

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 438**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2009 PCT/US2009/054156**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2010 WO10022045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2009 E 09791612 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2326723**

54 Título: **Procesos para producir productos de fermentación**

30 Prioridad:

20.08.2008 US 90402 P

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

20.12.2016

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**SOONG, CHEE-LEONG;
DEINHAMMER, RANDY y
MATTHEWS, JOHN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 594 438 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procesos para producir productos de fermentación

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón.

10 Antecedentes de la invención

[0002] La producción de productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón es ampliamente conocida en la técnica. Generalmente se usan dos tipos diferentes de procesos.

15 El proceso usado con mayor frecuencia, a menudo denominado el "proceso convencional" incluye la licuefacción de almidón gelatinizado a altas temperaturas utilizando típicamente una alfa-amilasa bacteriana, seguida de una sacarificación y fermentación realizadas de forma simultánea en presencia de una glucoamilasa y de un organismo fermentador.

20 Otro proceso ampliamente conocido, frecuentemente denominado un proceso de "hidrólisis de almidón bruto" (RSH) incluye simultáneamente la sacarificación y la fermentación de almidón granular por debajo de la temperatura de gelatinización inicial típicamente en presencia de una alfa-amilasa fúngica ácida, una glucoamilasa y un organismo fermentador.

[0003] La licuefacción a altas temperaturas usada en el proceso convencional genera dextrinas y azúcares solubles que son sacarificados y fermentados.

25 Sin embargo, como resultado de las altas temperaturas utilizadas, ocurren reacciones de condensación de Maillard entre grupos de carbonilo en azúcares reductores y grupos amino en aminoácidos y péptidos, y se forman productos de Maillard.

El proceso de RSH no implica la "cocción" a altas temperaturas como los procesos convencionales.

30 Sin embargo, factores tales como los niveles de humedad y el pH también pueden afectar a las reacciones de condensación de Maillard.

En cualquier proceso, los azúcares incorporados en los productos de Maillard ya no están disponibles para la fermentación y el rendimiento total de productos de fermentación disminuye.

[0004] Los productos de Maillard formados durante procesos de fermentación tales como los descritos anteriormente pueden tener efectos deletéreos adicionales.

35 Por ejemplo, los aminoácidos incorporados en los productos de Maillard producen una reducción de los aminoácidos esenciales disponibles, tales como la lisina, en granos secos de destilería, un subproducto del proceso de fermentación usado en aplicaciones tales como el pienso para animales.

40 También se sabe que los productos de la reacción de Maillard inhiben el crecimiento de algunos organismos fermentadores tales como la levadura, y pueden inhibir enzimas comúnmente usadas en los procesos de fermentación, tales como las alfa-amilasas y otras enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos.

[0005] Muchos materiales que contienen almidón, como el maíz, contienen grandes cantidades de sacarosa además de almidón.

45 La invertasa y la sacarasa son enzimas que hidrolizan típicamente la sacarosa en glucosa y fructosa.

Sin embargo, estas enzimas también son conocidas por tener actividad de transglicosilación y son capaces de sintetizar oligosacáridos bajo ciertas condiciones.

50 Estas y otras enzimas glicosídicas implicadas en la hidrólisis de oligosacáridos también están sujetas al fenómeno de la reacción de reversión enzimática, o condensación, por la cual los monosacáridos libres se enlazan entre sí con una liberación concomitante de agua.

Este fenómeno es esencialmente similar a la reversibilidad de cualquier reacción química.

[0006] JP 59 045876 A (Sakai T) aborda una levadura *Saccharomyces diastaticus* F4 poliploide de orden alto que posee resistencia a la cicloheximida y una productividad mejorada de amilasa, sacarasa, y etanol.

55 Cuando se usa en un proceso de fermentación alcohólica, la levadura *Saccharomyces diastaticus* F4 produce sacarasa durante la fermentación.

Sigue habiendo una necesidad de procesos mejorados para producir productos de fermentación, como el etanol, a partir de material que contiene almidón.

Las mejoras de proceso que aumenten el rendimiento de productos de fermentación son altamente deseables.

60 Resumen de la invención

[0007] En el primer aspecto, la presente invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón con un contenido de sólidos secos dentro del rango de 10-55% p/p que comprende:

(a) la licuefacción del material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa;

(b) la sacarificación del material licuado obtenido en el paso (a) utilizando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;

(c) la fermentación utilizando un organismo fermentador;

donde una invertasa se añade antes o durante el paso de licuefacción y donde los pasos del proceso se realizan en el siguiente orden consecutivo: (a); (b) y (c).

Breve descripción de las figuras

[0008]

La Figura 1 demuestra el efecto de cantidades variables de invertasa en el rendimiento de etanol a lo largo del tiempo medido según la pérdida en peso.

La Figura 2 demuestra el efecto de cantidades variables de invertasa en el rendimiento de etanol extraordinario medidas por HPLC.

Descripción detallada de la invención

[0009] La presente invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, donde el proceso incluye pasos de licuefacción, sacarificación, y fermentación.

[0010] La presente invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón con un contenido de sólidos secos dentro del rango de 10-55% p/p, que comprende:

(a) la licuefacción del material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa;

(b) la sacarificación del material licuado obtenido en el paso (a) utilizando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;

(c) la fermentación utilizando un organismo fermentador;

donde una invertasa se añade antes o durante el paso de licuefacción y donde los pasos del proceso se realizan en el siguiente orden consecutivo: (a); (b) y (c).

