

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 637 913**

(51) Int. Cl.:
C12P 1/00
(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2004 PCT/US2004/018342**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2005 WO05005646**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2004 E 04776399 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 1654374**

(54) Título: **Procesos de fermentación para la producción de etanol**

(30) Prioridad:

10.06.2003 US 459315

(73) Titular/es:

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

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

17.10.2017

(72) Inventor/es:

GRICHKO, VARVARA

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 637 913 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 fermentación para la producción de etanol

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 [0001] La presente invención se refiere a procesos enzimáticos para producir productos de fermentación, incluyendo procesos para mejorar el rendimiento de la levadura durante los procesos de fermentación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

15 [0003] La US 4,316,956 divulga procesos para producir etanol usando glucoamilasa, alfa-amilasa, agua, almidón granulado y un microorganismo productor de etanol. La vinaza se puede reciclar para la fermentación.

[0004] Es necesario mejorar más los procesos de fermentación y obtener procesos mejorados que incluyan una fase de fermentación.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

20 [0005] La presente invención proporciona procesos para producir etanol, que comprenden

- (a) moler los granos enteros;
- (b) licuar el producto de la fase (a) utilizando una alfa-amilasa;
- (c) sacarificar el material licuado usando una glucoamilasa;
- 25 (d) fermentar el material sacrificado en un medio de fermentación usando una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde el contenido analcohólico constituye de un 30 % m/m a un 70 % m/m de la porción líquida del medio de fermentación antes del inicio de la fermentación y el proceso de fermentación comprende poner en contacto el medio de fermentación con una lipoxygenasa, donde las fases (b); (c) y (d) se realizan como un proceso de licuefacción, sacrificio y fermentación simultáneas a una temperatura de 26 °C a 40 °C. Según la invención, el porcentaje de contenido analcohólico (reciclado), tal y como se definirá más adelante, en el medio de fermentación se puede aumentar significativamente, lo cual implica una menor necesidad de añadir más agua al proceso de fermentación. Además, la utilización más eficaz del material de fermentación reduce el coste del proceso de fermentación, dado que se convierte más materia prima que contiene almidón en etanol, y la nutrición con carbohidratos para el/los organismo(s) de fermentación.

35 [0006] En una forma de realización preferida, la lipoxygenasa se añade directamente al medio de fermentación que comprende contenido analcohólico reciclado. La lipoxygenasa se puede añadir al medio de fermentación antes de añadir la levadura, pero también se puede añadir junto con o después de la adición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se prefiere añadir la lipoxygenasa antes del inicio de la fermentación. Sin embargo, 40 también se encuentra dentro del campo de la invención añadir la lipoxygenasa durante la fermentación, tal como después del inicio de la fermentación. En una forma de realización preferida, el medio de fermentación que comprende una porción de contenido analcohólico se pretrata con una lipoxygenasa.

45 [0007] La lipoxygenasa se puede aplicar en una cantidad eficaz antes y/o durante la fermentación. La lipoxygenasa se puede aplicar en una cantidad eficaz antes de la fermentación, como durante la propagación del/de los microorganismo(s) fermentador(es) o después de la propagación del/de los microorganismo(s) fermentador(es).

50 [0008] Además de una lipoxygenasa, se pueden añadir otras actividades enzimáticas. Tales actividades enzimáticas incluyen actividad de esterasa, preferiblemente actividad de lipasa y/o de cutinasa, actividad de lacasa, actividad de fitasa, actividad de celulasa, actividad de xilanasa, actividad de alfa-amilasa o actividad de glucoamilasa.

[0009] El proceso de fermentación de la invención se usa para producir etanol. La presencia de una lipoxigenasa se puede utilizar para aumentar el rendimiento del etanol. Usando una lipoxigenasa conforme a la invención es posible aumentar el porcentaje de contenido analcohólico (reciclado) en el medio de fermentación. El contenido analcohólico puede constituir de un 30 % m/m a un 70 % m/m de la porción líquida (es decir, contenido analcohólico y partes de agua) del medio de fermentación antes del inicio de la fermentación. En otras palabras,

5 esto significa que, por ejemplo, reciclar un 50 % m/m de contenido analcohólico corresponde a un medio de fermentación (mezcla) que comprende un 36 % m/m de granos (molidos), un 32 % m/m de agua y un 32 % m/m de contenido analcohólico.

10 [0010] El término "contenido analcohólico" se refiere a la porción líquida obtenida del coproducto (es decir, la vinaza entera) que procede de la fase de fermentación - después de dividir (separar) el coproducto de fermentación (es decir, la vinaza entera) en una porción sólida (es decir, los granos húmedos) y una porción líquida de "contenido analcohólico". A veces se hace referencia a la porción de "contenido analcohólico" como "vinaza fina". El contenido analcohólico comprende aproximadamente un 10 % de sólidos y contiene normalmente varios compuestos que son inhibidores del proceso de fermentación y por tanto pueden conllevar 15 un menor rendimiento del etanol. Por lo tanto, en general se evita añadir contenido analcohólico.

[0011] En otra forma de realización de la presente invención, el/los estimulador(es) de crecimiento del/de los microorganismo(s) fermentador(es) se añade(n)/está(n) presente(s) en combinación con la lipoxigenasa y opcionalmente una actividad enzimática adicional descrita en el presente documento, para mejorar más el proceso de fermentación. Los estimuladores preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0012] La presente invención proporciona procesos para producir etanol, que comprenden

- (a) moler los granos enteros;
- (b) licuar el producto de la fase (a) utilizando una alfa-amilasa;
- (c) sacrificar el material licuado usando una glucoamilasa;
- 25 (d) fermentar el material sacrificado en un medio de fermentación usando una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde el contenido analcohólico constituye de un 30 % m/m a un 70 % m/m de la porción líquida del medio de fermentación antes del inicio de la fermentación y el proceso de fermentación comprende poner en contacto el medio de fermentación con una lipoxigenasa, donde las fases (b); (c) y (d) se realizan como un proceso de licuefacción, sacrificio y fermentación simultáneas a una 30 temperatura de 26 °C a 40 °C.

