

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 589**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2006 PCT/US2006/006966**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2006 WO06086792**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2006 E 06736308 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 1848791**

54 Título: **Procesos de producción de productos de fermentación**

30 Prioridad:

07.02.2005 US 651001 P

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

09.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SMITH, MADS, TORRY;
RESS, JOHN;
WENGER, KEVIN, S y
FESTERSEN, RIKKE, MONICA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 611 589 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 de producción de productos de fermentación

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación, tales como etanol, de material que contiene almidón, incluyendo la degradación de las proteínas contenidas en el material que contiene almidón.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Un número grande de productos comerciales que son difíciles de producir sintéticamente se pueden producir por fermentación.

15 Tales productos incluyendo 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-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, de 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); hormonas; y también productos comúnmente usados en el alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso), cuero e industrias de tabaco.

20

[0003] El etanol tiene una aplicación generalizada, incluyendo, como una sustancia química industrial, aditivo de gasolina o carburante líquido recto.

25 Como un combustible o aditivo combustible, el etanol reduce espectacularmente las emisiones de aire mientras mejora el rendimiento del motor.

Como un combustible renovable, el etanol reduce la dependencia nacional en fuentes de combustible fósiles agotables y finitas, en gran medida, extranjeras, mientras disminuye la acumulación neta de dióxido de carbono en la atmósfera.

30

[0004] Típicamente el etanol se produce por licuefacción del material que contiene almidón seguida de la sacarificación secuencial y fermentación simultáneas.

La licuefacción implica la gelatinización de almidón simultáneamente con o seguida de la adición de alfa-amilasa para degradar almidón en dextrinas.

35 Cuando se produce el etanol, el material que contiene almidón licuado es sacarificado.

La sacarificación es un paso en el que las dextrinas se convierten en azúcares DP₁₋₃ de bajo peso molecular que, por ejemplo, se pueden convertir por una levadura en etanol.

40

[0005] La patente EE.UU. N° 5,231,017A divulga un proceso de producción de etanol que comprende (a) licuefacción de la materia prima en presencia de una alfa-amilasa, (b) sacarificación del triturado licuado en presencia de una glucoamilasa, (c) fermentación y (d) recuperación del etanol, donde una proteasa se introduce en el triturado licuado durante la sacarificación y/o fermentación.

45

[0006] La patente canadiense 1,143,677 revela un proceso de producción de etanol de materia prima amilácea por la hidrolización de dicho material de materia prima con una enzima amilolítica y una preparación con celulosa derivada a partir de un cultivo de *Trichoderma kónigii* que comprende un complejo de enzimas hidrolíticas incluyendo C₁-enzima, exoglucanasa, endoglucanasa, celobiasa, xilanasa, beta-glucosidasa, proteasa y un número de enzimas amilolíticas.

50

[0007] Mullins et al., "Biomass" 16 (1988) 2, pp. 77-87, demostró que la adición de proteasa alcalina al triturado resulta en un aumento de nitrógeno de amino suficiente para sostener ritmos acelerados de fermentación de etanol.

[0008] Hay una necesidad de otra mejora de procesos de producción de producto de fermentación.

55 Resumen de la invención

[0009] El primer aspecto la presente invención se refiere a procesos de producción de los productos de fermentación, tal como etanol, de material que contiene almidón, que comprende

- 60 (a) licuefacción de dicho material que contiene almidón con una alfa-amilasa;
 (b) tratamiento con una proteasa;
 (c) sacarificación en presencia de una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
 (d) fermentación en presencia de un organismo fermentador, donde los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente durante 0,1 a 12 horas antes del paso (c) y paso (d) que se realizan simultáneamente o consecutivamente.

65

Breve descripción de los dibujos

[0010]

Fig. 1 muestra el rendimiento de etanol (g/g DS) después de SSF 1) con tratamiento post licuefacción con proteasa ALC (Alc) y 2) sin enzima (NE- no enzimático), a varias temperaturas, tiempos de tratamiento y pHs;

5 Fig. 2 muestra el tiempo que tardan teóricamente las fermentaciones en alcanzar el rendimiento de etanol observado en la fermentación de control sin post-licuefacción.

Los valores se basan en la pérdida de peso por gramos de maíz triturado;

Fig. 3 muestra la relación de glicerol/etanol (g/g) con tratamiento post licuefacción con proteasa ALC (Alc) y 2) sin enzima (NE- no enzimático), a varias temperaturas, tiempos de tratamiento y pHs;

10 Fig. 4 muestra glucosa residual [g/gDS] con tratamiento post licuefacción con proteasa ALC (Alc) y 2) sin enzima (NE- no enzimático), a varias temperaturas, tiempos de tratamiento y pHs;

Fig. 5 muestra los perfiles de pérdida de peso de licuefacción y degradación de proteína simultáneas a 67,5 °C para dos proteasas en comparación con un control de no proteasa en función del tiempo de fermentación;

15 Fig. 6 muestra los perfiles de pérdida de peso para licuefacción y degradación de proteína simultáneas a 70 °C para dos proteasas en comparación con un control de no proteasa en función del tiempo de fermentación;

Fig. 7 muestra el rendimiento de etanol (g/g DS) después de 70 horas de fermentación cuando la licuefacción y degradación de proteína se realiza simultáneamente con y sin proteasa a 67,5 °C y 70 °C, respectivamente;

Fig. 8 muestra el nivel de glicerol (g/g DS) después de 70 horas de fermentación cuando la licuefacción y degradación de proteína se realizan simultáneamente con y sin proteasa a 67,5 °C y 70 °C, respectivamente;

20 Fig. 9 muestra la proporción de glicerol/etanol (g glicerol/g etanol) después de 70 horas de fermentación cuando la licuefacción y degradación de proteína se realizan simultáneamente con y sin proteasa a 67,5 °C y 70 °C, respectivamente;

Descripción de la invención

25 [0011] La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación, tal como etanol, de material que contiene almidón.

30 [0012] Los índices de fermentación significativamente más rápidos, rendimiento de fermentación más alto, una relación de glicerol/etanol inferior y una concentración de glucosa residual inferior se pueden obtener por el tratamiento del triturado de maíz licuado con una proteasa antes de la sacarificación y fermentación (simultánea).

[0013] Un paso de retención separado después de la licuefacción permite la temperatura y condiciones de pH óptimas para la proteasa.

35 La descomposición inicial de proteína en el paso de licuefacción libera nitrógeno de amino libre (FAN) que sirve como factores de crecimiento para el organismo fermentador, tal como levadura.

La liberación de FAN ayuda a la levadura a resistir la tensión de concentraciones altas de sustrato y de producto, de forma que disminuye la producción de glicerol y aumenta la productividad de etanol y rendimientos de etanol.

El tiempo requerido a condiciones enzimáticas óptimas es solo unas pocas horas.

40 Por ejemplo, se ha observado que 2 horas de tratamiento post licuefacción mejoraron el rendimiento de etanol más del 14 % en comparación con fermentaciones SSF correspondientes donde se efectuó el tratamiento no post licuefacción.

La productividad aumentada sobrepasa inmensamente el tiempo consumido en el tratamiento de post licuefacción.

45 [0014] En el ejemplo 1 (Fig. 2) se muestra que las fermentaciones de triturado de maíz post licuado con una proteasa alcalina derivada de *Bacillus licheniformis* alcanzan el rendimiento de etanol de una fermentación SSF estándar (es decir, no post licuefacción) en cerca de la mitad de tiempo en comparación con condiciones idénticas donde no estaba presente ninguna proteasa.

50 Se ha observado que los tiempos de tratamiento aumentados y dosis de proteasa aumentaron el rendimiento final en general.

Sin embargo, el aumento fue más pronunciado en las dosis inferiores de proteasa, es decir, da la máxima respuesta en los rendimientos por cantidad enzimática adicionada.

Se descubrió que la respuesta a la dosis de proteasa aumentada se estabiliza cuando la concentración se acerca al 0,1 % en peso DS.

55 Sin embargo, era evidente que el tiempo de tratamiento aumentado continuó para mejorar el rendimiento de fermentación en el periodo de tiempo evaluado.

Entre 7 y 8 horas de tratamiento post licuefacción con un nivel de dosificación de proteasa ALC de 0,007 % en peso de TS resultaron ser óptimas.

60 [0015] Los inventores han descubierto sorprendentemente que el tratamiento de proteasa puede ventajosamente efectuarse simultáneamente con licuefacción.

Esto se ilustra en el ejemplo 2.

Se cree que la matriz de proteína en la harina de maíz estabiliza la proteasa a diferencia del puré de maíz cocinado donde las proteínas son precipitadas.

65 Los inventores descubrieron que incluso los periodos de tratamiento de proteasa relativamente cortos fueron suficientes.

Así, la degradación de proteína no es el factor de limitación de tiempo para la licuefacción y degradación de proteína simultáneas.

Es más bien la capacidad de la alfa-amilasa de actuar en el material que contiene almidón.

5 Procesos para producir productos de fermentación de material que contiene almidón

[0016] La invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, de material que contiene almidón, cuyo proceso incluye la licuefacción secuencial o simultánea, la degradación de proteína, sacarificación y pasos de fermentación.

10 [0017] En este aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación de material que contiene almidón, que incluye los pasos de:

(a) licuefacción de dicho material que contiene almidón con una alfa-amilasa;

(b) tratamiento con una proteasa;

15 (c) sacarificación en presencia de una enzima generadora de fuente de carbohidratos;

(d) fermentación en presencia de un organismo fermentador, donde los pasos (a) y (b) se realizan simultáneamente durante 0,1 a 12 horas antes del paso (c) y paso (d) que se realizan simultáneamente o consecutivamente.

20 [0018] En una forma de realización, el proceso de la invención comprende además un paso (e) de recuperación del producto de fermentación, tal como etanol, preferiblemente, por destilación.

Licuefacción - paso (a)

25 [0019] Según la presente invención, el paso (a) es un paso de licuefacción.