[0011] En una forma de realización, la invertasa puede evitar que se formen productos de la reacción de Maillard antes o durante el paso de licuefacción.

La invertasa puede sintetizar sacarosa u otros azúcares u oligosacáridos no reductores a partir de los azúcares o polisacáridos solubles disponibles en la suspensión antes de o durante el paso de licuefacción.

Los azúcares no reductores tales como la sacarosa no son susceptibles a las reacciones de Maillard pero están disponibles para la sacarificación y la fermentación.

[0012] En otra forma de realización, la invertasa puede mejorar la hidrólisis de la sacarosa.

[0013] El paso de sacarificación (b) y el paso de fermentación (c) se puede realizar o bien consecutivamente o bien simultáneamente.

En una forma de realización, los pasos de sacarificación y de fermentación se realizan consecutivamente.

En otra forma de realización, los pasos de sacarificación y de fermentación se realizan simultáneamente.

[0014] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes del paso (a), los pasos de:

x) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón;

y) formar una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0015] La suspensión acuosa puede contener de 10-55 % p/p de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 p/p% de DS, más preferiblemente 30-40% p/p de DS de material que contiene almidón.

La solución se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y se puede añadir una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa fúngica o bacteriana para iniciar la licuefacción (aclaramiento).

La suspensión puede, en una forma de realización, ser cocida a chorro para gelatinizar adicionalmente la suspensión antes de ser sometida a alfa-amilasa en el paso (a).

[0016] La licuefacción puede, en una forma de realización, efectuarse como un proceso de suspensión caliente de tres pasos.

La suspensión se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se añade alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (aclaramiento).

Luego, la suspensión se puede cocer por chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos.

La suspensión se enfría hasta 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria).

El proceso de licuefacción normalmente es realizado a pH 4.5-6.5, en particular a un pH de 5 a 6.

[0017] El paso de sacarificación (b) se puede realizar utilizando condiciones ampliamente conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar hasta aproximadamente de 24 a aproximadamente 72 horas. Sin embargo, es común hacer sólo una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de una sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y de fermentación simultáneas (proceso SSF).

La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 20-75°C, preferiblemente de 40-70°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente alrededor de pH 4.5.

[0018] El proceso más ampliamente usado en la producción de productos de fermentación, especialmente etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), en el que no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, como la levadura, y la (s) enzima(s) se pueden añadir juntos.

El SSF puede llevarse a cabo típicamente a una temperatura de 25°C a 40°C, como por ejemplo de 28°C a 35°C, como por ejemplo de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 32°C.

En una forma de realización, la fermentación dura de 6 a 120 horas, y preferiblemente de 24 a 96 horas.

Medio de fermentación

[0019] "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 carbohidratos que es metabolizada por el organismo fermentador.

[0020] El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) del crecimiento para el/los organismo(s) de fermentación.

Los nutrientes y los estimuladores del crecimiento son ampliamente usados en la técnica de la fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como el amoníaco; urea, vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.

Organismos fermentadores

[0021] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuado para usar en un proceso de fermentación y capaz de producir el producto de fermentación deseado.

Los organismos fermentadores especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, de convertir, azúcares, tales como la glucosa o la maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

Los ejemplos de organismos fermentadores incluyen los organismos fúngicos, tales como la levadura.

La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0022] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade al medio de fermentación de modo que la cuenta del organismo fermentador viable, como por ejemplo una levadura, por mL de medio de fermentación esté dentro del rango de 10⁵ a 10¹², preferiblemente de 10⁷ a 10¹⁰, especialmente aproximadamente 5x10⁷.

[0023] Entre las levaduras disponibles comercialmente se incluyen, por ejemplo, la levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE.UU), FALI (disponible de Fleischmann's yeast, EE.UU), la levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EE.UU), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia), y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

Materiales que contienen almidón

[0024] Cualquier material adecuado que contiene almidón se puede utilizar según la presente invención.

La materia prima se selecciona generalmente basándose en el producto de fermentación deseado.

Entre los ejemplos de materiales que contienen almidón, adecuados para usar en un proceso de la invención, se incluyen granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, yuca, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias, o boniatos, o mezclas de los mismos, o cereales.

También se contemplan tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

[0025] El término "almidón granular" significa almidón bruto sin cocer, es decir, almidón en su forma natural como se encuentra en los cereales, tubérculos o granos.

El almidón se forma dentro de las 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 el hinchamiento pueden ser reversible.

Sin embargo, con temperaturas más altas, comienza un hinchamiento irreversible llamado "gelatinización".

El almidón granulado que ha de ser procesado puede ser de 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 un almidón más bruto que comprende granos enteros (por ejemplo, molidos) incluyendo fracciones no

amiláceas tales como residuos de germen y fibras.

La materia prima, como por ejemplo granos enteros, se puede reducir en tamaño de partícula, por ejemplo, mediante molienda, para abrir la estructura y permitir un posterior procesamiento.

Dos procesos se prefieren según la invención: molienda húmeda y en seco.

5 En la molienda en seco, los granos enteros se muelen y se usan.

La molienda en húmedo proporciona una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica frecuentemente en lugares donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de, por ejemplo, jarabes.

10 Tanto la molienda húmeda como en seco son ampliamente conocidas en la técnica del procesamiento del almidón y se contemplan de igual forma para un proceso de la invención.

En una forma de realización, el tamaño de partícula se reduce a entre 0,05 y 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 90% del material que contiene almidón pase a través de un tamiz con una pantalla de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente con una pantalla de 0,1-0,5 mm.

