de fermentación también incluyen los procesos de fermentación usados en la industria del alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino),

60

[0010] "Medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al entorno en el que se realiza la fermentación y que incluye el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidrato (es decir, el material que contiene almidón seleccionado del grupo que consiste en tubérculos, raíces, granos enteros, maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo

o cereales que es metabolizado por el microorganismo fermentativo. Los medios de fermentación, incluso el sustrato de fermentación y otras materias primas usadas en el proceso de fermentación pueden ser procesados, p. ej., para procesos de trituración, licuefacción y sacarificación u otros procesos deseados antes del proceso de fermentación o simultáneamente con el mismo. Por consiguiente, los medios de fermentación pueden referirse a los medios antes de que sean añadidos los microorganismos fermentativos, tales como, los medios de un proceso de licuefacción o de sacarificación o resultantes del mismo, así como los medios que comprenden los microorganismos fermentativos, tales como, los medios usados en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo (SSF).

[0011] Los medios de fermentación o sustrato de fermentación pueden también comprender grano de cereal desgerminado, preferiblemente maíz desgerminado, es decir endosperma y maíz torrefactado (p. ej., maíz termotratado y palomitas) o cualquier otro cereal. El grano de cereal puede ser molido o puede ser fermentado en su totalidad.

[0012] "Microorganismo fermentativo" se refiere a cualquier microorganismo adecuado para el uso en un proceso de fermentación deseado para producir etanol. Los microorganismos fermentativos adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convierten los azúcares, tales como la glucosa o la maltosa, directa o indirectamente en etanol. Ejemplos de microorganismos fermentativos incluyen organismos fúngicos, tales como la levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Sacchromyces spp.*, y en particular, *Sacchromyces cerevisiae*. La levadura comercialmente disponible incluye, p. ej., Red Star® Lesaffre Ethanol Red (disponible por Red Star/Lesaffre, EEUU) FALI (disponible por Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EEUU), SUPERSTART (disponible por Alltech), GERT STRAND (disponible por Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible por DSM Specialties).

[0013] Los sustratos para uso en el proceso de la presente invención son tubérculos, raíces, granos enteros, maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo o cereales.

[0014] Los procesos de fermentación descritos en la presente se usan preferiblemente en combinación con procesos de licuefacción o de sacarificación. Cualquier licuefacción o sacarificación puede ser usado en combinación con el proceso de fermentación de la presente invención. Según la presente invención, la sacarificación y licuefacción puede ser realizada simultáneamente o separadamente con el proceso de fermentación. En una forma de realización preferida de la presente invención, los procesos de licuefacción, sacarificación y fermentación son realizados simultáneamente.

[0015] "Licuefacción" es un proceso en el que la materia prima del grano molido (entero) se descompone (hidroliza) en maltodextrinas (dextrinas). La licuefacción se realiza frecuentemente como un proceso de pasta caliente en tres fases. La pasta se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y las enzimas son agregadas para iniciar la licuefacción (disolución). La pasta es luego cocida a chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C para completar la gelatinización de la pasta. Luego la pasta es enfriada a 60-95°C y más enzima(s) es(son) añadida(s) para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a pH 4.5-6.5, en particular a un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados son conocidos como una trituración.

[0016] Los procesos de licuefacción se realizan normalmente usando una alfa-amilasa. Las alfa-amilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano. Más preferiblemente, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Bacillus*, como por ejemplo, derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. Otras alfa-amilasas incluyen la alfa-amilasa derivada de una cepa de *Bacillus sp.* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas ellas están descritas con detalle en WO 95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31. Otras variantes e híbridos de la alfa-amilasa están descritos en WO 96/23874, WO 97/41213, y WO 99/19467. Otras alfa-amilasas incluyen las alfa-amilasas derivadas de una cepa de *Aspergillus*, tales como, las alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*.