[0013] Tratar el medio de fermentación con una lipoxigenasa antes o durante la fermentación aumenta el rendimiento de la fermentación. Además, el tratamiento del medio de fermentación, que incluye una porción de contenido analcohólico, con una lipoxigenasa, aumenta el rendimiento de la fermentación en comparación con el rendimiento obtenido sin añadir la lipoxigenasa. Añadir una o más actividades enzimáticas adicionales produce más mejoras en el rendimiento de la fermentación.

[0014] Aunque no está limitado a una única teoría en cuanto al funcionamiento, se cree que el uso de una lipoxigenasa en los procesos de fermentación según la presente invención se basa en la liberación aumentada de almidón, debido a la alteración de las membranas de los amiloplastos, desde el material granular. También, la lipoxigenasa promueve la formación de puentes S-S en las proteínas. Se cree que esto aumenta la estabilidad 40 de la mezcla.

[0015] El tratamiento con lipoxigenasa se puede aplicar en cualquier fase del proceso de fermentación. En una forma de realización preferida, la lipoxigenasa se añade, en una cantidad eficaz, durante la fermentación (por ejemplo, entrando en contacto con el medio de fermentación), como al principio del proceso de fermentación. En otra forma de realización preferida, la lipoxigenasa se añade en una cantidad eficaz antes de la fermentación, como durante propagación del/de los organismo(s) fermentador(es) o después de la propagación o durante una fase de sacrificio o pre-sacrificio o licuefacción. El proceso de fermentación de la invención se puede utilizar para producir etanol, por ejemplo, como una parte integral de un proceso de etanol tradicional.

Proceso de fermentación

50 [0016] "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprenda una fase de fermentación. Un proceso de fermentación de la invención incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir etanol.

[0017] En una forma de realización preferida, el proceso de fermentación de la presente invención se usa en combinación con actividades enzimáticas adicionales, tales como esterasa, incluyendo lipasa y/o cutinasa; fitasa; lacasa; celulasa; xilanasa; alfa-amilasa; glucoamilasa; o mezclas derivadas.

Medios de fermentación

- 5 [0018] "Medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al ambiente en el que se lleva a cabo la fermentación y que incluye el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidrato que se metaboliza por el/los microorganismo(s) fermentador(es). Los medios de fermentación, incluidos el sustrato de fermentación y otras materias primas usadas en el proceso de fermentación de la invención, pueden referirse al medio antes de que se añada(n) el/los microorganismo(s) fermentador(es) al igual que los medios que comprenden el/los microorganismo(s) fermentador(es), como los medios usados en un proceso de licuefacción, fermentación, sacarificación simultáneas (LSF).

Organismo fermentador

- 15 [0019] "Microorganismo fermentador" se refiere a cualquier microorganismo adecuado para un proceso de fermentación deseado. El microorganismo fermentador según la invención es levadura *Saccharomyces cerevisiae* que es capaz de fermentar, es decir, convertir, azúcares, como glucosa y/o maltosa, directa o indirectamente en etanol. Algunas levaduras disponibles comercialmente son, por ejemplo, Red Star®/Lesaffre Ethanol Red (disponible en Red Star/Lesaffre, EE. UU), SUPERSTART (disponible en Alltech), GERT STRAND (disponible en GERT STRAND AB, Suecia) y FERMIOL (disponible en DSM Specialties).

Sustrato de fermentación

- 20 [0020] El sustrato usado en los procesos de la presente invención es granos enteros.

Lipoxigenasa

[0021] Una lipoxigenasa (LOX) se clasifica como EC 1,13,11,12 y es una enzima que cataliza la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente cis,cis-1,4-dienos, por ejemplo, ácido linoleico y produce un hidroperóxido. Pero también se pueden oxidar otros sustratos, por ejemplo, ácidos grasos monoinsaturados.

- 25 [0022] Las lipoxigenasas microbianas se pueden derivar de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pyricularia oryzae*, y cepas de *Geotrichum*. La preparación de una lipoxigenasa derivada de *Gaeumannomyces graminis* se describe en los ejemplos 3-4 de WO 02/20730. La expresión en el *Aspergillus oryzae* de una lipoxigenasa derivada de *Magnaporthe salvinii* se describe en el ejemplo 2 de WO 02/086114, y esta enzima se puede purificar utilizando métodos estándar, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 4 de WO 02/20730.

[0023] La lipoxigenasa (LOX) también puede ser extraída de semillas de plantas, tales como la soja, los guisantes, los garbanzos, y las alubias. Alternativamente, la lipoxigenasa se puede obtener de células mamíferas, por ejemplo, reticulocitos de conejo.

- 35 [0024] La actividad de lipoxigenasa se puede determinar tal y como se describe en la sección "Materiales y métodos" más adelante.

[0025] Un ejemplo de una cantidad eficaz de lipoxigenasa (LOX) es de 0,001 a 400 U/g de DS (sólidos secos). Preferiblemente, la lipoxigenasa se usa en una cantidad de 0,01 a 100 U/g de DS, más preferiblemente de 0,05 a 50 U/g de DS, e incluso más preferiblemente de 0,1 a 20 U/g de DS. Otra optimización de la cantidad de lipoxigenasa puede obtenerse en lo sucesivo utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

40 **Enzimas adicionales**

[0026] En una forma de realización preferida de la invención, una o más actividades enzimáticas adicionales se pueden utilizar en combinación con el tratamiento de lipoxigenasa de la presente invención (antes, durante o después). Las enzimas adicionales preferidas son esterasas, tales como lipasas y/o cutinasas, fitasa, lacasa, proteasas, celulosas, xilanosas, amilasas, tales como alfa-amilasas, alfa-amilasas maltogénicas, beta-amilasas,

- 45 o glucoamilasas, o mezclas derivadas.

[0027] En otra forma de realización preferida de la presente invención, los estimuladores de crecimiento del microorganismo fermentador se añaden en combinación con las actividades enzimáticas descritas en el presente documento, para mejorar más el proceso de fermentación. Los estimuladores de crecimiento preferidos incluyen vitaminas y minerales.

5 Esterasas

[0028] En una forma de realización preferida de la invención, la lipoxygenasa se aplica en una cantidad eficaz antes o durante la fermentación en combinaciones con una cantidad eficaz de esterasa. Las enzimas se pueden añadir antes o durante la fermentación, incluyendo durante o después de la propagación de los microorganismos fermentadores. Las enzimas también se pueden usar para pretratar el medio de fermentación (por ejemplo, añadiendo o no contenido analcohólico).