15 Productos de fermentación

[0026] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación que utiliza un organismo fermentador.

20 Los 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; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas.

25 En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), en la industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), en la industria de la peletería o en la industria del tabaco.

30 Los tipos preferidos de cerveza comprenden las ales, stouts, lagers, amargas, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza de alta graduación, cerveza de baja graduación, cerveza baja en calorías o cerveza light.

Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólica.

El producto de fermentación, tal como el etanol, obtenido según la invención, puede preferiblemente usarse como combustible.

35 Sin embargo, en el caso del etanol, éste también se puede usar como etanol potable.

Recuperación

[0027] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación.

40 La suspensión se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado puede extraerse del medio de fermentación por medio de técnicas de microfiltración o de filtración por membrana.

Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por arrastre (stripping).

45 Los métodos para la recuperación son ampliamente conocidos en la técnica. En una forma de realización, el producto de fermentación, como por ejemplo etanol, puede opcionalmente ser recuperado después de la fermentación por destilación.

Enzimas

50 [0028] Aunque no se mencione específicamente en el contexto de un proceso de la invención, debe entenderse que las enzimas se usan en una cantidad eficaz.

Invertasa/sacarasa

[0029] Invertasa es el nombre común para la sacarasa.

55 Tal y como se usan en este documento, "invertasa" y "sacarasa" tienen el mismo sentido.

El nombre oficial para la invertasa es beta-fructofuranosidasa (E.C. 3.2.1.26) y la reacción catalizada por esta enzima es la hidrólisis de los residuos beta-fructofuranósidos no reductores terminales en beta-fructofuranósidos.

La invertasa también es conocida por tener actividad de transglucosilación y es capaz de sintetizar oligosacáridos bajo ciertas condiciones.

60 [0030] La enzima de invertasa puede proceder de cualquier fuente, incluyendo de origen bacteriano, fúngico o vegetal.

La invertasa se añade a la suspensión antes de o durante la licuefacción, en una cantidad eficaz.

En una forma de realización, la invertasa se añade en una cantidad de 0,001 a 1,00 mg/g de DS.

65 En otra forma de realización, la invertasa se añade en una cantidad de 0,01 a 0,09 mg/g de DS, alternativamente en una cantidad de 0,05 a 0,80 mg/g de DS, alternativamente en una cantidad de 0,05 a 0,40 mg/g de DS, o

alternativamente en una cantidad de 0,05 a 0,20 mg/g de DS o de 0,10 a 0,20 mg/g de DS.

[0031] Las composiciones comerciales que comprenden invertasa incluyen invertasa de levadura de panadería y *Candida utilis* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) invertasa de levadura (USB Corporation, Cleveland, OH) Maxinvert® (Centerchem, Inc. Norwalk, CT), invertasa (Advanced Enzyme Technologies, Ltd., Thane, India) e Invertase® (Novozymes, A/S).

Alfa-amilasa

[0032] Según la invención, se puede utilizar cualquier alfa-amilasa, como, por ejemplo, de origen fúngico, bacteriano o vegetal.

En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, una alfa-amilasa fúngica ácida o una alfa-amilasa bacteriana ácida.

El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que, añadida en una cantidad eficaz, tiene actividad óptima a un pH dentro del rango de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasa bacteriana

[0033] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana es preferiblemente derivada del género *Bacillus*.

[0034] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* es derivada de una cepa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus stearothermophilus*, pero también puede ser derivada de otra especie de *Bacillus*.

Los ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID n.º: 4 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la SEC ID n.º: 5 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEC ID n.º: 3 en WO 99/19467.

En una forma de realización, la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, aún más preferido al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% con cualquiera de las secuencias mostradas en las SEC ID N.º: 1, 2 o 3, respectivamente, en WO 99/19467.

[0035] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente una descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355.

Las variantes de alfa-amilasa concretamente contempladas se describen en las patentes de EEUU n.º. 6,093,562, 6,297,038 o en la patente de EE.UU. n.º 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG alfa-amilasa) que tienen una delección de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una delección doble descrita en WO 1996/023873 - ver, por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta (181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de BSG alfa-amilasa de tipo salvaje expuesta en la SEC ID N.º:3 descrita en WO 99/19467 o la delección de aminoácidos R179 y G180 usando la SEC ID N.º:3 de WO 99/19467 para la numeración.

Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una delección doble que corresponde con delta (181-182) y además comprende una sustitución de N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de BSG alfa-amilasa de tipo salvaje expuesta en la SEC ID N.º:3 descrita en WO 99/19467.

Alfa-amilasa híbrida bacteriana

[0036] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEC ID n.º: 4 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en la SEC ID n.º: 5 de WO 99/19467), con una o varias, especialmente todas, de la siguiente sustitución:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en la SEC ID n.º: 4 de WO 99/19467). También se prefieren variantes que tienen una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otra cadena de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente delección de E178 y G179 (utilizando la numeración de la SEC ID n.º: 5 de WO 99/19467).

[0037] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana y la alfa-amilasa híbrida bacteriana se dosifican en una cantidad de 0,0005-5 KNU por g de DS, preferiblemente 0,001-1 KNU por g de DS, por ejemplo alrededor de 0,050 KNU por g de DS.

Alfa-amilasa fúngica

[0038] Las alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tales como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus kawachii*.

[0039] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa similar a Fungamyl que es derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae*.

Según la presente invención, el término "alfa-amilasa similar a Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una identidad alta, es decir, de 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 la SEC ID n.º: 10 de WO 96/23874.

[0040] Otra alfa-amilasa ácida preferida es derivada de una cepa de *Aspergillus niger*.