[0017] En una forma de realización preferida, la alfa amilasa es una alfa-amilasa ácida. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que cuando se añade en una cantidad eficaz tiene actividad a un pH en la gama de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 3.5 a 6.0, o más preferiblemente de 4.0-5.0. Cualquier alfa-amilasa ácida adecuada puede ser usada en la presente invención.

[0018] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida es una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana. La alfa-amilasa ácida preferido para el uso en la presente invención puede ser derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. Más preferiblemente, la alfa-amilasa ácida es una alfa amilasa ácida fúngica, tal como, SP 288 (disponible por Novozymes).

[0019] Las composiciones comerciales preferidas comprendiendo alfa-amilasa incluyen MYCOLASE (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE L-40,000, DEX-LO™, SPEYME FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.).

- [0020] La alfa-amilasa puede ser añadida en cantidades como aquellas que son bien conocidas en la técnica. Cuando se miden en unidades AAU la actividad alfa-amilasa ácida está preferiblemente presente en una cantidad de 5-500000 AAU/kg de DS, en una cantidad de 500-50000 AAU/kg de DS, o más preferiblemente en una cantidad de 100-10000 AAU/kg de DS, tal como 500-1000 AAU/kg DS. La alfa-amilasa ácida fúngica se añade preferiblemente en una cantidad de 10-10000 AFAU/kg de DS, en una cantidad de 500-2500 AFAU/kg de DS, o más preferiblemente en una cantidad de 100-1000 AFAU/kg de DS, tal como aproximadamente 500 AFAU/kg DS.
- [0021] "Sacarificación" es un proceso en el que la maltodextrina (tal como se produce en el proceso de licuefacción) se convierte en azúcares DP₁₋₃ de bajo peso molecular (es decir, fuente de carbohidratos) que pueden ser metabolizados por el organismo fermentativo, tal como, la levadura. Los procesos de sacarificación son bien conocidos en la técnica y son normalmente realizados enzimáticamente usando una glucoamilasa. De forma alternativa o adicional, se pueden usar las alfa-glucosidasas o las alfa-amilasas ácidas. Un proceso de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, y es frecuentemente realizado a temperaturas de aproximadamente 30 a 65 grados Celsius, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4.5. No obstante, es frecuentemente más preferido hacer una fase de presacarificación, que dure aproximadamente 40 a 90 minutos, a temperatura de entre 65°C 30, normalmente aproximadamente 60°C, seguida de una sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y de fermentación simultáneo (SSF).
- [0022] La glucoamilasa usada en el proceso de sacarificación puede ser derivada de cualquier fuente adecuada, p. ej., derivada 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 G1 o G2 de *A. Niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tales como aquellas descritas en WO 92/00381 y WO 00/04136; la glucoamilasa de *A. awamori* (WO 84/02921), *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas.
- [0023] Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes para aumentar la termoestabilidad, tales como, G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Engng. 9,499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Engng. 8, 575- 582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Engng. 10, 1199-1204. Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular, derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente US no. Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente US no. 4,587,215). Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).
- [0024] Composiciones comercialmente disponibles comprendiendo glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L.SAN™ SUPER, SAN EXTRA L, SPIRIZYME PLUS y AMG™ E (de Novozymes A/S); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); OPTIDEX™ 300, G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).
- [0025] Las glucoamilasas pueden en una forma de realización ser añadidas en una cantidad de 0,02-2 AGU/g DS, preferiblemente 0,1-1 AGU/g DS, tal como 0,2 AGU/g DS.
- [0026] El proceso usado más extensamente en la producción de etanol es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneo (SSF), donde no hay ninguna fase de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentativo, tal como la levadura, y la(s) enzima(s) se añaden juntos. En procesos SSF, es común introducir una fase de presacarificación a una temperatura por encima de 50°C, justo antes de la fermentación.
- [0027] Más preferiblemente, el proceso de licuefacción, sacarificación o fermentación es un proceso de licuefacción-sacarificación-fermentación simultáneo (LSF) también denominado proceso único enzimático, en el que el proceso de licuefacción, sacarificación y fermentación se realiza en un proceso, es decir, todas las enzimas (o agentes no enzimáticos sustituibles o adicionales) y la levadura usada para licuefacción, sacarificación y fermentación, por consiguiente, son agregados en la misma fase del proceso, más preferiblemente, simultáneamente en la misma fase del proceso. Las condiciones del proceso preferidas para el proceso LSF incluyen temperaturas de aproximadamente 26°C a 40°C, preferiblemente de aproximadamente 32°C, pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente pH 5, y duraciones del proceso de aproximadamente 48 a 72 horas, preferiblemente de aproximadamente 72 horas.
- [0028] Preferiblemente, el proceso LSF o proceso enzimático único es un proceso de hidrólisis de almidón crudo (raw starch hydrolysis, RSH) usado en la producción de etanol. Un proceso de "hidrólisis del almidón crudo" (RSH) difiere de los procesos de tratamiento de almidón crudo convencionales en que el almidón crudo no cocido, también denominado almidón granuloso, se usa en el proceso de fermentación del etanol. Como se utiliza en este caso, el término "almidón granuloso" significa el almidón crudo no cocido, es decir el almidón que se encuentra en su forma natural, p. ej., en cereal, tubérculos o granos. El almidón está formado dentro de células vegetales como gránulos