La licuefacción es un paso del proceso en el que el material que contiene almidón, preferiblemente grano (entero) molido se descompone (hidrolizado) en maltodextrinas (dextrinas).

La licuefacción se realiza típicamente utilizando una alfa-amilasa o por otros medios conocidos en la técnica para proporcionar tal efecto (por ejemplo, hidrólisis ácida).

30 Las alfa-amilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico.

La alfa-amilasa se puede utilizar en una cantidad entre 0,0005-5 KNU por g DS (sólido seco), preferiblemente, entre 0,001-1 KNU por g DS, tal como alrededor de 0,050 KNU por g DS.

Ejemplos adecuados de alfa-amilasas se pueden encontrar en la sección "Alfa-Amilasa" de abajo.

35 El pH durante la licuefacción puede ser entre aproximadamente 4,5 y 7, preferiblemente, entre 5 y 6, preferiblemente, alrededor de 5,4 o 5,6.

[0020] La materia prima puede ser cualquier material vegetal que contenga almidón.

Se prefieren granos enteros molidos, especialmente, maíz, trigo y milo.

40 Ejemplos de materiales que contienen almidón contemplados se pueden encontrar en la sección "materiales que contienen almidón" de abajo.

[0021] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes del paso (a), los pasos de:

i) moler el material que contiene almidón;

45 ii) formar un lodo que comprende el material que contiene almidón molido y agua.

[0022] El lodo acuoso puede contener de 10-50 % en peso, preferiblemente 20-40 % en peso, especialmente 25-35 % en peso de material que contiene almidón.

50 El lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización inicial y la alfa-amilasa se puede adicionar para iniciar la licuefacción (diluendo).

[0023] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima en la que comienza la gelatinización del almidón.

55 El almidón calentado en el agua empieza a gelatinizar entre 55 °C y 75 °C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia.

Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según las especies de planta, la variedad particular de las especies de planta, al igual que con las condiciones de crecimiento.

60 En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material dado que contiene almidón es la temperatura en la que la birrefringencia se pierde en 5 % de los gránulos de almidón, utilizando el método descrito por Gorinstein. S. and Lii. C., Starch/Starke, Vol. 44 (12) págs. 461-466 (1992).

[0024] En una forma de realización, el lodo puede ser cocido a chorro para gelatinizar adicionalmente el lodo antes de ser sometido a alfa-amilasa en el paso (a) de la invención.

65 [0025] Más específicamente, la licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo caliente de tres pasos.

El lodo se calienta entre 60-95 °C, preferiblemente 65-90 °C y alfa-amilasa (típicamente alrededor de 1/3 de la dosis

total) se puede adicionar para iniciar licuefacción (diluyendo).

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

5 Luego, el lodo se enfría a 60-95 °C, preferiblemente 80-90 °C y más alfa-amilasa (típicamente alrededor de 2/3 de la dosis total) se añade para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria).

La etapa de licuefacción normalmente se realiza a pH 4,5-6,5, en particular, a un pH entre 5 y 6.

Granos enteros molidos y licuados se conocen como triturado.

10 Licuefacción y degradación de proteína simultáneas

[0026] Según la invención, la degradación de proteína se realiza simultáneamente con la licuefacción del material que contiene almidón.

En otras palabras, el paso (a) y paso (b) se realizan simultáneamente.

15 La temperatura durante el tratamiento de proteasa depende de las enzimas usadas, pero puede estar en el rango de 25-90 °C, preferiblemente 30-80 °C, tal como de 65-75 °C, especialmente alrededor de 50 ° o 70 °C.

Si la proteasa y alfa-amilasa usadas son estables al calor, las temperaturas en los rangos más altos se pueden utilizar.

El pH preferido depende de las enzimas usadas como se ha indicado anteriormente en la sección de "licuefacción", pero según la invención está preferiblemente entre pH 4-7, en particular 5-6.

20 Es el tiempo de licuefacción requerido el que determina cual es un período de tiempo adecuado para realizar la licuefacción y la degradación de proteína simultáneas, según la invención.

Por lo tanto, licuefacción y degradación de proteína simultáneas pueden, según la invención, realizarse durante un periodo de 0,1 a 12 horas, preferiblemente, 1 a 10 horas, especialmente 2 a 8 horas.

25 Se debe entender que la degradación de proteína contenida en el material que contiene almidón se puede iniciar (por adición de proteasa) en cualquier momento durante la licuefacción, tal como por ejemplo al lodo acuoso antes del paso (a).

Sacarificación - paso (c) y fermentación - paso (d)

30 [0027] La "sacarificación" es un proceso donde las maltodextrinas (tal como material que contiene almidón post licuado) se convierten en azúcares de bajo peso molecular, tales como azúcares DP₁₋₃.

[0028] La sacarificación en el paso (c) se puede realizar usando condiciones bien conocidas en la técnica.

35 [0029] La sacarificación se realiza en presencia de la enzima generadora de fuente de carbohidratos.

Ejemplos de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos son glucoamilasa, amilasa maltogénica, beta-amilasa y una combinación de las mismas.

40 La enzima(s) generadoras de fuente de carbohidratos, preferiblemente, una glucoamilasa, está (están) preferiblemente presentes en una concentración de 0,005-5 AGU/g DS, más preferiblemente entre 0,01-1 AGU/g DS, tal como especialmente alrededor de 0,1-0,5 AGU/g DS.

Ejemplos de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos se pueden encontrar en la sección ENZIMAS" de abajo e incluyen glucoamilasas derivadas de una cepa de géneros tal como *Aspergillus*, *Talaromyces* y *Athelia*.

45 [0030] Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar aproximadamente de 20 a 100 horas, preferiblemente, 24 a aproximadamente 72 horas.

[0031] Es común solo hacer una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65 °C, típicamente aproximadamente 60 °C, seguida de sacarificación completa durante la fermentación.

50 El pH durante la sacarificación está típicamente en el rango entre 4 y 6, normalmente, en alrededor de pH 4,5-5,5.

[0032] La etapa de fermentación (d) se realiza en presencia de un organismo fermentador.

La elección del organismo fermentador depende del producto para ser producido.

Un experto en la técnica puede fácilmente seleccionar un organismo fermentador adecuado.

55 En el caso de la producción de etanol, el organismo fermentador es levadura, preferiblemente, una cepa de *Saccharomyces*, especialmente, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Organismos fermentadores adecuados se mencionan en la sección "organismos fermentadores" de abajo.

60 [0033] En una forma de realización preferida, los pasos de sacarificación y fermentación se combinan en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, tal como levadura y enzima(s) se puede adicionar unido.

Como se menciona arriba, es común incluir un paso de pre-sacarificación antes de SSF.

Un proceso SSF se realiza típicamente durante entre 20 y 100 horas, preferiblemente, aproximadamente 24 a 72 horas y a una temperatura que es óptima para el organismo fermentador.

65 En caso de la producción de etanol, el proceso SSF se puede realizar a una temperatura entre 28 y 34 °C, preferiblemente, alrededor de 32 °C.

El pH durante la fermentación puede ser entre 3 y 6, preferiblemente, pH 4-5.

[0034] Conforme a la presente invención, el paso de fermentación incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, de 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.

Los procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólicos, como se conocen en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbica, como se conocen bien en la técnica.

Material que contiene almidón

[0035] El material que contiene almidón usado según la presente invención puede ser cualquier material vegetal que contiene almidón.

Preferidos son materiales que contienen almidón seleccionados del grupo consiste en: tubérculos, raíces y granos enteros; y cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización, el material que contiene almidón se obtiene de cereales.

El material que contiene almidón puede, por ejemplo, ser seleccionado de los grupos que consisten en grano (maíz), mazorca de maíz, trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, milo y patata; o cualquier combinación de los mismos.

[0036] Cuando el producto de fermentación es etanol, el material que contiene almidón es preferiblemente granos enteros o al menos principalmente granos enteros.

La materia prima también puede consistir en o comprender un flujo lateral de tratamiento de almidón, por ejemplo, carbohidrato C6 que contiene corrientes de proceso que no se adecuan a la producción de jarabes.

Molienda

[0037] En una forma de realización preferida de la invención, el material que contiene almidón se reduce en tamaño, por ejemplo, moliéndolo antes del paso (a) para descubrir la estructura y permitir otro tratamiento.

Típicamente se usan dos procesos de molienda: molienda en seco y en húmedo.

El término "molienda en seco" denota la molienda de los granos enteros.

En los granos enteros de molienda en seco se muelen y usan en la parte restante del proceso.

La molienda en húmedo ofrece una separación buena de germen y alimento (gránulos de almidón y proteína), y se aplica con unas pocas excepciones en ubicaciones donde hay una producción paralela de jarabes.

La molienda en seco se prefiere en procesos que tienen como objetivo la producción de etanol.

[0038] El término "triturar" se entiende también como moler.

En una forma de realización preferida de la invención, se muele en seco.

Se pueden utilizar otras tecnologías de reducción de tamaño, tales como tecnología emulsionante, pulsación giratoria.

Organismos fermentadores

[0039] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo capaz de la provisión del producto de fermentación deseado.

Los organismos fermentadores adecuados, según la invención, son capaces de fermentar, es decir, convertir, preferiblemente azúcares DP₁₋₃, tal como especialmente glucosa y maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, tal como etanol.

Ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como levadura.

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

La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, RED STAR™/Lesaffre, ETHANOL RED™ (disponible de Red Star/Lesaffre, EE.UU), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, a division of Burns Philp Food Inc., EE.UU), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand, AB, Sweden) y FERMIOL™ (disponible de DSM Specialties).

[0040] Las células de levadura se aplican preferiblemente en cantidades de 10⁵ a 10¹², preferiblemente de 10⁷ a 10¹⁰, especialmente 5x10⁷ cuenta de levadura posible por mL de caldo de fermentación.

Durante la fase de producción de etanol, la cuenta de célula de levadura debería estar preferiblemente en el rango de 10⁷ a 10¹⁰, especialmente alrededor de 2 x 10⁸.