En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *Aspergillus niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL con el número de registro primario P56271 y descrita en WO 89/01969 (Ejemplo 3).

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

[0041] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas incluyen las derivadas de una cepa de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178) o *Meripilus giganteus*.

[0042] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es derivada de *Aspergillus kawachii* y descrita por Kaneko et al. J. Ferment. Bioeng 81:292-298(1996) "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachi*"; y además como EMBL: #AB008370.

[0043] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un dominio de unión al almidón (SBD) y un dominio catalítico de la alfa-amilasa (es decir, no híbrida), o una variante de la misma.

En una forma de realización, la alfa-amilasa tipo salvaje es derivada de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-amilasa híbrida fúngica

[0044] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida.

Los ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las descritas en WO 2005/003311 o en la publicación de patente de EEUU n.º 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente de EEUU n.º 60/638,614 (Novozymes).

Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico (CD) de alfa-amilasa y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón, y opcionalmente un enlazador.

[0045] Los ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen los descritos en la Tabla 1 a 5 de los ejemplos en la solicitud de patente de EEUU n.º 60/638,614, incluyendo la variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID N.º:100 en US 60/638,614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de AMG y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID N.º:101 en US 60/638,614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador y SBD de glucoamilasa de *Aspergillus niger* (que se describe en la Tabla 5 como una combinación de las secuencias de aminoácidos SEC ID N.º:20, SEC ID N.º:72 y SEC ID N.º:96 en la solicitud de EEUU n.º 11/316,535) o como V039 en la Tabla 5 en WO 2006/069290, y alfa-amilasa *Meripilus giganteus* con enlazador y SBD de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (SEC ID N.º:102 en US 60/638,614).

Otras alfa-amilasas híbridas específicamente contempladas son cualesquiera de las enumeradas en las tablas 3, 4, 5, y 6 en el ejemplo 4 de la solicitud de EEUU n.º 11/316,535 y en WO 2006/069290.

[0046] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen las descritas en la publicación de patente de EEUU n.º 2005/0054071, incluyendo las descritas en la tabla 3 en la página 15, tales como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

[0047] También se contemplan alfa-amilasas que muestran una identidad alta para cualquiera de las alfa-amilasas 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.

[0048] Cuando se usa según la presente invención, una alfa-amilasa ácida se puede añadir 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.

Alternativamente, según la presente invención, una alfa-amilasa se puede añadir en una cantidad de 0,001 a 1 FAU-F/g de DS, preferiblemente de 0,01 a 1 FAU-F/g de DS.

Productos comerciales de alfa-amilasa

[0049] Las 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-L, SPEZYME® HPA, SPEZYME® ALPHA, SPEZYME® XTRA, SPEZYME® AA, SPEZYME® DELTA AA, y GC358 (Genencor Int.),

FUELZYME™-LF (Verenium Inc), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida con el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

Enzima generadora de fuentes de carbohidratos

5 [0050] El término "enzima generadora de fuentes de carbohidratos" incluye la glucoamilasa (que es generadora de glucosa), la beta-amilasa y la amilasa maltogénica (que son generadoras de maltosa) y también la pululanasa y la alfa-glucosidasa.

Una enzima generadora de fuentes de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que puede ser usado como una fuente de energía por el/los organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como el etanol.

El carbohidrato generado se puede convertir directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol.

Según la invención, se puede utilizar una mezcla de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos.

15 Las mezclas especialmente contempladas son mezclas que comprenden al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, aún más preferiblemente una alfa-amilasa fúngica ácida.

La proporción entre la actividad de glucoamilasa (AGU) y la actividad de alfa-amilasa fúngica (FAU-F) (la proporción de AGU por FAU-F) puede ser, en una forma de realización de la invención, de entre 0,1 y 100 AGU/FAU-F, en particular entre 2 y 50 AGU/FAU-F, por ejemplo dentro del rango de 10-40 AGU/FAU-F.

20 [0051] En un proceso convencional de almidón a etanol (por ejemplo, que incluye un paso de licuefacción (a)) la proporción puede preferiblemente ser tal y como se define en EP 140,410-B1, especialmente cuando la sacarificación del paso (b) y la fermentación del paso (c) se llevan a cabo simultáneamente.

25 Glucoamilasa

[0052] Una glucoamilasa usada según la invención puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, de un microorganismo o de una planta.

30 Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo consistente en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 o G2 (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tales como las descritas en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de la misma.

35 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 residuos de prolina en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Eng. 10,1199-1204).

40 [0053] Otras glucoamilasas incluyen la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (ver Patente de EE.UU. nº 4,727,026 y (Nagasaka et al. (1998) "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamilases from *Corticium rolfsii*, Microbiol Appl biotechnol 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de UU con nº registro. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente de EEUU nº 4,587,215).

45 [0054] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) y *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea*; y *Leucopaxillus giganteus*, todas descritas en WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* descritas en WO2007/124285 o una mezcla de las mismas.

Las glucoamilasas híbridas también se contemplan según la invención.

50 Por ejemplo, las glucoamilasas híbridas descritas en WO 2005/045018.

Los ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en las Tabla 1 y 4 del Ejemplo 1.

[0055] También se contemplan glucoamilasas que muestran una identidad alta para cualquiera de las glucoamilasas mencionadas anteriormente, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzimas maduras mencionadas anteriormente.