[0029] Como se utiliza en el presente documento, una "esterasa" también referida como hidrolasas de éster carboxílico, se refiere a enzimas que actúan en enlaces estéricos, e incluye enzimas clasificadas en EC 3.1.1 Hidrolasas del éster carboxílico según Enzyme Nomenclature (Nomenclatura Enzimática) (disponible en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme> or from Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego,

15 California, with Supplement 1 (1993), Supplement 2 (1994), Supplement 3 (1995), Supplement 4 (1997) and Supplement 5, in Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6, and Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente). Ejemplos no limitativos de esterasas incluyen arilesterasa, triacilglicerol lipasa, acetilesterasa, acetylcolinesterasa,

20 colinesterasa, tropinesterasa, pectinesterasa, esterol esterasa, clorofilasa, L-arabinonolactonasa, gluconolactonasa, uronolactonasa, tanasa, retinil-palmitato esterasa, hidroxibutirato-dímero hidrolasa, acilglicerol lipasa, 3-oxoadipato enol-lactonasa, 1,4-lactonasa, galactolipasa, 4-piridoxolactonasa, acilcarnitina hidrolasa, aminoacil-ARNt hidrolasa, D-arabinonolactonasa, 6-fosfogluconolactonasa, fosfolipasa A1, 6-acetilglucosa deacetilasa, lipoproteína lipasa, dihidrocouumaria lipasa, limonin-D-anillo-lactonasa, esteroide lactonasa,

25 triacetato lactonasa, actinomicina lactonasa, orsellinato-depsida hidrolasa, cefalosporina C deacetilasa, clorogenato hidrolasa, alfa-aminoácido esterasa, 4-metiloxalacetato esterasa, carboximetilenebutenolidasa, deoxilimonato A-anillo-lactonasa, 2-acetyl-1-alquilglicerofosfocolina esterasa, fusarinina C ornitinesterasa, sinapina esterasa, hidrolasa de éster ceroso, forbol-diéster hidrolasa, fosfatidilinositol deacilasa, sialato O-acetilesterasa, acetoxibutinilbitofeno deacetilasa, acetilsalicilato deacetilasa, metilumbeliferil-acetato deacetilasa, 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa, n-acetilgalactosaminoglicano deacetilasa, esterasa de hormona juvenil,

30 bis(2-ethylhexilo)ftalato esterasa, proteína-glutamato metilesterasa, 11-cis-retinil-palmitato hidrolasa, Todo-trans-retinol-palmitato hidrolasa, L-rhamnono-1,4-lactonasa, 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitofeno deacetilasa, acil graso-etyl-ester sintasa, xilono-1,4-lactonasa, n-acetilglucosaminilfosfatidilinositol deacetilasa, bencilesterasa cetraxato, Acetilalquilglicerol acetilhidrolasa, y acetilxilam esterasa.

35 [0030] Las esterasas preferidas según la presente invención son enzimas lipolíticas, tales como lipasas (clasificadas en EC 3.1.1.3, EC 3.1.1.23 y/o EC 3.1.1.26) y fosfolipasas (clasificadas en EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32, incluidas lisofosfolipasas clasificadas en EC 3.1.1.5). Otras esterasas preferidas son cutinasas (clasificadas en EC 3.1.1.74).

40 [0031] Cuando se usa en combinación con procesos o tratamientos que emplean otras enzimas, además de la lipoxygenasa, como fitasa, lacasa, amilasa y glucoamilasa que se usan en, por ejemplo, procesos de licuefacción y/o sacarificación, se prefiere una composición de esterasa que no inhiba estas otras enzimas. Por ejemplo, se prefieren esterasas que no contienen o contienen solo cantidades menores de los compuestos fijadores de calcio. De forma similar, se prefieren esterasas que no inhiben el proceso de fermentación. Por ejemplo, se prefieren esterasas que no contienen o que contienen solo cantidades menores de glicerol.

45 [0032] La esterasa se puede añadir en una cantidad eficaz para obtener el beneficio deseado para mejorar el rendimiento del/de los microorganismo(s) fermentador(es), por ejemplo, para cambiar la composición/concentración lípidica en el interior y/o en el exterior del/de los microorganismo(s) fermentador(es) o en la membrana celular del/de los microorganismo(s) fermentador(es), para implicar una mejora en el movimiento de solutos hacia dentro y/o fuera del/de los microorganismo(s) fermentador(es) durante la fermentación y/o a proporcionar fuentes de energía más metabolizables (como, por ejemplo, mediante la conversión de componentes, como aceite del sustrato de maíz, en componentes útiles para el/los microorganismo(s) fermentador(es), por ejemplo, ácidos grasos insaturados y glicerol), para aumentar el rendimiento del etanol. Ejemplos de cantidades eficaces de esterasa son 0,01 a 400 UL/g de DS (sólidos secos). Preferiblemente, la esterasa se usa en una cantidad de 0,1 a 100 UL/g de DS, más preferiblemente de 0,5 a 50 UL/g de DS, e incluso más preferiblemente de 1 a 20 UL/g de DS. Otra optimización de la cantidad de esterasa puede obtenerse en lo sucesivo utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