Otra guía sobre el uso de levadura para fermentación se puede encontrar en, por ejemplo, "The alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R.Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999).

Enzimas

Proteasa

[0041] Según la presente invención, el material que contiene almidón se puede tratar con una proteasa de cualquier origen.

La adición de proteasa(s) aumenta el nivel FAN (nitrógeno de amino libre) y aumenta el índice de metabolismo del organismo fermentador, tal como levadura y además ofrece una eficiencia de fermentación más alta.

5 Según la invención, una peptidasa y otras enzimas de la degradación de proteína son referidas como proteasas. En una forma de realización preferida, la proteasa es una endoproteasa y/o una exo-proteasa.

[0042] Las proteasas adecuadas pueden ser de origen fúngico, bacteriano, incluyendo levadura y hongos filamentosos, y vegetal.

10 [0043] En una forma de realización, la proteasa es una proteasa ácida, es decir, una proteasa caracterizada por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7, por ejemplo, a un pH entre 2-7.

15 En una forma de realización, la proteasa ácida tiene un pH óptimo en el rango de 2,5 y 3,5 (determinado en sustrato de caseína de nitrógeno alto a 0,7 % p/v a 37 °C) y una temperatura óptima entre 5 y 50 °C a una concentración enzimática de 10 mg/mL a 30 °C durante una hora en 0,1 M tampón de piperazina/acetato/glicina).

[0044] En otra forma de realización, la proteasa es una proteasa alcalina, es decir, una proteasa caracterizada por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones alcalinas sobre pH 7, por ejemplo, a un pH entre 7-11.

20 En una forma de realización, la proteasa alcalina se deriva de una cepa de *Bacillus*, preferiblemente, *Bacillus licheniformis*.

En una forma de realización, la proteasa alcalina tiene una temperatura óptima en el rango de 7 y 11 y una temperatura óptima de alrededor de 70 °C a pH 9 determinado.

[0045] En otra forma de realización, la proteasa es una proteasa neutra, es decir, una proteasa caracterizada por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones entre pH 5 y 8.

25 En una forma de realización, la proteasa alcalina se deriva de una cepa de *Bacillus*, preferiblemente, *Bacillus amyloliquefaciens*.

30 En una forma de realización, la proteasa alcalina tiene un pH óptimo en el rango de entre 7 y 11 (determinado a 25 °C, 10 minutos de tiempo de reacción con una concentración enzimática de 0,01-0,2 AU/L) y una temperatura óptima entre 50 °C y 70 °C (determinado a un pH 8,5, 10 de minutos tiempo de reacción y una concentración enzimática de 0,03-0,3 AU/L).

[0046] En una forma de realización, la proteasa es una metaloproteasa.

35 En una forma de realización preferida, la proteasa se deriva de una cepa del género *Thermoascus*, preferiblemente, una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n° 0670 con la secuencia mostrada en la parte madura de SEQ ID n.º: 2 en la WO 03/048353.

La proteasa *Thermoascus aurantiacus* es activa de 20-90 °C, con una temperatura óptima alrededor de 70 °C. Además, la enzima está en actividad entre pH 5-10 con un óptimo alrededor de pH 6.

40 [0047] las proteasas de planta adecuadas se pueden derivar de cebada.

[0048] Las proteasas bacterianas adecuadas incluyen proteasas *Bacillus* derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis*.

45 Las proteasas bacterianas filamentosas adecuadas se pueden derivar a partir de una cepa de proteasa *Nocardiosis*, preferiblemente *Nocardiosis prasina* NRRL 18262 (o *No-cardiopsis* sp. 10R) y *Nocardiosis dassonavilla* NRRL 18133 (*Nocardiosis dassonavilla* M58-1) ambas descritas en la WO 1988/003947 (Novozymes).

[0049] Las proteasas fúngicas de ácido adecuado incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Thermoaccus* y *Torulopsis*.

50 Especialmente contempladas son las proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (ver, por ejemplo, Koaze et al., (1964), Agr. Biol. Chem. Japan, 28, 216), *Aspergillus saitoi* (ver, por ejemplo, Yoshida, (1954) J. Agr. Chem. Soc. Japan, 28, 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida et al., (1977) Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044) o *Aspergillus oryzae*; proteasas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei* descritas en la patente US n° 4,357,357 y patente US n° 3,988,207; y *Rhizomucor mehei* o *Rhizomucor pusillus* descritas, por ejemplo, en la WO 94/24880.

[0050] Las proteasas de ácido aspártico son descritas en, por ejemplo, Hand-book of Proteolytic Enzymes, Edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Aca-demic Press, San Diego, 1998, Chapter 270).

60 Ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en (R.M. Berka et al. Gene, 96,313 (1990)); (R.M. Berka et al. Gene, 125,195-198 (1993)); and Gomi et al. Biosci. Biotech. Biochem. 57,1095-1100 (1993).

[0051] Productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, NEUTRASE®, RENILASE®, NOVOZYM™ FM 2.0L, y NOVOZYM™ 50006 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106™ y SPEZYME™ FAN de Genencor Int., Inc., EE.UU.

65

[0052] La proteasa puede estar presente en concentraciones en el rango de 0,0001 a 1,0 % en peso de TS, preferiblemente 0,001 a 0,1 % en peso de TS.

5 Alfa-amilasa

[0053] La alfa-amilasa puede ser según la invención de cualquier origen. Preferidas son las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

10 [0054] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana.
El término "alfa-amilasa ácida" implica una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene una actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente, de 3,5 a 6 o más preferiblemente de 4-5.

15 Alfa-amilasas bacterianas

[0055] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana puede preferiblemente derivar del género *Bacillus*.

20 [0056] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa *Bacillus* es derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. Amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otra especie *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada en SEQ ID n.º: 4 en la WO 99/19467, la *Bacillus amyloliquefaciens* alfa-amilasa (BAN) mostrada en SEQ ID n.º: 5 en la WO 99/19467 y la alfa-amilasa *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en SEQ ID n.º: 3 en la WO 99/19467.
25 En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una enzima con un grado de identidad de al menos 60 %, preferiblemente al menos 70%, más preferentemente al menos 80 %, aún más preferentemente al menos 90 %, tal como al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID n.º: 1, 2, 3, 4, o 5, respectivamente, en la WO 99/19467.

30 [0057] La alfa-amilasa *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente una descrita en cualquiera de la WO 96/23873, la WO 96/23874, la WO 97/41213, la WO 99/19467, la WO 00/60059 y la WO 02/10355. En concreto, variantes de alfa-amilasa contempladas se describen en la Patente US nos. 6,093,562, 6,297,038 o Patente EE.UU. n.º 6,187,576 e incluyen variantes alfa-amilasa *Bacillus stearothermophilus* (BSG alfa-amilasa) con una delección de uno o dos aminoácidos en posiciones R179 a G182, preferiblemente una delección doble descrita en la WO 1996/023873, ver por ejemplo página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta (181-182) en comparación con la secuencia aminoácida alfa-amilasa BSG tipo salvaje expuesta en la SEC ID n.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o delección de aminoácidos R179 y G180 usando SEC ID n.º: 3 en la WO 99/19467 para la numeración.
35 Aún más preferidas son las alfa-amilasas *Bacillus*, especialmente alfa-amilasa *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una delección doble que corresponde con delta (181-182) y además comprende una N193F sustitución (denominada también I181* + G182* + N193F) en comparación con la alfa-amilasa de secuencia aminoácida BSG tipo salvaje expuesta en la SEC ID n.º:3 descrita en la WO 99/19467.

40 [0058] La alfa-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 amilopeptina a maltosa en la configuración alfa.
45 Una alfa-amilasa maltogénica de cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S, Dinamarca. La alfa-amilasa maltogénica es descrita en la Patente EE.UU. nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

50 Alfa-amilasas de bacteriana híbrida

[0059] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende residuos de aminoácidos 445 C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como SEQ ID n.º: 4 en WO 99/19467) y los residuos de aminoácidos 37 N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como SEQ ID n.º: 3 en la WO 99/19467), con uno o más, especialmente todos, de la siguiente sustitución:
55 G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis*). Preferidas también son variantes con una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otra columna vertebral de alfa-amilasa *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre posiciones 176 y 179, preferiblemente, delección de E178 y G179 (utilizando el SEQ ID n.º: 5 numeración de la WO 99/19467).
60

[0060] La alfa-amilasa bacteriana se puede adicionar en cantidades como se conocen bien en la técnica. Cuando se miden en unidades KNU (descritas abajo en la sección materiales y métodos) la actividad de alfa-amilasa está preferiblemente presente en una cantidad de 0,0005-5 KNU por g DS, preferiblemente, entre 0,001-1 KNU por g DS, tal como alrededor de 0,050 KNU por g DS.
65

Alfa-amilasas fúngicas

5 [0061] Alfa-amilasas de ácido fúngico incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas a partir de una cepa del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachii*.

[0062] Una alfa-amilasa de ácido fúngico preferido es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que está preferiblemente derivada a partir de una cepa de *Aspergillus oryzae*.

10 En la presente descripción, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una alta identidad, es decir, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 % o incluso 100 % de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID n.º: 10 en la WO 96/23874.

[0063] Otra alfa-amilasa ácida preferida está derivada de una cepa *Aspergillus niger*.

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

La alfa-amilasa de *Aspergillus niger* ácida se muestra también como SEQ ID n.º: 1 en la WO 2004/080923 (Novozymes).

20 También se contemplan variantes de dicha amilasa fúngica ácida con al menos 70 % de identidad, tal como al menos 80 % o incluso al menos 90 % de identidad, tal como al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad para SEQ ID n.º: 1 en la WO 2004/080923.

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

25 [0064] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas incluyen aquellas derivadas a partir de una cepa de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente, una cepa de *Rhizomucor pusillus* o *Meripilus giganteus*.

[0065] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, ningún híbrido) o un variante del mismo.