60 [0056] Las 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 and AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300, GC480, GC147 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME® G900, G-ZYME®, G-ZYME® 480 ETHANOL, DISTILLASE® L-400, DISTILLASE® L-500, DISTILLASE® VHP, y G990 ZR (de Genencor Int.).

65 [0057] Las glucoamilasas pueden, en una forma de realización, añadirse 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, por ejemplo 0,1-2 AGU/g de DS.

Beta-amilasa

5 [0058] Una beta-amilasa (E.C 3.2.1.2) es el nombre dado generalmente a las amilasas maltogénicas exo-actuantes, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en la amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados.

Las unidades de maltosa son sucesivamente quitadas de los extremos de cadena no reductores de manera gradual hasta que la molécula se degrada o, en el caso de la amilopectina, hasta que se alcanza un punto de ramificación.

La maltosa liberada tiene la configuración anomérica beta, de ahí el nombre de beta-amilasa.

10 [0059] Las beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty and C.T. Kelly, Progress in Industrial Microbiology, vol. 15, pp. 112-115, 1979).

Estas beta-amilasas se caracterizan porque tienen temperaturas óptimas dentro del rango de 40°C a 65°C y un pH óptimo dentro del rango de 4,5 a 7.

15 Una beta-amilasa de cebada disponible comercialmente es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EE.UU.

Amilasa maltogénica

20 [0060] La amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica.

Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3,2,1,133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa.

Una amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S.

25 Las alfa-amilasas maltogénicas se describen en las patentes de EEUU nº 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

[0061] La amilasa maltogénica, en una forma de realización preferida, puede ser añadida en una cantidad de 0,05-5 mg de proteína total/gramo de DS o 0,05- 5 MANU (Novo Unidad de Amilasa Maltogénica)/g de DS.

30 [0062] La enzima generadora de fuentes de carbohidratos puede ser cualquier enzima generadora de fuentes de carbohidratos, incluyendo las enumeradas en la sección "Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos" anterior.

En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es una glucoamilasa.

35 En una forma de realización preferida, la glucoamilasa se selecciona del grupo derivado de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, una cepa de *Talaromyces*, especialmente *Talaromyces emersonii*; o una cepa de *Athelia*, especialmente *Athelia rolfsii*; una cepa de *Trametes*, preferiblemente *Trametes cingulata*; una cepa del género *Pachykytospora*, preferiblemente una cepa de *Pachykytospora papyracea*; o una cepa del género *Leucopaxillus*, preferiblemente *Leucopaxillus giganteus*; o una cepa del género *Peniophora*, preferiblemente una cepa de la especie *Peniophora rufomarginata*; o una mezcla de las mismas.

40 [0063] La alfa-amilasa puede ser cualquier alfa-amilasa, incluyendo las mencionadas en la sección anterior "Alfa-amilasas".

En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, especialmente una alfa-amilasa fúngica ácida.

45 En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se selecciona del grupo de alfa-amilasas fúngicas.

En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es derivada del género *Aspergillus*, especialmente una cepa de *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, o *Aspergillus kawachii*, o del género *Rhizomucor*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus*, o del género *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Meripilus giganteus*.

50 [0064] La proporción entre la actividad de alfa-amilasa (AGU) y la actividad de glucoamilasa fúngica (FAU-F) (la proporción de AGU por FAU-F) puede, en una forma de realización de la invención, ser de entre 0,1 y 100 AGU/FAU-F, en particular de entre 2 y 50 AGU/FAU-F, por ejemplo dentro del rango de 10-40 AGU/FAU-F.

La proporción de alfa-amilasa ácida a glucoamilasa está dentro del rango entre 0,3 y 5,0 AFAU/AGU.

55 La composición anterior de la invención es adecuada para usar en un proceso para producir productos de fermentación, como etanol, de la invención.

[0065] La invención descrita y reivindicada en este documento no debe ser limitada en su alcance por las formas de realización específicas descritas en este documento, ya que estas formas de realización están pensadas como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención.

60 Se pretende que cualesquiera formas de realización equivalentes estén dentro del campo de esta invención.

De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas aquí, serán aparentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente.

Se pretende que tales modificaciones también caigan dentro del campo de las reivindicaciones anexas.

65 Materiales y métodos

Materiales:

[0066]

- 5 Glucoamilasa T (GA): glucoamilasa derivada de *Talaromyces emersonii* y descrita como SEC ID n.º: 7 en WO 99/28448 y disponible de Novozymes A/S, Dinamarca previa solicitud.
- Alfa-amilasa A (AAA): variante de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181*+G182*+N193F descritas en la patente US nº 6,187,576 y disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca.
- 10 Invertasa: invertasa derivada de levadura de panadería 14504-1G, disponible de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.
- Levadura: RED STAR™ disponible de Red Star/Lesaffre, EE.UU.

Métodos

Identidad

- 15 [0067] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".
- [0068] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, al igual que el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, se puede determinar mediante el programa "align" que es un alineamiento de Needleman-Wunsch (es decir, un alineamiento global).
El programa se usa para el alineamiento de polipéptidos, así como de secuencias de nucleótidos. La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se usa para alineamientos de polipéptidos, y la matriz de identidad predeterminada se usa para alineamientos de nucleótidos.
- 20 La penalización para el primer residuo de un espacio o gap es de -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones para otros residuos de un gap son -2 para polipéptidos, y -4 para nucleótidos.
- [0069] "Align" forma parte del paquete FASTA versión v20u6 (ver W.R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison wit FASTP and FASTA," Methods in Enzymology 183:63- 98). Los alineamientos de proteínas de FASTA usan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en el tamaño del gap (ver "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197).