- [0033] En una forma de realización preferida, la esterasa es una enzima lipolítica, más preferiblemente, una lipasa. Como se utiliza en el presente documento, una "enzima lipolítica" se refiere a lipasas y fosfolipasas (incluyendo lisofosfolipasas). La enzima lipolítica es preferiblemente de origen microbiano, en particular de origen bacteriano, fúngico o de levadura. La enzima lipolítica usada puede derivar de cualquier fuente, incluyendo, por ejemplo, una cepa de *Absidia*, en particular *Absidia blakesleena* y *Absidia corimbifera*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aeromonas*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassicola*, una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aureobasidium*, en particular *Aureobasidium pullulans*, una cepa de *Bacillus*, en particular *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus subtilis*, una cepa de *Beauveria*, una cepa de *Brochothrix*, en particular *Brochothrix thermosohata*, una cepa de *Candida*, en particular *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*) *Candida paralipolytica*, y *Candida antarctica*, una cepa de *Chromobacter*, en particular *Chromobacter viscosum*, una cepa de *Coprinus*, en particular *Coprinus cinerius*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, y *Fusarium roseum culmorum*, una cepa de *Geotrichum*, en particular *Geotrichum penicillatum*, una cepa de *Hansenula*, en particular *Hansenula anomala*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola brevispora*, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, y *Humicola insolens*, una cepa de *Hypozyma*, una cepa de *Lactobacillus*, en particular *Lactobacillus curvatus*, una cepa de *Metarhizium*, una cepa de *Mucor*, una cepa de *Paecilomyces*, una cepa de *Penicillium*, en particular *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum* y *Penicillium expansum*, una cepa de *Pseudomonas* en particular *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia* (syn. *Burkholderia cepacia*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas mephitica lipolytica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas plantari*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas wisconsinensis*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Rhizomucor*, en particular *Rhizomucor miehei*, una cepa de *Rhizopus*, en particular, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus microsporus* y *Rhizopus nodosus*, una cepa de *Rhodosporidium*, en particular *Rhodosporidium toruloides*, una cepa de *Rhodotorula*, en particular *Rhodotorula glutinis*, una cepa de *Sporobolomyces*, en particular *Sporobolomyces shibatanus*, una cepa de *Thermomyces*, en particular *Thermomyces lanuginosus* (anteriormente *Humicola lanuginosa*), una cepa de *Thiarsporella*, en particular *Thiarsporella phaseolina*, una cepa de *Trichoderma*, en particular *Trichoderma harzianum*, y *Trichoderma reesei*, y/o una cepa de *Verticillium*.
- [0034] En una forma de realización preferida, la enzima lipolítica es derivada de una cepa de *Aspergillus*, una cepa de *Achromobacter*, una cepa de *Bacillus*, una cepa de *Candida*, una cepa de *Chromobacter*, una cepa de *Fusarium*, una cepa de *Humicola*, una cepa de *Hypozyma*, una cepa de *Pseudomonas*, una cepa de *Rhizomucor*, una cepa de *Rhizopus*, o una cepa de *Thermomyces*.
- [0035] En formas de realización más preferidas, la enzima lipolítica es una lipasa. Las lipasas se pueden aplicar aquí por su capacidad para modificar la estructura y composición de aceites triglicéridos y grasas en los medios de fermentación (incluida la levadura de fermentación), por ejemplo, resultantes de un sustrato de maíz. Las lipasas catalizan diferentes tipos de conversiones de triglicéridos, tales como hidrólisis, esterificación y transesterificación. Las lipasas adecuadas incluyen, lipasas ácidas neutras y básicas, como son bien conocidas en la técnica, aunque las lipasas ácidas (tales como, por ejemplo, la lipasa G AMANO 50, disponible en Amano) parecen ser más eficaces en concentraciones inferiores de lipasa en comparación con lipasas neutras o básicas. Las lipasas preferidas para usar en la presente invención fueron la lipasa de *Candida antarctica* y la lipasa de *Candida cylindracea*. Las lipasas más preferidas son lipasas purificadas como la lipasa de *Candida antártica* (lipasa A), la lipasa de *Candida antártica* (lipasa B), la lipasa de *Candida cylindracea* y la lipasa de *Penicillium camembertii*.
- [0036] La lipasa es la descrita en EP 258,068-A o puede ser una variante de lipasa como una variante descrita en WO 00/60063 o WO 00/32758. Lipasas comerciales preferidas incluyen LECITASE™, LIPOLASE™ y LIPEX™ (disponibles en Novozymes A/S, Dinamarca) y G AMANO 50 (disponible en Amano).
- [0037] Las lipasas se añaden preferiblemente en cantidades de aproximadamente 1 a 400 UL/g de DS, preferiblemente de 1 a 10 UL/g de DS, y más preferiblemente de 1 a 5 UL/g de DS.
- [0038] En otra forma de realización preferida de la presente invención, al menos una esterasa es una cutinasa. Las cutininas son enzimas que son capaces de degradar cutina. La cutinasa puede ser derivada de cualquier fuente. En una forma de realización preferida, la cutinasa es derivada de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassicola*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambicum*, una cepa de *Helminthosporum*, en particular *Helminthosporum sativum*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola insolens*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina*, o *Pseudomonas putida*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Streptomyces*, en particular *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular *Ulocladium consortiale*. En una forma de realización más preferida la cutinasa es derivada de una cepa de *Humicola insolens*, en particular la cepa

5 *Humicola insolens* DSM 1800. La cutinasa de *Humicola insolens* se describe en WO 96/13580. La cutinasa puede ser una variante, como una de las variantes descritas en WO 00/34450 y WO 01/92502. Las variantes de cutinasa preferidas incluyen variantes enumeradas en el ejemplo 2 de WO 01/92502. Una cantidad eficaz de cutinasa se encuentra entre 0,01 y 400 UL/g de DS, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y 100 UL/g de DS, más preferiblemente, entre 1 y 50 UL/g de DS. Otra optimización de la cantidad de cutinasa puede obtenerse en lo sucesivo utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

10 [0039] En otra forma de realización preferida, al menos una esterasa es una fosfolipasa. Como se utiliza en el presente documento, el término fosfolipasa es una enzima que tiene actividad hacia fosfolípidos. Los fosfolípidos, tales como la lecitina o la fosfatidilcolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en posición externa (sn-1) y media (sn-2) y esterificado con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, a su vez, se puede esterificar a un aminoalcohol. Las fosfolipasas son enzimas que participan en la hidrólisis de fosfolípidos. Se pueden distinguir diferentes tipos de actividad de fosfolipasa, incluidas las fosfolipasas A₁ y A₂ que hidrolizan un grupo acilo graso (en la posición sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípido; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que puede hidrolizar el grupo acilo graso restante en el lisofosfolípido. La fosfolipasa C y la fosfolipasa D (fosfodiesteras) liberan diacil glicerol o ácido fosfatídico respectivamente.