30 En una forma de realización, la alfa-amilasa fúngica ácida tipo salvaje está derivada de una cepa de *Aspergillus kawachii*, por ejemplo, la descrita por Kaneko et al. J. Fermento. Bioeng. 81:292-298(1996) "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.

35 Alfa-amilasa híbrida fúngica

[0066] En una forma de realización, la alfa-amilasa fúngica es una alfa-amilasa híbrida.

Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen los descritos en la WO 2005/003311 o EEUU

40 [0067] Publicación de patente n.º 2005/0054071 (Novozymes) o solicitud de patente de EEUU n.º 60/638,614 (Novozymes).

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

45 [0068] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la tabla 1 a 5 en los ejemplos en la solicitud de patente co-pendiente de EEUU n.º 60/638,614, que incluye una variante de fungamil con dominio catalítico JA118 y *Athelia rolfsii* SBD (SEC ID n.º: 100 en la solicitud US 60/638,614), alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID n.º: 101 en la US 60/638,614) y alfa-amilasa *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID n.º: 102 en la US 60/638,614).

50 [0069] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la publicación de patente EEUU n.º 2005/0054071, incluyendo aquellas descritas en la tabla 3 en la página 15, tal como alfa-amilasa *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

55 Productos alfa-amilasa comerciales

60 [0070] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ (DSM; Holanda), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™, SUPER SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ ETHYL, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.) y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

65 [0071] Unas alfa-amilasas ácidas, según la invención, pueden ser añadidas en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente, 0,10 a 5 AFAU/g DS, especialmente, 0,3 a 2 AFAU/g DS.

Enzima generadora de fuente de carbohidratos

[0072] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye glucoamilasa (siendo generadores de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (siendo generadores de maltosa).

5 Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como una fuente de energía por el 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 etanol.

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

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

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

15 La proporción entre actividad de alfa-amilasa fúngica ácida (AFAU) por actividad de glucoamilasa (AGU) (AFAU por AGU) , en una forma de realización de la invención, puede ser al menos 0,1, en particular, al menos 0,16 tal como en el rango de 0,12 a 0,50 o más.

Glucoamilasa

20 [0073] Una glucoamilasa usada según la invención se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada a partir de un microorganismo o una planta.

Glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas *Aspergillus*, en particular, glucoamilasa *A. Niger* G1 o G2 (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102) o variantes de las mismas, tal como una descrita en la WO 92/00381, WO 00/04136, WO 01/04273 y WO 03/029449 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa *A. Awamori* (WO 84/02921), *A. Oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949) o variantes o fragmentos de la misma.

30 [0074] Otras variantes de glucoamilasa *Aspergillus* incluyen variantes para mejorar la termoestabilidad: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Eng. 9,499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Engng. 8,575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301,275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35,8698-8704; e introducción de Pro residuos en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Engng. 10,1199-1204).

35 Otras glucoamilasas incluyen *Athelia rolfsii* (denominada previamente *Corticium rolfsii*) glucoamilasa (ver Patente EE.UU. N° 4,727,026 y (Nagasaka, Y. Et al. (1998) Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol Biotechnol 50:323-330), glucoamilasas *Talaromyces*, en particular, derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente US n.º Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (Patente US n.º 4,587,215).

Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular, *C. Thermoamylolyticum* (EP 135,138) y *C. Thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

40 [0075] Otras glucoamilasas contempladas incluyen glucoamilasas a partir de una cepa del género *Trametes*, preferiblemente, una cepa de *Trametes cingulata* descrita en la solicitud provisional EEUU co-pendiente n° 60/650,612 solicitada el 7 febrero de 2005.

45 [0076] En otra forma de realización, la glucoamilasa es una enzima híbrida, preferiblemente, que incluye un dominio catalítico de origen fúngico.

El dominio catalítico se puede derivar a partir de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente, a partir de una cepa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; *Athelia*, preferiblemente, *Athelia rolfsii*; *Talaromyces*, preferiblemente, *Talaromyces emersonii*.

50 En una forma de realización preferida, la glucoamilasa híbrida comprende un módulo de unión a carbohidratos de origen fúngico, tal como derivado a partir de una cepa *Aspergillus*, alfa-amilasa *Aspergillus kawachii* o derivada de glucoamilasa *Aspergillus niger* o derivada de *Athelia* sp. glucoamilasa, preferiblemente, glucoamilasa *Athelia rolfsii*.

[0077] En una forma de realización preferida, la glucoamilasa híbrida es una descrita en la WO 2005/045018.

55 [0078] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

60 [0079] La glucoamilasa, en una forma de realización, puede ser añadida en una cantidad de 0,005-2 AGU/g DS, preferiblemente, entre 0,01-1 AGU/g DS, tal como especialmente alrededor de 0,3 AGU/g DS.

Beta-amilasa

65 [0080] Al menos según la invención, la beta-amilasa (E.C 3,2,1,2) es el nombre generalmente dado a las amilasas maltogénicas de exo-acto, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glicosídicos en la amilosa, amilopectina y

polímeros de glucosa relativos.

Sucesivamente, se retiran las unidades de maltosa de las extremidades de cadena no-reducida de una manera gradual hasta que la molécula se degrada o, en el caso de amilopectina, hasta que se alcanza un punto de derivación.

5 La maltosa liberada tiene la configuración anomérica beta, por lo tanto, el nombre beta-amilasa.

[0081] Las beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty y C.T. Kelly, Progress in Industrial Microbiology, vol. 15, págs. 112-115, 1979).

10 Estas beta-amilasas se caracterizan por el hecho de que tienen temperaturas óptimas en el rango de 40 °C a 65 °C y pH óptimo en el rango 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., USA.

Amilasa maltogénica

15 [0082] 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.

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

Las alfa-amilasas maltogénicas están descritas en la Patente US nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

[0083] La amilasa maltogénica, en una forma de realización preferida, puede ser añadida en una cantidad de 0,05-5 mg de proteína/gramo DS totales o 0,05- 5 MANU/g DS.

25 [0084] Aunque no se mencione específicamente en el contexto de un proceso de la invención, debe entenderse que la enzima(s) es(son) usada en una "cantidad efectiva".

[0085] La invención descrita y reivindicada aquí no se limita en su alcance por las formas de realización específicas aquí descritas, ya que estas formas de realización se destinan como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención.

Cualquier forma de realización equivalente se destina a estar dentro del campo de esta invención.

De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí se harán aparentes para los expertos en la técnica desde la descripción precedente.

35 Tales modificaciones están también destinadas a encontrarse dentro del campo de las reivindicaciones anexas.

En caso de conflicto, las definiciones que incluye la presente descripción servirán de control.

[0086] La presente invención está posteriormente descrita por los ejemplos siguientes que no se deberían interpretar como limitación del ámbito de la invención.

40 Materiales y métodos

Enzimas:

45 [0087]

Proteasa ALC: proteasa alcalina tipo salvaje derivada de *Bacillus licheniformis*.

Glucoamilasa T: glucoamilasa derivada de *Talaromyces emersonii* y descrita como SEQ ID n.º: 7 en la WO 99/28448.

50 Alfa-amilasa A: variante de alfa-amilasa *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I81*+G182*+N193F descritas en la Patente US nº 6,187,576 y disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

La peptidasa A es un clan de peptidasa AA de la enzima de la familia A1 derivada de *Rhizomucor miehei* y producida recombinantemente en el *Aspergillus oryzae*.

La enzima está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

55 Levadura

[0088]

RED STAR™ disponible de Red Star/Lesaffre, USA

60 Métodos:

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0089] La actividad de amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato.

65 Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima y la reacción está seguida de muestras de mezcla de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo.

ES 2 611 589 T3

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

5 [0090] Una Unidad Kilo Novo de amilasa alfa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37 °C +/- 0.05, 0.0003 M Ca²⁺; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

10 [0091] Un archivo EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, cuyo archivo está incluido en la presente por referencia.

Determinación de actividad FAU

15 [0092] Una unidad de alfa-amilasa fúngica (FAU) se define como la cantidad de enzima, que descompone 5,26 g de almidón (Merck Amylum soluble Erg.B.6, lote 9947275) por hora basada en las siguientes condiciones estándar:

Sustrato	Almidón Soluble
Temperatura	37 °C
pH	4,7
Tiempo de reacción	7-20 Minutos

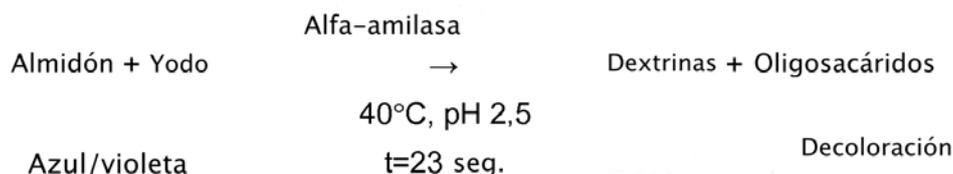
Determinación de actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

20 [0093] La actividad de alfa-amilasa ácida se mide en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con respecto a un estándar enzimático.

25 [0094] El estándar usado es AMG 300 L (de Novozymes A/S, Dinamarca, glucoamilasa tipo salvaje *Aspergillus niger* G1, también descrita en Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102) y la WO 92/00381). La alfa-amilasa neutra en esta AMG, después del almacenamiento, se encuentra a temperatura ambiente durante 3 semanas de aprox. 1 FAU/mL a por debajo de 0,05 FAU/mL.

30 [0095] La actividad de alfa-amilasa ácida en este estándar AMG se determina, de acuerdo con la descripción siguiente. En este método, 1 AFAU se define como la cantidad de enzima, que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo condiciones estándar.

35 [0096] El yodo forma un complejo azul con almidón pero no con sus productos de degradación. Por lo tanto, la intensidad de color 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 bajo condiciones analíticas específicas.