Actividad de glucoamilasa

- 35 [0070] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades de glucoamilasa (AGU).
- Actividad de glucoamilasa (AGU)
- 40 [0071] La Novo Unidad de Glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto en las condiciones estándar de 37°C, pH 4.3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: 0,1 M de acetato, tiempo de reacción 5 minutos.
- 45 [0072] Se puede usar un sistema autoanalizador. 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.

Incubación de AMG:	
Sustrato:	maltosa 23,2 mM
Tampón:	acetato 0,1 M
pH:	4.30 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Rango de funcionamiento de la enzima:	0,5-4,0 AGU/mL

50

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
-------------------	--------

[0073] Un archivo (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, el cual se incluye en el presente documento por referencia.

5 Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0074] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de la mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo.

10 Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se vuelve más leve y se convierte gradualmente en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

15 [0075] Una Kilo Novo Unidad de alfa-amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, en condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M de Ca²⁺; y pH 5.6) dextriniza 5260 mg de materia seca de almidón Merck Amylum soluble.

[0076] Un archivo EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, el cual se incluye en el presente documento por referencia.

20 Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

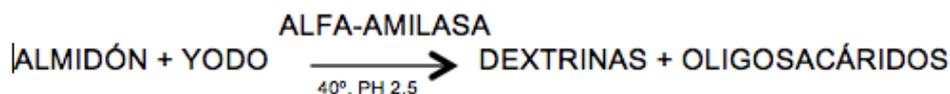
[0077] Cuando se usa según la presente invención, la actividad de una amilasa alfa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida).

25 Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0078] 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 materia seca de almidón por hora en las condiciones estándar mencionadas a continuación.

30 [0079] 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.

35 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 en la concentración de almidón en las condiciones analíticas específicas.



$\lambda = 590 \text{ nm}$

40 azul/violeta t = decoloración 23 seg.

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	Almidón soluble, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I2):	0,03 g/L
CaCl2:	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 funcionamiento de la enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

45 [0080] Un archivo EB-SM-0259.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, el cual se incluye en el presente documento por referencia.

Determinación de FAU-F

[0081] 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

5 [0082] Un archivo (EB-SM-0216.02) que describe este método estándar con más detalle está disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, el cual se incluye en el presente documento por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1. Efecto de la invertasa en la velocidad de fermentación y el rendimiento de etanol.

10

[0083]

Nº	Pre licuefacción / dosis (mg/gDS)	Licuefacción / dosis (NU/gDS)	SSF / dosis (AGU/gDS)
1	Invertasa 0,05	AAA 60	GA 0,45
2	Invertasa 0,1	AAA 60	GA 0,45
3	Invertasa 0,2	AAA 60	GA 0,45
4	Invertasa 0,4	AAA 60	GA 0,45
5		AAA 60	GA 0,45

Pre licuefacción

15

[0084] Un 32% (p/v) de harina de grano de maíz con 30% de adición de líquido residual industrial con sólidos reducidos (thin-stillage o backset) fue suspendido en agua corriente y bien mezclado.

El pH de la suspensión de maíz fue ajustado a pH 6.0.

20 Se añadió una cantidad apropiada de invertasa, como se muestra anteriormente, en la suspensión de maíz y se mezcló a conciencia, y luego fue incubada al baño maría a 50°C durante 2 horas.

Licuefacción

25

[0085] Después de la pre licuefacción, se añadió una cantidad apropiada de enzima de licuefacción (alfa-amilasa A) y la mezcla de suspensión de maíz fue sometida a cocción a 85°C durante 2 horas.

Durante la licuefacción, la suspensión de maíz fue mezclada periódicamente asegurándose de que el triturado de maíz se mezclaba y cocía debidamente.

Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

30

[0086] El triturado de maíz se enfrió a temperatura ambiente y se sometió a SSF como se describe a continuación con dosificación de levadura y determinación de rendimiento de etanol por pérdida de peso y análisis de HPLC.

Rehidratación de la levadura

35

[0087] 5,5 g de levadura RedStar™ fueron rehidratados en 100 ml de agua destilada e incubados a 32°C durante 30 minutos antes del comienzo de la fermentación.

Se añadieron aproximadamente 50 millones de células/g de DS de levadura a cada fermentación.

40

Método de pérdida de peso para la determinación del rendimiento de etanol

[0088] Se añadieron urea y penicilina a una concentración final de 0,5 ppm y 3 mg/L, respectivamente. Se llevaron a cabo fermentaciones a pequeña escala (~4g) en tubos de polipropileno de 15 ml con cinco réplicas para cada condición experimental.

45

Los tubos fueron preparados mediante la perforación de un agujero de 1/32 pulgadas (1,5 mm) y los tubos vacíos fueron pesados antes de que se añadiera el triturado de maíz licuado.

Los tubos fueron pesados nuevamente después de haber añadido el triturado para determinar el peso exacto del triturado en cada tubo.

50

Este peso se usó para calcular la dosificación enzimática necesaria de la siguiente manera:

ES 2 594 438 T3

$$\text{Dosis enz. (ml)} = \frac{\text{Dosis enz. Final (AGU / g de DS)} \times \text{Peso del triturado (g)} \times \text{Contenido s\u00f3lido (\%DS/100)}}{(\text{Conc. Enzima AGU /ml})}$$

[0089] Se a\u00f1adi\u00f3 la enzima seg\u00fan la dosificaci\u00f3n descrita en la tabla anterior y se a\u00f1adieron 100 \u00b5l de levadura rehidratada a cada tubo para iniciar la fermentaci\u00f3n.