20 [0040] El término fosfolipasa incluye enzimas con actividad de fosfolipasa, por ejemplo, fosfolipasa A (A₁ o A₂), actividad de fosfolipasa B, actividad de fosfolipasa C o actividad de fosfolipasa D. El término "fosfolipasa A" usado en el presente documento en relación con una enzima de la invención se hace referencia a una enzima con fosfolipasa A₁ y/o actividad de fosfolipasa A₂. La actividad de fosfolipasa puede ser proporcionada por enzimas con otras actividades también, como, por ejemplo, una lipasa con actividad de fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa puede ser procedente, por ejemplo, de una lipasa con actividad de fosfolipasa secundaria. En otras formas de realización de la invención, la actividad enzimática de fosfolipasa es proporcionada por una enzima con principalmente solo actividad de fosfolipasa y donde la actividad enzimática de fosfolipasa no es una actividad secundaria.

25 [0041] La fosfolipasa puede ser de cualquier origen, por ejemplo, de origen animal (como, por ejemplo, mamífero), por ejemplo, del páncreas (por ejemplo, páncreas bovino o porcino), o veneno de serpiente o veneno de abeja. Alternativamente, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo de hongos filamentosos, levadura o bacterias, como el género o especie *Aspergillus*, por ejemplo, *A. niger*, *Dictyostelium*, por ejemplo *D. discoideum*; *Mucor*, por ejemplo *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, por ejemplo *N. crassa*; *Rhizomucor*, por ejemplo, *R. pusillus*; *Rhizopus*, por ejemplo *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*, *Sclerotinia*, por ejemplo, *S. libertiana*; *Trichophyton*, por ejemplo *T. rubrum*; *Whetzelinia*, por ejemplo *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, por ejemplo, *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, por ejemplo, *C. freundii*; *Enterobacter*, por ejemplo, *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, por ejemplo, *E. herbicola*; *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella*, por ejemplo, *K. pneumoniae*; *Proteus*, por ejemplo, *P. vulgaris*; *Providencia*, por ejemplo *P. stuartii*; *Salmonella*, por ejemplo *S. typhimurium*; *Serratia*, por ejemplo, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, por ejemplo, *S. flexneri*; *Streptomyces*, por ejemplo, *S. violeceoruber*, *Yersinia*, por ejemplo, *Y. enterocolitica*. Así, la fosfolipasa puede ser fúngica, por ejemplo, de la clase Pyrenomycetes, como el género *Fusarium*, como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o una cepa de *F. oxysporum*. La fosfolipasa también puede ser procedente de una cepa de hongo filamentoso dentro del género *Aspergillus*, como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. Algunas fosfolipasas comerciales preferidas son LECITASE™ y LECITASE™ ULTRA (disponibles en Novozymes A/S, Dinamarca).

45 [0042] Una cantidad eficaz de fosfolipasa se encuentra entre 0,01 y 400 UL/g de DS, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 a 100 UL/g de DS, más preferiblemente, entre 1 a 50 UL/g de DS. Otra optimización de la cantidad de fosfolipasa se puede obtener en lo sucesivo utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

Fitasa

50 [0043] En una forma de realización preferida, la lipoxygenasa se usa en combinación con una cantidad eficaz de fitasa. Conforme a esta forma de realización, una fitasa se puede utilizar para promover la liberación de fosfato inorgánico de ácido fítico (mioinositol hexakisfósfato) o de cualquier sal derivada (fitatos) presente en el medio.

[0044] Las fitasas se pueden clasificar según su especificidad en la etapa de hidrólisis inicial, es decir, según qué grupo organofósforo se hidroliza primero. La fitasa que se debe usar puede tener cualquier especificidad, por ejemplo, una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), una 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 5-fitasa (sin número E.C.).

55 [0045] La fitasa se puede añadir durante la fermentación o antes de la fermentación, por ejemplo, durante la propagación o en una fase previa a la fermentación, por ejemplo, una fase de licuefacción y/o de sacarificación.

Las fitasas se pueden añadir, por ejemplo, para mejorar la biodisponibilidad de minerales esenciales a la levadura, como se describe en WO 01/62947. La fitasa también se puede usar para pretratar el medio de fermentación (por ejemplo, con o sin contenido analcohólico).

5 [0046] La fitasa puede ser procedente de plantas o microorganismos, tales como bacterias u hongos, por ejemplo, levadura u hongos filamentosos. La fitasa vegetal puede ser de salvado de trigo, maíz, soja o polen de lirio. Se describen fitasas vegetales adecuadas en Thomlinson et al, Biochemistry, 1 (1962), 166-171; Barrientos et al, Plant. Physiol., 106 (1994), 1489-1495; WO 98/05785; WO 98/20139.

10 [0047] Una fitasa bacteriana puede ser de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Escherichia*, preferiblemente de las especies *B. subtilis* o *E. coli*. Se describen fitasas bacterianas adecuadas en Paver y Jagannathan, 1982, Journal of Bacteriology 151:1102-1108; Cosgrove, 1970, Australian Journal of Biological Sciences 23:1207-1220; Greiner et al, Arch. Biochem. Biophys., 303, 107-113, 1993; WO 98/06856; WO 97/33976; WO 97/48812.

15 [0048] Una fitasa de levadura o mioinositol monofosfatasa puede ser procedente del género *Saccharomyces* o *Schwanniomyces*, preferiblemente de las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Schwanniomyces occidentalis*. Se describen fitasas de levadura adecuadas en Nayini et al, 1984, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17:24-26; Wodzinski et al, Adv. Appl. Microbiol., 42,263-303; AU-A-24840/95;

20 [0049] Las fitasas de hongos filamentosos pueden proceder del filo fúngico de *Ascomycota* (ascomicetos) o el filo *Basidiomycota*, por ejemplo, el género *Aspergillus*, *Thermomyces* (también llamado *Humicola*), *Myceliophthora*, *Manascus*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Agrocybe*, *Paxillus*, o *Trametes*, preferiblemente las especies *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *T. lanuginosus* (conocida también como *H. hanuginosa*), *Myceliophthora thermophila*, *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Manascus anka*, *Paxillus involutus*, o *Trametes pubescens*. Se describen fitasas fúngicas adecuadas en Yamada et al., 1986, Agric. Biol. Chem. 322:1275-1282; Piddington et al., 1993, Gene 133:55-62; EP 684,313; EP 0 420 358; EP 0 684 313; WO 98/28408; WO 98/28409; JP 7-67635; WO 98/44125; WO 97/38096; WO 98/13480.