minúsculos insolubles en agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas hasta 50°C a 75°C la hinchazón puede ser reversible. Sin embargo, con temperaturas más altas empieza una hinchazón irreversible llamada gelatinización.

5 [0029] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima en la que comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua comienza a gelatinizarse entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y puede ser determinado rápidamente por un experto. Por ejemplo, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según las especies de plantas, la variedad particular de las especies de plantas así como con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención la temperatura de gelatinización inicial de un almidón dado es la temperatura en la que se pierde la birrefringencia en un 5% de los gránulos de almidón usando el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., Starch/Stärke, Vol. 44 (12) pp. 461-466 (1992) .

15 [0030] Una aplicación preferida de los procesos y composiciones de fermentación descritos en la presente es en un proceso de producción de etanol, siendo el etanol para el uso como un combustible o aditivo de combustible, más preferiblemente usando un proceso de hidrólisis de almidón crudo. Los procesos descritos aquí pueden ser usados, p. ej., para aumentar el nivel y/o el rendimiento de producción de etanol.

20 [0031] Los procesos de producción de etanol generalmente implican las fases de trituración, licuefacción, sacarificación, fermentación y destilación. En la producción de etanol y otros productos a base de almidón, la materia prima, tal como el grano entero, preferiblemente maíz, es molido para descubrir la estructura y permiten el tratamiento adicional. Dos procesos son preferidos según la invención: molienda húmeda y molienda en seco. Para la producción de etanol se prefiere la molienda en seco en la que el grano entero es molido y usado en la parte restante del proceso. La molienda húmeda también puede ser usada y da una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica con algunas excepciones a lugares en los que hay una producción paralela de jarabes. Tanto los procesos de molienda húmeda y en seco son bien conocidos en la técnica.

30 [0032] En la producción de etanol, el organismo de fermentación es preferiblemente levadura, que se aplica a la trituración. Una levadura preferida es derivada de *Saccharomyces spp.*, más preferiblemente, de *Saccharomyces cerevisiae*. En las formas de realización preferidas, la levadura se aplica a la trituración y la fermentación está progresando durante 24-96 horas, así como normalmente 35-60 horas. En las formas de realización preferidas, la temperatura está generalmente entre 26-34°C, en particular aproximadamente a 32°C, y el pH es generalmente pH 3-6, preferiblemente alrededor de pH 4-5. Las células de levadura son preferiblemente aplicadas en cantidades de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} cuentas de levadura viables, especialmente 5×10^7 por ml de caldo de fermentación. Durante la fase de producción de etanol el recuento de células de levadura debería preferiblemente estar en la gama de 10^7 a 10^{10} cuentas de levadura viables especialmente alrededor de 2×10^9 . Se puede encontrar una guía adicional sobre el uso de la levadura para la fermentación en, p. ej., "Te alcohol Textbook" (Editores K. Jacques, T.P. Lyons y D.R.Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999), que se incorpora en la presente por referencia.