5 El progreso de la fermentaci\u00f3n fue seguido por el pesado de los tubos a lo largo del tiempo durante aproximadamente 54 horas.

Los tubos fueron agitados en v\u00f3rtex brevemente antes de cada pesado.

Los valores de p\u00e9rdida de peso fueron convertidos a rendimiento de etanol (g de etanol/g de DS) mediante la f\u00f3rmula siguiente:

$$\text{g de etanol / g de DS} = \frac{\text{p\u00e9rdida de peso g de Co}_2 \times \frac{1 \text{ mol de Co}_2}{44,0098 \text{ g de Co}_2} \times \frac{1 \text{ mol de etanol}}{1 \text{ mol de Co}_2} \times \frac{46,094 \text{ g de etanol}}{1 \text{ mol de etanol}}}{\text{g de ma\u00edz en el tubo} \times \text{\% de DS de ma\u00edz}}$$

10

[0090] Los resultados se resumen en la Figura 1.

An\u00e1lisis de HPLC

15

[0091] Despu\u00e9s de 24 y 54 horas de fermentaci\u00f3n, se sacrificaron dos r\u00e9plicas respectivamente de cada grupo de tratamiento para realizar un an\u00e1lisis de HPLC del az\u00facar restante y la concentraci\u00f3n de etanol.

Las reacciones fueron detenidas a\u00f1adiendo 50 \u00b5l 40% de H₂SO₄ a cada tubo y se mezclaron bien.

20 Los tubos fueron centrifugados a 3000 r.p.m. durante 15 minutos para vaciar el sobrenadante, y luego se pas\u00f3 1 ml de sobrenadante aclarado a trav\u00e9s de un filtro de 0,45 \u00b5m y se coloc\u00f3 en los viales de HPLC. Los viales se mantuvieron a 4\u00b0C hasta el an\u00e1lisis. Los resultados se resumen en la Figura 2.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón con un contenido de sólido seco dentro del rango de 10-55% p/p que comprende:
- 5 (a) la licuefacción del material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa;
(b) la sacarificación del material licuado obtenido en el paso (a) utilizando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;
(c) fermentación utilizando un organismo fermentador;
- 10 donde una invertasa se añade antes o durante el paso de licuefacción y donde los pasos del proceso se realizan en el siguiente orden consecutivo: (a), (b) y (c).
2. Proceso según la reivindicación 1, donde la invertasa es derivada de la levadura.
3. Proceso según las reivindicaciones 1 o 2, donde la invertasa se añade en una cantidad de 0,001 a 1,00 mg/g de sólidos secos.
- 15 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el material que contiene almidón es derivado de maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, sagú, yuca, mandioca, tapioca, sorgo, arroz o patatas.
- 20 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el paso de sacarificación (b) y el paso de fermentación (c) se realizan simultáneamente.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es seleccionada del grupo consistente en glucoamilasa, alfa-glucosidasa, amilasa maltogénica, pululanasa y beta-amilasa.
- 25 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el producto de fermentación se recupera después de la fermentación.
- 30 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el producto de fermentación es etanol combustible, etanol potable o etanol industrial.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el organismo fermentador es levadura.
- 35 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además, antes del paso (a), los pasos de:
x) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón;
y) formar una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua.