25 [0050] Se pueden obtener fitasas modificadas o variantes de fitasa mediante métodos conocidos en la técnica, en particular mediante los métodos descritos en EP 897,010; EP 897,985; WO 99/49022; WO 99/48330.

[0051] Algunas fitasas disponibles comercialmente son BIO-FEED PHYTASE™, PHYTASE NOVO™ CT o L (Novozymes A/S, Dinamarca), o NATUPHOS™ NG 5000 (DSM).

30 [0052] La fitasa puede añadirse preferiblemente en el rango 5.000-250.000 FTU/g de DS, preferiblemente 10.000-100.000 FTU/g de DS. Una dosificación adecuada preferida de la fitasa se encuentra en el rango de 0,005-25 FTU/g de DS, más preferiblemente 0,01-10 FTU/g, como 0,1-1 FTU/g de DS. Aquí, la actividad de fitasa es determinada usando unidades FTU, siendo un FTU la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por min. bajo las siguientes condiciones: pH 5,5; temperatura 37 °C; sustrato: fitato de sodio ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$) a una concentración de 0,0050 mol/l.

35 Proteasas

[0053] En otra forma de realización preferida, el tratamiento de lipoxigenasa se usa en combinación con al menos una proteasa. La proteasa puede ser utilizada, por ejemplo, para digerir proteína para producir amino nitrógeno libre (FAN). Tales aminoácidos libres funcionan como nutrientes para la levadura, y aumentan así el crecimiento de la levadura y, consecuentemente, la producción de etanol.

40 [0054] El microorganismo fermentador que se usa en un proceso de fermentación se puede producir mediante la propagación del microorganismo fermentador en presencia de al menos una proteasa. Aunque no está limitado a una única teoría en cuanto al funcionamiento, se cree que la propagación del microorganismo fermentador con una cantidad eficaz de al menos una proteasa reduce el tiempo de retraso del microorganismo fermentador cuando el microorganismo fermentador se usa posteriormente en un proceso de fermentación en comparación con un microorganismo fermentador que se propagó bajo las mismas condiciones sin añadir la proteasa. Se cree que la acción de la proteasa en el proceso de propagación conlleva de manera directa o indirecta la supresión o expresión de genes que son perjudiciales o beneficiosos, respectivamente, para el microorganismo fermentador durante la fermentación, y por tanto disminuye el tiempo de retraso y da como resultado un ciclo de fermentación más rápido.

50 [0055] Las proteasas se conocen bien en la técnica y se refieren a enzimas que catalizan la división de enlaces péptídicos. Algunas proteasas adecuadas son proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son

proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de un pH 7. Algunas proteasas fúngicas ácidas adecuadas son proteasas fúngicas procedentes de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Ipex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Se contemplan especialmente las proteasas procedentes 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*; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

5 [0056] Algunas proteasas bacterianas, que no son proteasas ácidas, son los productos disponibles comercialmente ALCALASE™ y NEUTRASE™ (disponibles en Novozymes A/S). Otras proteasas son GC106 de Genencor Int, Inc., EE. UU y NOVOZYME™ 50006 de Novozymes A/S, Dinamarca.

10 [0057] Preferiblemente, la proteasa es una proteasa de ácido aspártico, como se describe en, por ejemplo, Handbook of Proteolytic Enzymes, Editado por A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Capítulo 270). Algunos ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico son, por ejemplo, aquellos descritos en R.M. Berka et al. Gene, 96,313 (1990); (R.M. Berka et al. Gene, 125,195-198 (1993)); y Gomi et al. Biosci. Biotech. Biochem. 57,1095-1100 (1993).

Lacasa

15 [0058] En otra forma de realización preferida, el tratamiento de lipoxygenasa se usa en combinación con lacasa. La lacasa se aplica en una cantidad eficaz durante la fermentación y/o la lacasa se aplica en una cantidad eficaz antes o durante la fermentación, como durante la propagación de los microorganismos fermentadores. Aunque no se limita a una única teoría en cuanto al funcionamiento, se cree que el uso de al menos una lacasa en el proceso de fermentación promueve la oxidación de inhibidores y la disminución de oxígeno, para promover la creación de un ambiente anaeróbico más adecuado para el microorganismo fermentador.

20 [0059] En el contexto de esta invención, las lacasas y las enzimas relacionadas con la lacasa comprenden cualquier enzima lacasa comprendida por la clasificación enzimática (EC 1.10.3.2), cualquier enzima catecol oxidasa comprendida por la clasificación enzimática (EC 1.10.3.1), cualquier enzima bilirrubina oxidasa comprendida por la clasificación enzimática (EC 1.3.3.5) o cualquier enzima monofenol-monoxigenasa comprendida por la clasificación enzimática (EC 1.14.18.1).

25 [0060] Las enzimas anteriormente mencionadas pueden proceder de plantas, bacterias u hongos (incluyendo hongos filamentosos y levaduras) y algunos ejemplos adecuados son una lacasa procedente de una cepa de *Aspergillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinereus*, *C. comatus*, *C. friesii*, y *C. plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana*, *Panaeolus*, por ejemplo *P. papilionaceus*, *Myceliocephthora*, por ejemplo, *M. thermophila*, *Scytalidium*, por ejemplo, *S. thermophilum*, *Polyporus*, por ejemplo, *P. pinsitus*, *Pycnoporus*, por ejemplo, *P. cinnabarinus*, *Phlebia*, por ejemplo, *P. radita* (WO 92/01046), o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (JP 2-238885).

30 [0061] Se prefiere una lacasa procedente de *Coprinus*, *Myceliocephthora*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Scytalidium* o *Rhizoctonia*, en particular una lacasa procedente de *Coprinus cinereus*, *Myceliocephthora thermophila*, *Polyporus pinsitus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Scytalidium thermophilum* o *Rhizoctonia solani*.