Condiciones estándar/condiciones de reacción: (por minuto)

Sustrato:	Almidón, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/L
CaCl ₂ :	1,85 MM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40 °C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	lambda=590nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Rango de actividad enzimática:	0,01-0,04 AFAU/mL

40 [0097] Si se prefieren detalles adicionales, estos se pueden encontrar en EB-SM-0259.02/01 disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

[0098] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida), que es un método absoluto.

Una unidad de amilasa ácida (AAU) es la cantidad de conversión de enzima 1 g de almidón (100 % de sustancia seca) por hora bajo condiciones estandarizadas en un producto con una transmisión a 620 nm después de la reacción con una solución de yodo de grado conocido igual a uno de una referencia de color.

5

Condiciones estándar/condiciones de reacción:	
Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g DS/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,13 M, pH=4,2
Solución de yodo:	40, 176 g de yoduro potásico + 0,088 g de yodo/L
Agua de ciudad	15 °-20 °dH (dureza de grado alemán)
pH:	4,2
Temperatura de incubación:	30 °C
Tiempo de reacción:	11 Minutos
Longitud de onda:	620 nm
Concentración enzimática:	0,13-0,19 AAU/mL
Rango de actividad enzimática:	0,13-0,19 AAU/mL

[0099] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico.

10 El almidón Lintner se obtiene por tratamiento de ácido clorhídrico diluido de almidón natural de modo que éste retiene la capacidad del color azul con yodo.

Detalles adicionales se pueden encontrar en la EP0140410B2, cuya divulgación se incluye en la presente por referencia.

15 Actividad de glucoamilasa (AGI)

[0100] La glucoamilasa (equivalente a amilogucosidasa) convierte almidón en glucosa.

La cantidad de glucosa se determina aquí por el método de glucosa-oxidasa para la determinación de actividad.

20 El método descrito en la sección 76-11 método de almidón-glucoamilasa con medición posterior de glucosa con glucosa-oxidasa en "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists".

Vol.1-2 AACC, de American Association of Cereal Chemists, (2000); ISBN: 1-891127-12-8.

[0101] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzima que formará 1 micro mol de glucosa por minuto bajo condiciones estándar del método.

25

Condiciones estándar/condiciones de reacción:	
Sustrato:	Almidón Soluble. Concentración aprox. 16 g de materia seca/L
Tampón:	Acetato, aprox. 0,04 M, pH=4,3
PH:	4,3
Temperatura de incubación:	60 °C
Tiempo de reacción:	15 Minutos
Terminación de la reacción:	NaOH a una concentración de aproximadamente 0,2 g/L (pH-9)
Concentración enzimática:	0,15-0,55 AAU/mL

[0102] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico.

30 El almidón Lintner se obtiene por tratamiento de ácido clorhídrico diluido de almidón natural de modo que éste retiene la capacidad de teñirse de azul con yodo.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0103] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo condiciones estándar 37 °C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

35

[0104] Se puede utilizar un sistema de autoanalizador.

La mutarotasa se añade al reactivo de glucosa deshidrogenasa, de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se vuelve en beta-D-glucosa.

La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, de manera que forma NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

5

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 actividad enzimática:	0,5-4,0 AGU/mL

Reacción de Color:	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0,21 mM
Tampón:	fosfato 0,12 M; 0,15 M NaCl
pH:	7,60 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37 °C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

[0105] Un archivo (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca, cuyo archivo se incluye en la presente por referencia.

10

Determinación de actividad de amilasa maltogénica (MANU)

[0106] Una MANU (Unidad Novo de amilasa maltogénica) se puede definir como la cantidad de enzima requerida para la liberación de un micro mol 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.

15

Ejemplos

[0107] **Ejemplo 1** (no es una forma de realización de la invención)

20

Tratamiento de proteasa post licuefacción de triturado de maíz

[0107] Los experimentos siguientes fueron efectuados en tubos de ensayo snap-cap de 15 mL, utilizando 5 g de triturado de maíz (34 % g en peso de sólido total/g):

25

- proteasa *Bacillus licheniformis* alcalina (proteasa ALC) tratamiento vs. ninguna enzima
- temperatura (50 ° y 70 °C)
- tiempo (0,5 y 2 horas)
- pH (5 y 8).

30

[0108] El impacto del tratamiento de proteasa (tratamiento post licuefacción) fue evaluado por conducción de una fermentación SSF estándar.

[0109] Tratamiento post licuefacción: el triturado de maíz licuado (CM) fue dividido en 2 x 500 mL y el pH fue ajustado a 5 y 8, respectivamente, en las dos fracciones.

35

Antes de ajustarse para el pH, las muestras se tomaron para la determinación de sólidos totales (TS).

Los pH ajustados licuados CM se distribuyeron (5 mL) en tubos de ensayo de 15 mL que fueron divididos entre cuatro bastidores de tubo para cada tiempo y temp:

40

- 50 °C° a 30 minutos,
- 50 °C° a 120 minutos,
- 70 °C a 30 minutos,
- 70 °C a 120 minutos.

[0110] La proteasa se añadió según el contenido en sólidos en cada tubo y los bastidores se dispusieron al baño maría a la temperatura y tiempo requeridos.

45

Cuando el tratamiento de post licuefacción fue finalizado, los tubos se enfriaron rápidamente y se almacenaron en hielo.

Antes de que se ajustaran los tubos de fermentación a pH 5 utilizando H₂SO₄ (aprox 140 microL de 20 % H₂SO₄).

[0111] SSF: las fermentaciones fueron efectuadas como SSF a 32 °C, 65 horas, 0,054-% p/p DS de glucoamilasa T, pH=5, utilizando levadura RED STAR™.

Todas las pruebas se realizaron en cuatro réplicas y los controles fueron incluidos en las fermentaciones.

5 Las fermentaciones fueron monitoreadas por el pesaje de los tubos individuales y registrando el tiempo y fecha de la medición.

Este conjunto de datos se utilizó después para calcular la pérdida de peso de cada tubo a lo largo del tiempo.

Al final de la fermentación, los tubos se recogieron para el análisis de HPLC de azúcares y productos de fermentación.

10 Los resultados se visualizan en la Fig. 1 a 4. (NE= ninguna enzima) (Alc = proteasa ALC)

Conclusiones:

15 [0112] Se descubrió que la adición de proteasa tiene un impacto positivo significativo en los rendimientos de etanol, producción de glicerol y niveles de glucosa residual.

Los resultados mostraron un rendimiento significativo de etanol más alto; una relación de glicerol/etanol inferior significativa; y concentración de glucosa residual inferior significativa para el tratamiento de proteasa de triturado de maíz post licuado.

20 [0113] Las fermentaciones de SSF usando triturado de maíz post licuado alcanzaron el rendimiento del control de SSF estándar, es decir, sin post licuefacción, en significativamente menos tiempo.

Ejemplo 2

25 Licuefacción simultánea y la degradación de proteína

[0114] Para estudiar el efecto de conducción de licuefacción de almidón y degradación de proteína simultáneas, alfa-amilasa A y proteasa ALC y peptidasa A, respectivamente, se añadieron durante la licuefacción realizada a 67,5 °C y 70 °C, respectivamente.

30 Licuefacción: la harina de maíz se mezcló con agua para obtener una fracción DS de 34,10 % en peso. El pH se ajustó a 5,6 y se tomaron muestras para la determinación DS. 5g de este lodo de maíz fue transferido a tubos de ensayo de 15mL, que fueron licuados usando alfa-amilasa A y proteasa ALC y peptidasa A, respectivamente, durante 1 hora después de que el lodo de maíz alcance la temperatura de licuefacción designada, que fueron 67,5 °C y 70 °C.

35 Fermentación de SSF: glucoamilasa T se añadió a todos los tubos después de la licuefacción.

Las fermentaciones fueron efectuadas como SSF a 32 °C, 70 horas utilizando levadura RED STAR™.

Se añadió levadura en aproximadamente 1×10^7 células/ml.

Todos los tratamientos se realizaron en 8 réplicas y se incluyeron controles de lodo de maíz no licuado en la fermentación.

40 Las fermentaciones fueron monitoreadas por el pesaje de los tubos individuales y registrando el tiempo y fecha de la medición.

Al final de la fermentación, los tubos se probaron para el análisis HPLC de azúcares y productos de fermentación.

Los parámetros primarios evaluados fueron etanol y glicerol.

45

Tabla 1. Vista de los experimentos realizados (DS=sólido seco; EP=proteína enzimática)

Tratamiento	AGU/g DS	NU/g DS	mg EP/g DS	mg EP/g DS
Glucoamilasa T	0,5	50		
Alfa-amilasa A	0,5	50		
Proteasa ALC	0,5	50	0,02	
Peptidasa A	0,5	50		0,02

[0115] Los resultados de la prueba se muestran en las Figuras 5-9.

50

Etanol:

[0116] Las figuras 5 y 6 muestran que la licuefacción simultánea y la degradación de proteína con proteasa ALC y peptidasa A, respectivamente, tenían una pérdida de peso más alta en comparación con la prueba de ciego (no proteasa).

55

[0117] Los rendimientos de etanol se determinaron después de 24, 48 y 70 horas.

Tabla 2. Resultados de etanol HPLC después de 24 y 48 horas de fermentación

Tratamiento	Etanol
-------------	--------

	24 Horas	48 Horas
Control no proteasa- (67,5 °C)	0,142	0,222
Proteasa ALC (67,5 °C)	0,178	0,228
Peptidasa A (67,5 °C)	0,179	0,230
Control no proteasa (70 °C)	0,138	0,217
Proteasa ALC (70 °C)	0,178	0,250
Peptidasa A (70 °C)	0,168	0,243

[0118] Los resultados de HPLC, después 24 y 48 horas, muestran que la licuefacción simultánea y degradación de proteína a 67,5 °C y 70 °C, respectivamente, mejoran el rendimiento de etanol.

- 5 [0119] Los resultados muestran que el rendimiento de etanol aumentado se obtiene después de 70 horas de fermentación cuando se realizan de forma simultánea la licuefacción y degradación de proteína (ver figura 7). (NoP=No proteasa; Pro Alc= proteasa ALC; Pep A= peptidasa A). El rendimiento de etanol después de la licuefacción y degradación de proteína simultáneas fue más alto a 70 °C que a 67,5 °C.