40 [0033] Después de la fermentación, la trituración puede ser destilada para extraer el producto de alcohol (etanol). En el caso de que el producto final sea etanol, obtenido según los procesos de la invención, se puede usar como, p. ej., etanol para combustible; etanol para bebida, es decir, licores neutros potables; o etanol industrial.

45 [0034] Las lacasas y otras enzimas a las que se hace referencia en la presente pueden ser derivadas u obtenidas de cualquier origen adecuado, incluso de cualquier origen bacteriano, fúngico, de levadura o de mamífero. El término "derivado" o significa en este contexto que la enzima puede haber sido aislada de un organismo cuando está presente de forma nativa, es decir, la identidad de la secuencia de aminoácidos de la enzima es idéntica a una enzima nativa. El término "derivado" también significa que las enzimas pueden haber sido producidas de forma recombinante en un organismo huésped, la enzima recombinante producida tiene sea una identidad idéntica a una enzima nativa o sea una secuencia de aminoácidos modificada, p. ej. con uno o más aminoácidos, que son deletados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida de forma recombinante que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácidos nucleicos conocidos en la técnica. Dentro del significado de una enzima nativa se incluyen variantes naturales. Además, el término "derivado" incluye enzimas producidas sintéticamente por, p. ej., síntesis peptídica. El término "derivado" también incluye enzimas que han sido modificadas p. ej. por glicosilación, fosforilación, o por otra modificación química, sea *in vivo* o *in vitro*. El término "obtenido" en este contexto significa que la enzima tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una enzima nativa. El término incluye una enzima que ha sido aislada de un organismo en el que está presente de forma nativa, o que se ha expresado de forma recombinante en el mismo tipo de organismo o en otro, o enzimas producidas sintéticamente por, p. ej., síntesis peptídica. Respecto a las enzimas de recombinación producidas los términos "obtenido" y "derivado" se refieren a la identidad de la enzima y no a la identidad del organismo huésped en el que se ha producido de forma recombinante.

[0035] Las enzimas pueden también ser purificadas. El término "purificado" como se utiliza en este caso cubre las enzimas libres de otros componentes del organismo del cual derivan. El término "purificado" también cubre las enzimas libres de componentes del organismo nativo del cual se obtienen. Las enzimas pueden ser purificadas, sólo con cantidades menores de otras proteínas que están presentes. La expresión "otras proteínas" se refieren en particular a otras enzimas. El término "purificado" como se utiliza en este caso también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente de otras proteínas y más particularmente de otras enzimas presentes en la célula de origen de la enzima de la invención. La enzima puede ser "sustancialmente pura," es decir, libre de otros componentes del organismo en el que se ha producido, es decir, por ejemplo, un organismo huésped para las enzimas producidas de forma recombinante. En la forma de realización preferida, las enzimas tienen al menos un 75% (p/p) de pureza, más preferiblemente al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de pureza. En otra forma de realización preferida, la enzima tiene un 100% de pureza.

[0036] Las enzimas usadas en la presente invención pueden ser de cualquier forma (composición) adecuada para el uso en los procesos descritos aquí, tal como p. ej. en forma de un polvo seco o granulado, un granulado no pulverulento, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Los granulados pueden ser producidos, p. ej., como se describe en las patentes estadounidenses Nos. 4,106,991 y US 4,661,452, y pueden opcionalmente ser revestidos por métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, ácido láctico u otro ácido orgánico conforme a los métodos establecidos. Las enzimas protegidas pueden ser preparadas conforme al método descrito en EP 238,216.