Amilasa

35 [0062] En otra forma de realización preferida, el tratamiento de lipoxygenasa se usa en combinación con una amilasa. Se prefieren las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

40 [0063] Más preferiblemente, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa *Bacillus*, como una procedente de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* y *B. subtilis*. Otras alfa-amilasas son alfa-amilasas procedentes de una cepa de *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas ellas descritas en detalle en WO 95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), pp. 25-31. Otras variantes de alfa-amilasa e híbridos se describen en WO 96/23874, WO 97/41213, y WO 99/19467. Otra alfa-amilasa es una alfa-amilasa procedente de una cepa de *Aspergillus*, como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae* y de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida. En una forma de realización más preferida, la alfa-amilasa ácida es una alfa-amilasa fúngica ácida o una alfa-amilasa bacteriana ácida. Más preferiblemente, la

alfa-amilasa ácida es una alfa-amilasa fúngica ácida procedente del género *Aspergillus*. Una amilasa fúngica de ácido disponible comercialmente es SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0064] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida. El término "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que, añadida en una cantidad eficaz, tiene actividad en un rango de pH de 3,0 a 7,0, preferiblemente de 3,5 a 6,0, o más preferiblemente de 4,0-5,0.

[0065] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl. En la presente descripción, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" hace referencia a una alfa-amilasa que muestra una alta homología, es decir, más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o incluso 90 % de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No. 10 en WO96/23874. Cuando se usa como una enzima generadora de maltosa, las alfa-amilasas fúngicas se pueden añadir en una cantidad de 0,001-1,0 AFAU/g de DS, preferiblemente de 0,002-0,5 AFAU/g de DS, preferiblemente 0,02-0,1 AFAU/g de DS.

[0066] Preferiblemente la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, preferiblemente del género *Aspergillus*, preferiblemente de las especies *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa fúngica ácida es de *A. niger* publicada como "AMYA ASPNG" en la base de datos Swissprot/TeEMBL bajo el nº de registro primario P56271. También se contempla una variante de dicha amilasa fúngica ácida con al menos 70 % de homología (identidad), como con al menos 80 % de homología o incluso con al menos 90 % de homología a ella.

[0067] Algunas composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa son MYCO-LASE™ de DSM (Gist Brochades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, y SAN™ EXTRA L, (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEYME FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP 288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0068] 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 alfa-amilasa maltogénica de una cepa de *B. stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible en Novozymes A/S bajo el nombre comercial NOVAMYL™. Se describen alfa-amilasas maltogénicas en las patentes estadounidenses nº. 4,598,048, 4,604,355, y 6,162,628. Preferiblemente, la alfa-amilasa maltogénica se usa en un proceso de hidrólisis de almidón crudo, como se describe, por ejemplo, en WO 95/10627.

[0069] La alfa-amilasa se puede añadir en cantidades conocidas en la técnica. Cuando se mide en unidades AAU, la actividad de alfa-amilasa ácida está presente preferiblemente en una cantidad de 5-50.000 AAU/kg de DS, en una cantidad de 500-50.000 AAU/kg de DS, o más preferiblemente en una cantidad de 100-10.000 AAU/kg de DS, como 500-1.000s AAU/kg de DS. Las alfa-amilasas ácidas fúngicas se añaden preferiblemente en una cantidad de 10-10.000 AFAU/kg de DS, en una cantidad de 500-2.500 AFAU/kg de DS, o más preferiblemente en una cantidad de 100-1.000 AFAU/kg de DS, como aproximadamente 500 AFAU/kg de DS.

[0070] La glucoamilasa usada según una forma de realización del proceso de la invención puede ser procedente de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como se describen en WO 92/00381 y WO 00/04136; la glucoamilasa de *A. awamori* (WO 84/02921), *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de la misma.

[0071] Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes para mejorar la termoestabilidad: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Engng. 9 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Engng. 8,575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301,275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; and introduction of Pro residues in position A435 and S436 (Li et al. (1997), Protein Engng. 10 1199-1204. Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular, procedentes de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente estadounidense nº Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente estadounidense nº 4,587,215). Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

[0072] Algunas composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa son AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL 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.).

[0073] Las glucoamilasas, en una forma de realización, puede añadirse en una cantidad de 0,02-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g de DS, como 2 AGU/g de DS.

Xilanasa

[0074] En otra forma de realización preferida, el tratamiento de lipoxigenasa se usa en combinación con una xilanasa. La actividad de xilanasa (E.C. 3.2.1.8) puede ser procedente de cualquier fuente adecuada, incluidos organismos fúngicos y bacterianos, como *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium* y *Trichoderma*.

[0075] Algunas preparaciones preferidas disponibles comercialmente que comprenden xilanasa son SHEARZYME®, BIOFEED WHEAT®, CELLUCLAST®, ULTRAFLO®, VISCOZYME® (Novozymes A/S) y SPEZYME® CP (Genencor Int.).

Celulasa

[0076] En otra forma de realización preferida, el tratamiento de lipoxigenasa se usa en combinación con una celulasa. La actividad de celulasa usada según la invención puede ser procedente de cualquier origen adecuado; preferiblemente, la celulasa es de origen microbiano, como procedente de una cepa de un hongo filamentoso (por ejemplo, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*).

[0077] Algunas preparaciones disponibles comercialmente que comprenden celulasa que se pueden usar son CELLUCLAST™, CELLUZYME™, CEREFLO™ y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAM-INEX™ y SPEZYME™ CP (Genencor Int.) y ROHAMENT™ 7069 W (de Röhm GmbH).

Producción de enzimas

[0078] La lipoxigenasa y otras enzimas referenciadas aquí pueden ser procedentes u obtenidas de cualquier origen adecuado, incluido el origen bacteriano, fúngico, de levadura o de mamífero. El término "procedente" en este contexto significa que la enzima puede haber sido aislada a partir de un organismo en el que está presente originalmente, es decir, la identidad de la secuencia de aminoácidos de la enzima es idéntica a una enzima nativa. El término "procedente" también significa que las enzimas se pueden producir recombinantemente en un organismo huésped, y la enzima recombinante producida tiene bien una identidad idéntica a una enzima nativa o bien una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, con uno o más aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida recombinantemente, que es mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácido nucleico conocidos en la técnica. Dentro del significado de enzima nativa se incluyen variantes naturales. Además, el término "procedente" incluye enzimas producidas sintéticamente por, por ejemplo, síntesis de péptidos. El término "procedente" también abarca enzimas que han sido modificadas, por ejemplo, por glicosilación, fosforilación, o por otra modificación química, tanto *in vivo* como *in vitro*. El término "obtenido" en este contexto se refiere a que la enzima tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una enzima nativa. El término abarca una enzima que ha sido aislada a partir de un organismo en el que está presente originalmente, o uno en el que se ha expresado recombinantemente en el mismo tipo de organismo u otro, o enzimas producidas sintéticamente por, por ejemplo, síntesis de péptidos. Respecto a las enzimas producidas recombinantemente, los términos "obtenido" y "procedente" se refieren a la identidad de la enzima y no la identidad del organismo huésped donde se produce recombinantemente.