10

Glicerol

[0120] Los resultados muestran que se obtienen niveles de glicerol inferiores después de 70 horas de fermentación cuando se realizan de forma simultánea la licuefacción y degradación de proteína (ver figura 8). (NoP=No proteasa; Pro Alc= proteasa ALC; PEP A= peptidasa A).

15

Glicerol/etanol

[0121] Los resultados muestran que se obtiene una proporción de glicerol/etanol mejorada después de 70 horas de fermentación cuando se realizan de forma simultánea la licuefacción y degradación de proteína (figura 9). (NoP=No proteasa; Pro Alc= proteasa ALC; PEP A= peptidasa A).

20

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir un producto de fermentación de material que contiene almidón, que comprende
 5 (a) licuefacción de dicho material que contiene almidón con una alfa-amilasa;
 (b) tratamiento con una proteasa;
 (c) sacarificación en presencia de una enzima generadora de fuente de carbohidratos; y
 (d) fermentación en presencia de un organismo fermentador, donde los pasos (a) y (b) se realizan
 simultáneamente durante 0,1 a 12 horas antes del paso (c) y paso (d) que se realizan simultáneamente o
 consecutivamente.
- 10 2. Proceso, según la reivindicación 1, que comprende además un paso de;
 (e) destilación para obtener el producto de fermentación.
- 15 3. Proceso, según la reivindicación 1 o 2, donde el producto de fermentación es etanol.
4. Proceso, según la reivindicación 1, donde el paso (a) se realiza utilizando una alfa-amilasa bacteriana o una alfa-
 amilasa fúngica.
- 20 5. Proceso, según la reivindicación 4, donde la alfa-amilasa bacteriana es una alfa-amilasa *Bacillus* preferiblemente
 derivada de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* o una variante de la misma con las mutaciones: R179* y
 G180* o I181*+G182*, especialmente, I181*+G182*+N193F.
- 25 6. Proceso, según la reivindicación 4 o 5, donde la alfa-amilasa bacteriana se usa en una cantidad entre 0,0005-5
 KNU por g de DS, preferiblemente, entre 0,001-1 KNU por g de DS, tal como alrededor de 0,050 KNU por g de DS.
7. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el pH durante la licuefacción es entre
 aproximadamente 4,5 y 7, preferiblemente entre 5 y 6, preferiblemente alrededor de 5,4 o 5,6.
- 30 8. Proceso, según las reivindicaciones 1-7, que comprende además, antes del paso (a), los pasos de:
 i) moler el material que contiene almidón;
 ii) formar un lodo que comprende el material que contiene almidón molido y agua.
- 35 9. Proceso, según la reivindicación 8, donde el lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización
 inicial.
10. Proceso, según la reivindicación 8 o 9, donde el lodo se cuece a chorro de vapor a una temperatura entre 95-140
 °C, preferiblemente 105-125 °C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente,
 alrededor de 5 minutos, antes del paso (a).
- 40 11. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la proteasa es de origen vegetal, bacteriano o
 fúngico.
12. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la proteasa es una endoproteasa y/o exo-
 proteasa, preferiblemente, de origen bacteriano o fúngico.
- 45 13. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde la proteasa es una metaloproteasa.
14. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde la proteasa es una proteasa fúngica derivada de
Aspergillus, preferiblemente, *Aspergillus niger*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus aculeatus*,
 50 *Aspergillus oryzae*; *Mucor*, preferiblemente, *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*; *Rhizomucor*, preferiblemente,
Rhizomucor pusillus o *Rhizomucor miehei*; *Rhizopus*; *Candida*; *Coriolus*; *Endothia*; *Enthomophtra*; *Irpex*; *Penicillium*;
Sclerotium; *Thermoascus*, preferiblemente, *Thermoascus aurantiacus* y *Torulopsis*.
15. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la proteasa es una proteasa bacteriana derivada
 de *Bacillus*, preferiblemente, *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus licheniformis*; *Nocardiosis*, preferiblemente,
 55 *Nocardiosis prasina* o *Nocardiosis dassonavilla*.
16. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde la proteasa es una proteasa de planta derivada
 de cebada.
- 60 17. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la temperatura durante el tratamiento de proteasa
 está en el rango de 25-90 °C, preferiblemente 30-80 °C, tal como 65-75 °C, especialmente, alrededor de 50 ° o 70
 °C.
- 65 18. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el almidón licuado tiene una concentración entre
 20 y 50 % (p/p) sólidos totales (TS), preferiblemente, entre 30-40 % (p/p) TS.

19. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde el tratamiento de proteasa se realiza durante 1 a 10 horas, especialmente, 2 a 8 horas.
- 5 20. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, donde la proteasa está presente a una concentración en el rango de 0,0001 a 1 % en peso de TS, preferiblemente, 0,001 a 0,1 % en peso de TS.
- 10 21. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, donde la sacarificación en el paso (c) se realiza como un paso de pre-sacarificación que dura aproximadamente de 40 a 90 minutos, a temperaturas de aproximadamente 28 a 65 °C, a un pH entre 4 y 6, seguido de sacarificación completa durante la fermentación en una sacarificación y proceso de fermentación (SSF) simultáneos.
- 15 22. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde los pasos de sacarificación y fermentación se realizan como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneos (proceso SSF).
- 20 23. Proceso, según la reivindicación 22, donde SSF se realiza durante entre 20 y 100 horas, preferiblemente, aproximadamente 24 a 72 horas.
- 25 24. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, donde la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, amilasa maltogénica, beta-amilasa o una combinación de las mismas.
- 30 25. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, preferiblemente, presente en una concentración de 0,005-5 AGU/g DS, más preferiblemente, entre 0,01-1 AGU/g DS, tal como especialmente alrededor de 0,1-0,5 AGU/g DS.
26. Proceso, según la reivindicación 25, donde la glucoamilasa se deriva de una cepa del género *Aspergillus*, preferiblemente, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* o *Aspergillus oryzae*, o una cepa de *Talaromyces*, preferiblemente, una cepa de *Talaromyces emersonii* o una cepa de *Athelia*, preferiblemente, *Athelia rolfsii* o una cepa del género *Trametes*, preferiblemente, una cepa de *Trametes cingulata*.
27. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-26, donde el organismo fermentador es levadura, preferiblemente, levadura capaz de fermentar azúcares a etanol, tal como de *Saccharomyces* spp., especialmente, *Saccharomyces cerevisiae*.

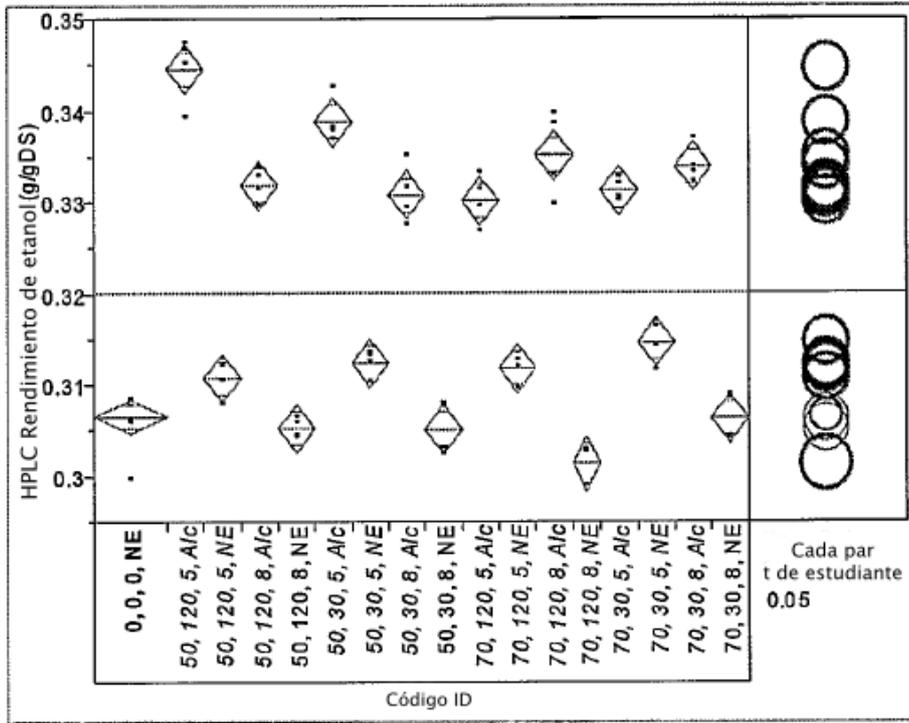


Fig. 1

Tiempo de fermentación para igualar el rendimiento de control @ 65 h
 Predicho por parámetros modelo