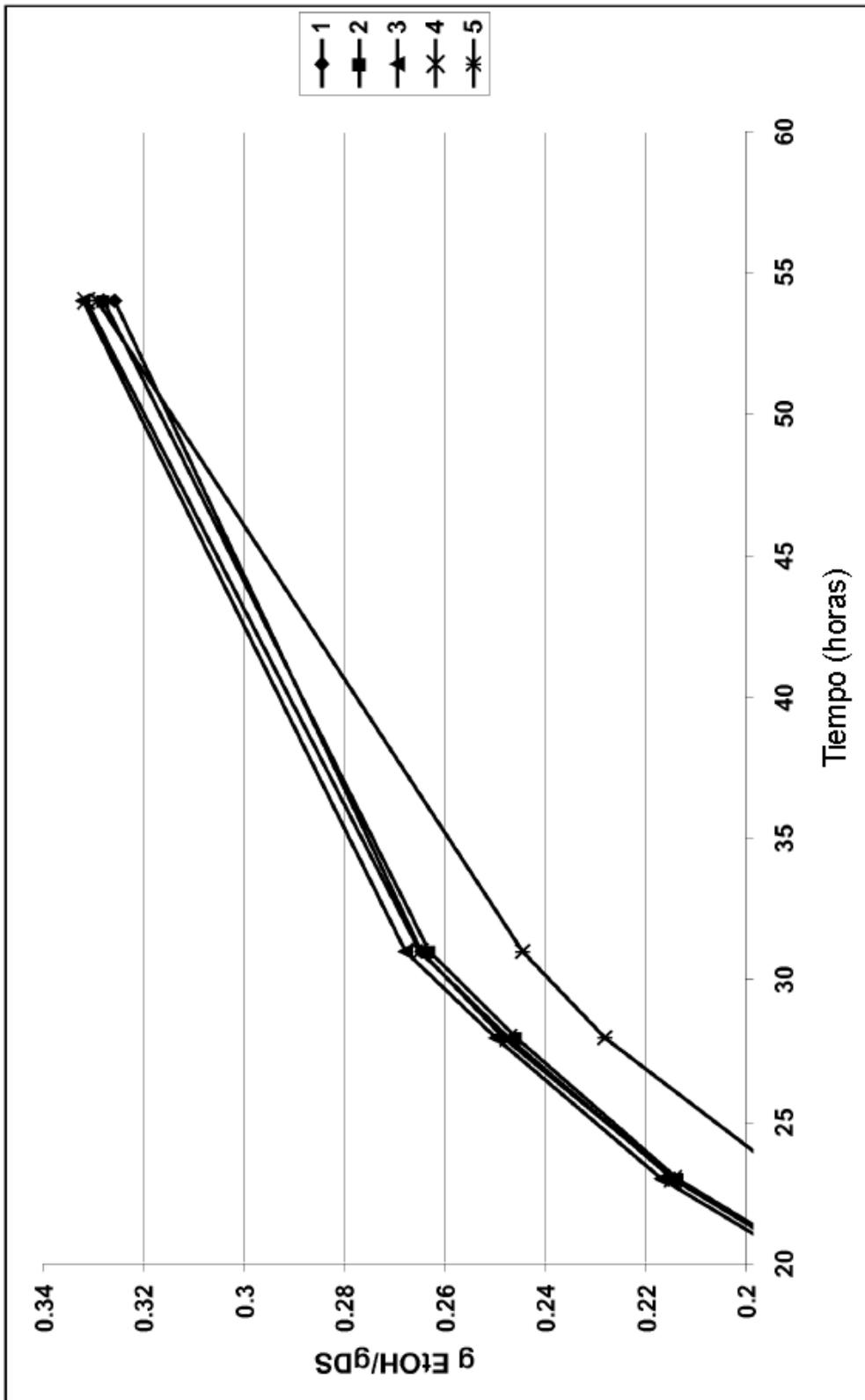


Figura 1

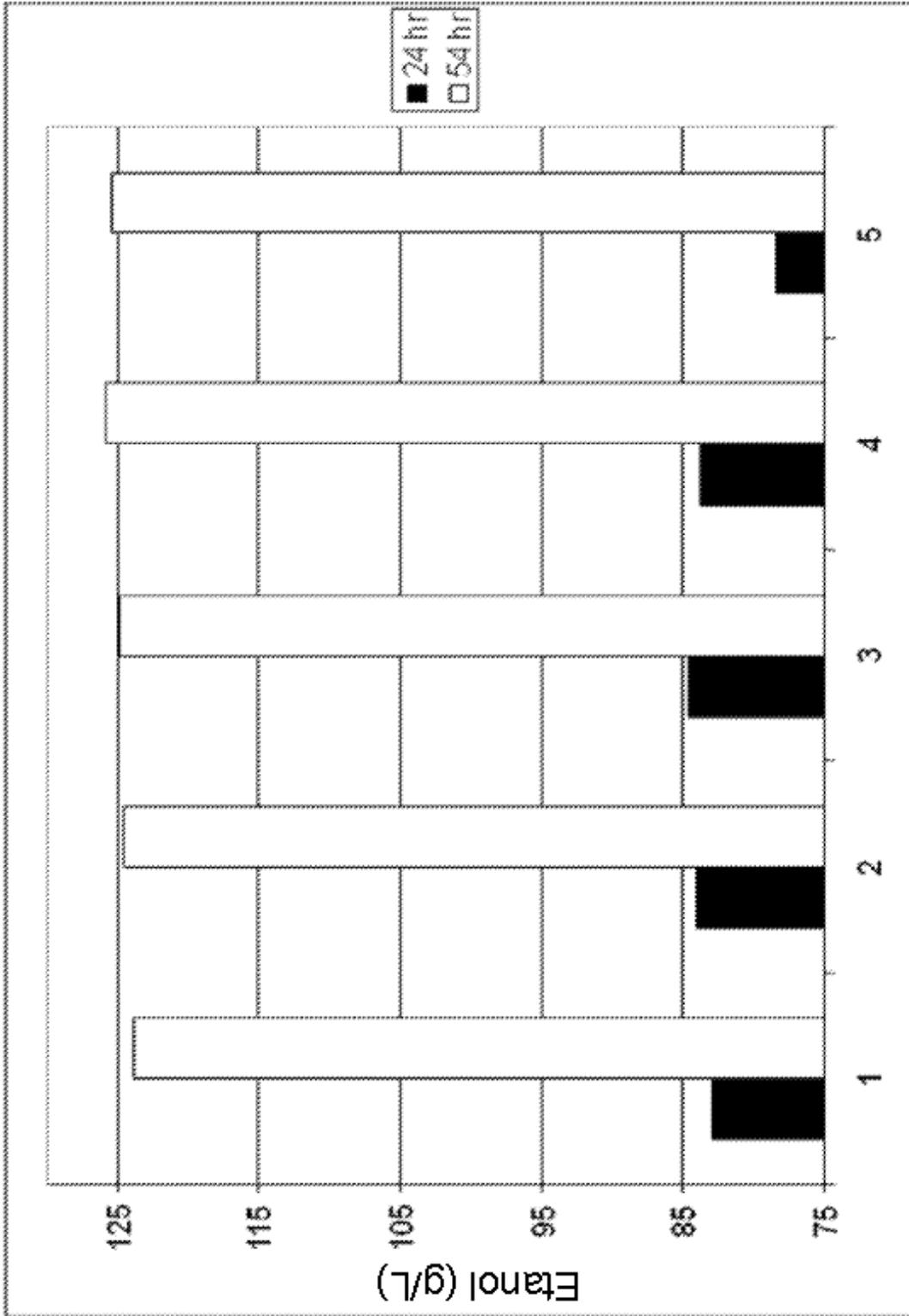


Figura 2