[0037] De acuerdo con otra forma de realización preferida, se puede usar un estimulador de la fermentación en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos en la presente para mejorar adicionalmente el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentativo, tal como, el incremento del índice y el rendimiento de etanol. Un "estimulador de la fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentativos, en particular, la levadura. Los estimuladores de la fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido paraaminobenzoico, ácido fólico, riboflavina, y vitaminas A, B, C, D, y E. Véase, p. ej., Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisia* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process," Springer-Verlag (2002), que se incorpora en la presente por referencia. Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden alimentar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, y Cu.

[0038] La lacasa usada en el proceso de la invención se aplica en una cantidad eficaz durante la fermentación y/o antes de la fermentación, tal como durante la propagación de los organismos fermentativos.

[0039] En el contexto de la invención las lacasas comprenden cualquier enzima de lacasa comprendida por la clasificación de enzimas (EC 1.10.3.2).

[0040] Las enzimas mencionadas anteriormente se pueden derivar de plantas, bacterias u hongos (incluyendo levaduras y hongos filamentosos) y ejemplos adecuados incluyen una lacasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinereus*, *C. comatus*, *C. friesii*, y *C. plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana*, *Panaeolus*" por ejemplo *P. papilionaceus*, *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*, *Schytalidium*, por ejemplo, *S. thermophilum*, *Polyporus*, e.g., *P. pinsitus*, *Pycnoporus*, por ejemplo, *P. cinnabarinus*, *Phlebia*, por ejemplo, *P. radita* (WO 92/01046), o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (JP 2-238885).

[0041] Se prefiere una lacasa derivada de *Coprinus*, *Myceliophthora*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Scytalidium* o *hizoctonia*, en particular una lacasa derivada de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Polyporus pinsitus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Scytalidiumthermophilum* o *Rhizoctonia solani*.

55 Ejemplo 1

[0042] La adición de una lacasa fue evaluada bajo condiciones de fermentación anaeróbica análogas a experimentos de fermentación de etanol. El experimento fue realizado en maíz amarillo seco molido según un protocolo de licuefacción-sacarificación-fermentación (LSF) simultáneo. El experimento se efectuó usando glucoamilasa (Spirizyme Plus, disponible por Novozymes A/S) para fermentar etanol, con y sin lacasa. Las fermentaciones fueron realizadas a pH=5.0:

32°C durante 72 horas. El proceso fue vigilado con tiempo y analizado por la pérdida de peso del CO₂, el porcentaje del etanol producido y la conversión teórica del almidón. Como se muestra en la tabla 1, la adición de lacasa también mejoró el rendimiento de etanol.

Tabla 1

Tratamiento	Etanol HPLC, % v/v					
	7 h	23 h	29 h	47 h	55 h	119 h
0,7 GAU/g DS	2,36	9,29	10,55	12,38	13,13	16,73
0,7 GAU/g DS & 0,1 M NaCl	1,88	7,91	8,78	10,30	10,94	14,61
0,9 GAU/g DS	2,24	9,63	10,92	12,92	13,66	18,05
0,9 GAU/g DS & NZ 525, 0,5% DS	2,42	9,44	10,58	12,63	13,39	18,28
1,0 GAU/g DS	2,07	9,29	10,21	12,27	13,06	17,83
1,0 GAU/g DS & laccase, 0,2% DS	2,89	10,87	11,99	13,82	14,41	18,86

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de etanol a partir de material que contiene almidón, dicho método comprendiendo una fase de fermentación, comprendiendo la puesta en contacto de un microorganismo fermentativo o medios fermentativos usados en la fase de fermentación con al menos una lacasa (EC 1.10.3.2), donde el material que contiene almidón es seleccionado del grupo que consiste en tubérculos, raíces, granos enteros, maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo o cereales.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde dicho microorganismo es una levadura.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde dicha fase de fermentación es parte de un proceso de sacarificación y de fermentación simultáneo.

15