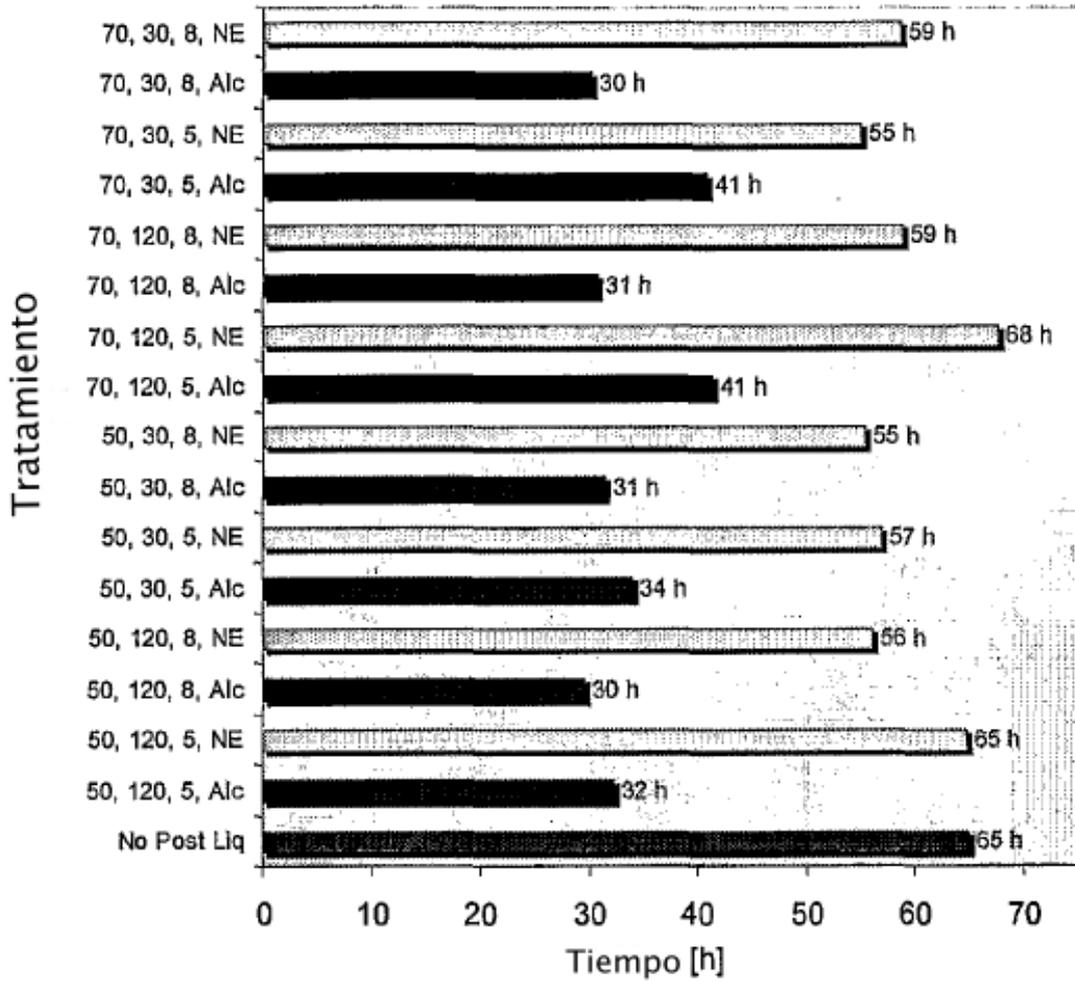


Fig. 2

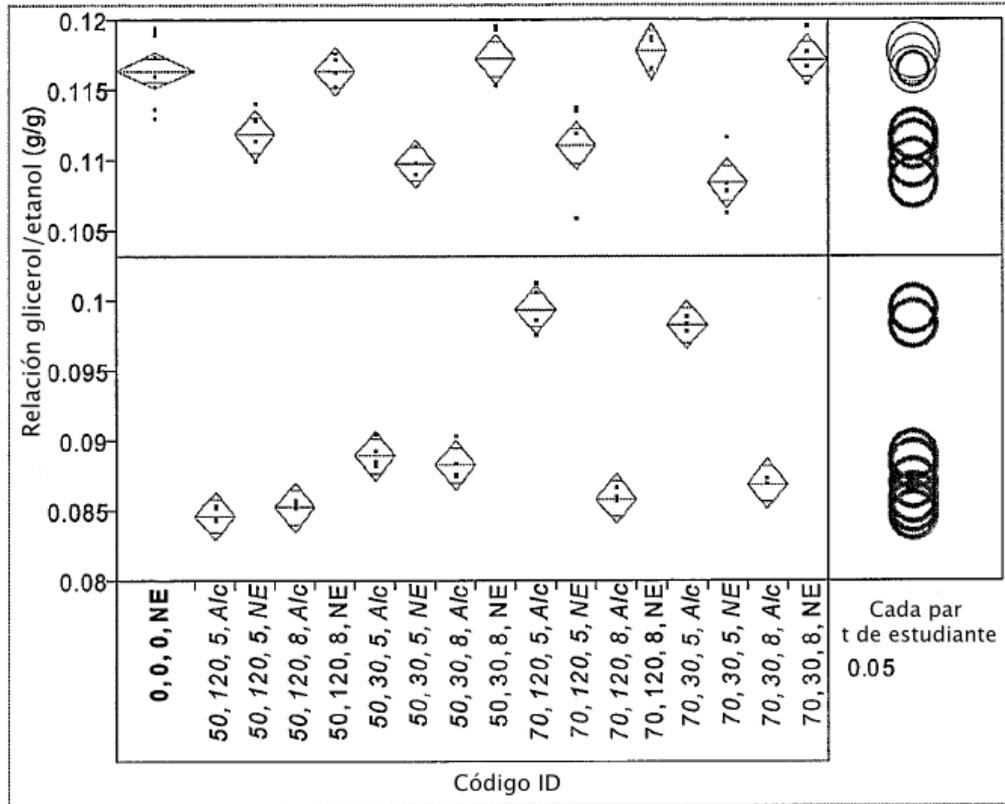


Fig. 3

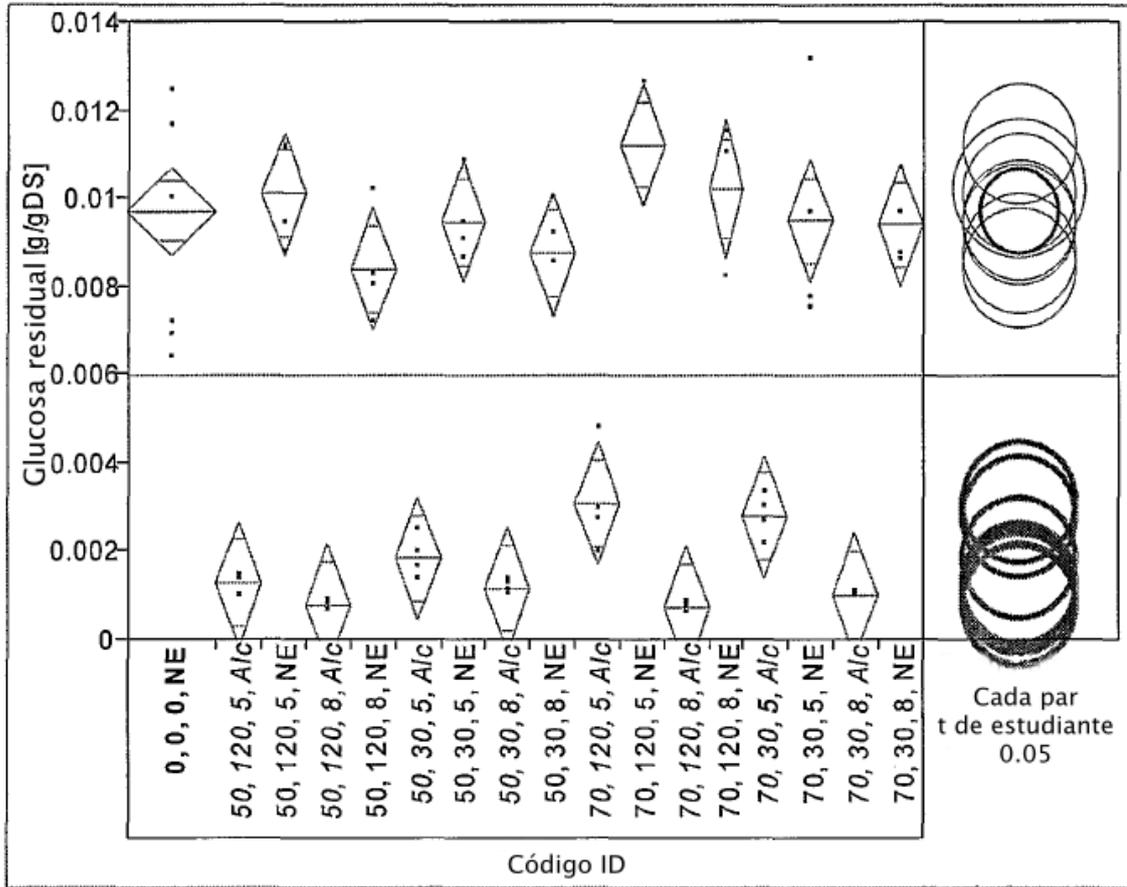


Fig. 4

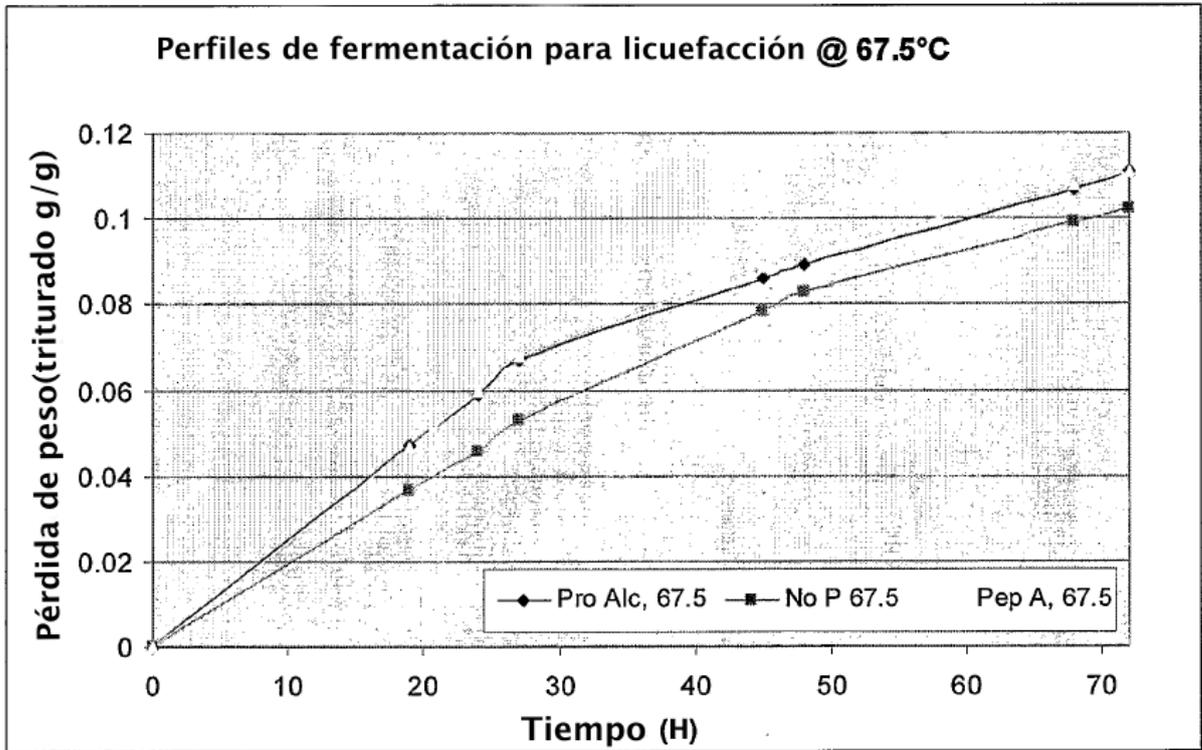


Fig. 5

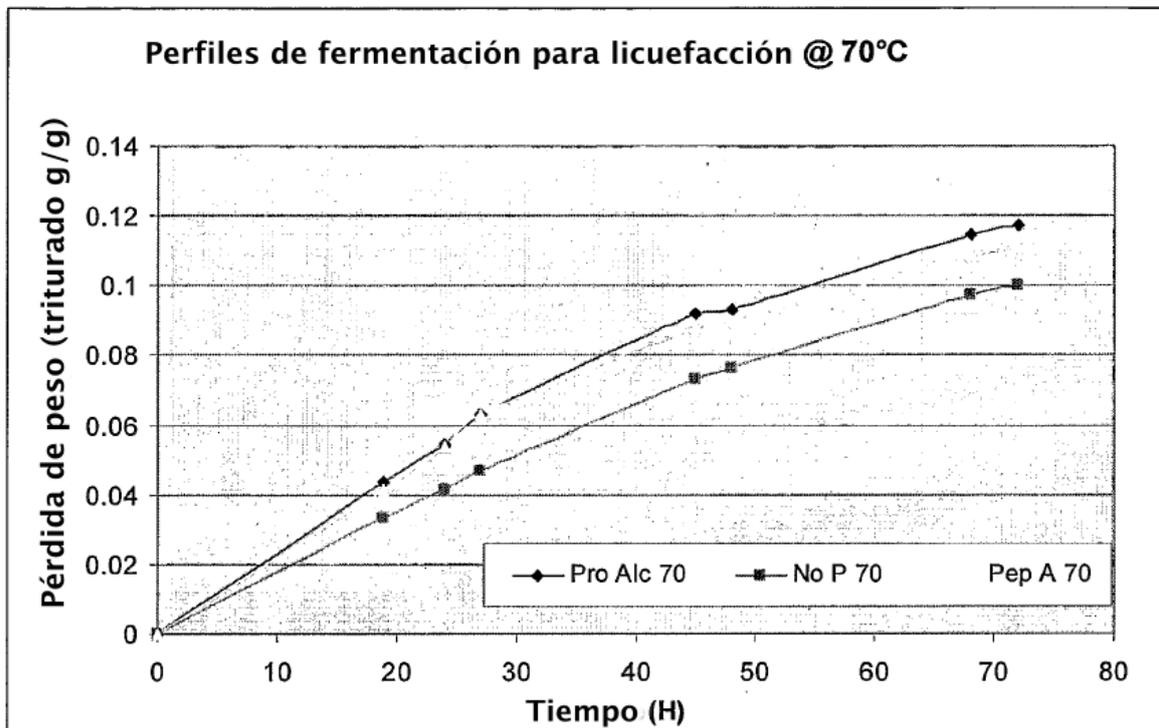


Fig. 6

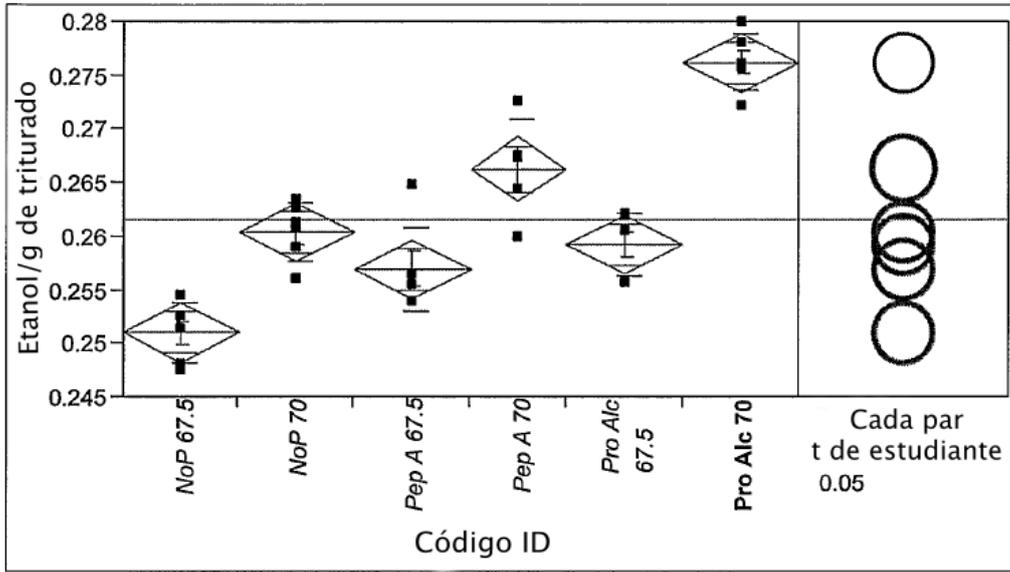


Fig. 7

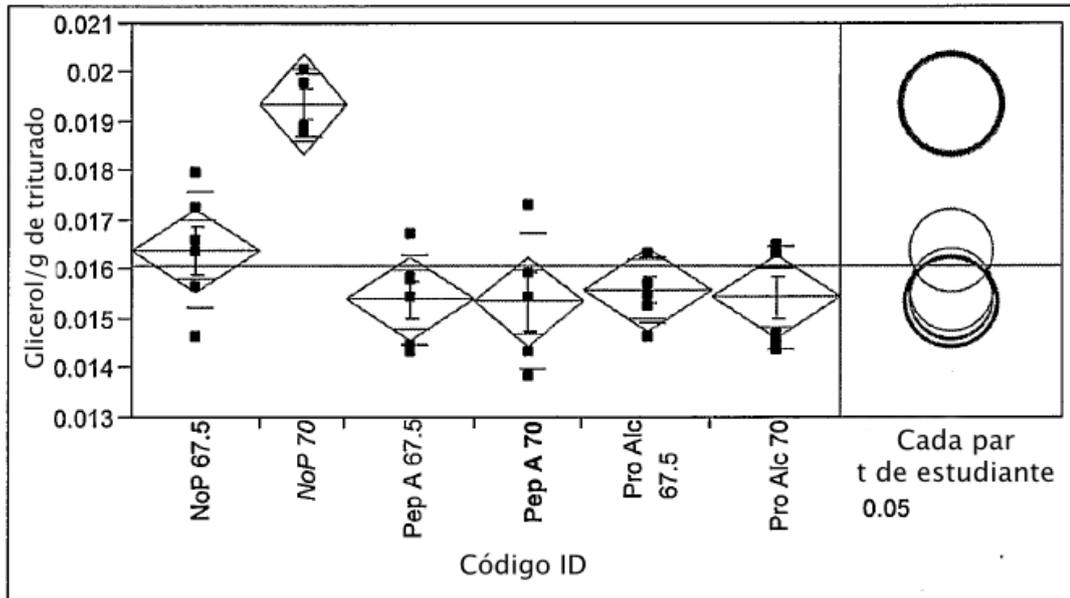


Fig. 8

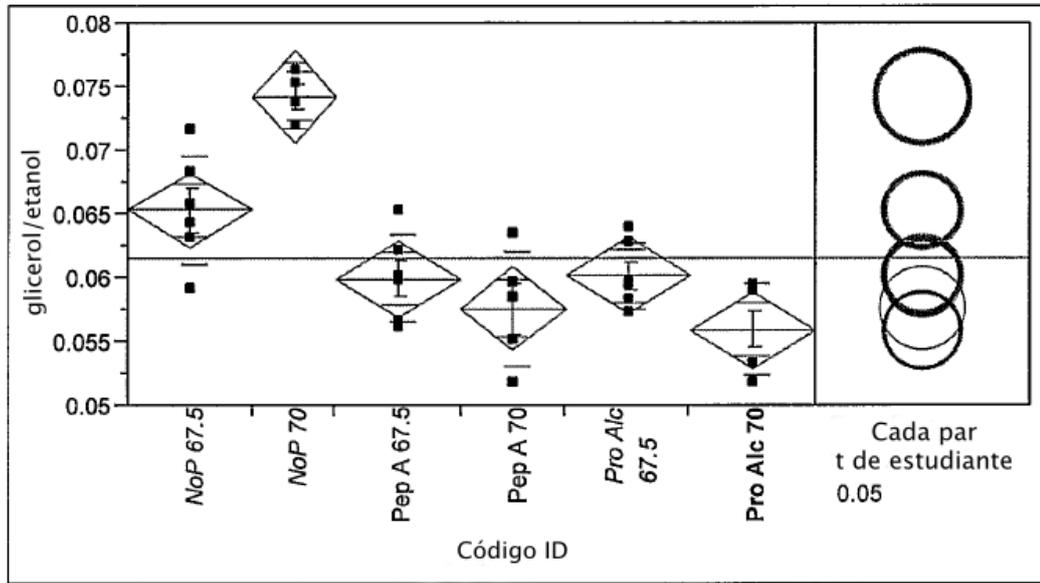


Fig. 9