[0079] Las enzimas también pueden ser purificadas. El término "purificado" como se utiliza en el presente documento se refiere a enzimas libres de otros componentes del organismo del cual proceden. El término "purificado" también hace referencia a enzimas libres de componentes del organismo nativo del cual se obtiene. Las enzimas pueden ser purificadas, solo con cantidades pequeñas de otras proteínas presentes. La expresión "otras proteínas" se refiere en particular a otras enzimas. El término "purificado" como se utiliza en el presente documento también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente otras proteínas y más particularmente otras enzimas presentes en la célula de origen de la enzima de la invención. La enzima puede ser "sustancialmente pura", es decir, libre de otros componentes del organismo donde se produce, que es, por ejemplo, un organismo huésped para enzimas producidas recombinantemente. En una forma de realización preferida, las enzimas son al menos un 75 % (m/m) puras, más preferiblemente al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % puras. En otra forma de realización preferida, la enzima es 100 % pura.

[0080] Las enzimas usadas según la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para usarse en los procesos descritos en el presente documento, como, por ejemplo, en forma de un polvo seco o granulado,

un granulado sin dispersión de partículas, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Los granulados se pueden producir, por ejemplo, como se describe en las patentes estadounidenses nº. 4,106,991 y 4,661,452, y pueden opcionalmente recubrirse mediante un proceso conocido en la técnica. Se pueden estabilizar preparaciones enzimáticas líquidas, por ejemplo, añadiendo estabilizadores como un azúcar, un polialcohol u otro poliol, ácido láctico u otro ácido orgánico según el proceso establecido. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el proceso descrito en EP 238,216.

Estimuladores de la fermentación

[0081] Conforme a otra forma de realización preferida, un estimulador de fermentación se puede utilizar en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos en el presente documento para mejorar más el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, como la mejora del índice y el rendimiento de etanol. Un "estimulador de la fermentación" se refiere a estimuladores del crecimiento de los microorganismos fermentadores, en particular, de la levadura. Algunos estimuladores del crecimiento de fermentación preferidos son vitaminas y minerales. Algunos ejemplos de vitaminas son multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzólico, ácido fólico, riboflavina, y vitaminas A, B, C, D, y E. Ver, por ejemplo, Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process," Springer-Verlag (2002). Algunos ejemplos de minerales son minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, y Cu.

Licuefacción o sacarificación

[0082] Según la presente invención, los procesos de licuefacción, sacarificación y fermentación son realizados simultáneamente (LSF) a una temperatura de entre 26 °C y 40 °C.

[0083] La "licuefacción" es un proceso en el que la materia prima de granos (enteros) molidos se descompone (hidroliza) en maltodextrinas (dextrinas). El proceso de licuefacción es normalmente realizado con un pH 4,5-6,5, en particular con un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados se conocen como triturado.

[0084] Los procesos de licuefacción se realizan típicamente utilizando cualquiera de las alfa-amilasas enumeradas arriba en la sección "Amilasa".

[0085] La "sacarificación" es un proceso en el que la maltodextrina (como, por ejemplo, la producida desde el proceso de licuefacción) se convierte en azúcares de peso molecular bajo DP₁₋₃ (es decir, una fuente de carbohidratos) que se puede metabolizar por el organismo fermentador, como la levadura. Los procesos de sacarificación se conocen bien en la técnica y se realizan típicamente de manera enzimática utilizando una glucoamilasa. Alternativamente o, además, se pueden usar alfa-glucosidasas o alfa-amilasas ácidas.

[0086] Según la invención, el proceso de licuefacción, sacarificación y fermentación es un proceso de licuefacción-sacarificación-fermentación simultánea (LSF) o proceso enzimático único, en el cual los procesos de licuefacción, sacarificación y fermentación son todos llevados a cabo en un solo proceso, es decir, todas las enzimas (o agentes no enzimáticos sustituibles o adicionales) usadas para la licuefacción, sacarificación y fermentación se agregan en la misma fase del proceso, más preferiblemente, simultáneamente en la misma fase del proceso. Las condiciones del proceso preferidas para el proceso LSF son temperaturas de aproximadamente 26 °C a 40 °C, preferiblemente aproximadamente de 32 °C, un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, preferiblemente un pH de aproximadamente 5, y tiempos de proceso de aproximadamente 48 a 72 horas, preferiblemente de aproximadamente 72 horas.

[0087] El proceso LSF o proceso enzimático único es un proceso de hidrólisis de almidón crudo (RSH), más preferiblemente, usado en la producción de etanol. Un proceso de "hidrólisis de almidón crudo" (RSH) difiere de los procesos de tratamiento de almidón convencional en que el almidón crudo, también referido como almidón granulado, se usa en el proceso de fermentación de etanol. Como se utiliza en el presente documento, el término "almidón granulado" significa almidón crudo, es decir, almidón en su forma natural que se encuentra en cereales, tubérculos o granos. El almidón se forma dentro de células vegetales como gránulos diminutos insolubles en el agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50 °C a 75 °C la hinchazón puede ser reversible. Sin embargo, con temperaturas más altas, empieza una hinchazón irreversible llamada gelatinización.

[0088] El término "temperatura inicial de gelatinización" hace referencia a la temperatura mínima a la que comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en el agua empieza a gelatinizarse a entre 50 °C y 75 °C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón concreto, y puede determinarse fácilmente

por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de planta, la variedad particular de la especie de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un almidón dado es la temperatura en la que la birrefringencia se pierde en un 5 % de los gránulos de almidón usando el proceso descrito por Gorinstein. S. Y 5 Lii. C., Starch/Starke, Vol. 44 (12) págs. 461-466 (1992).

[0089] Conforme a una forma de realización preferida, la lipoxigenasa puede ser usada, preferiblemente en combinación con esterasas, una fitasa, lacasa, proteasa, amilasas y/o unas glucoamilasas, para aumentar el rendimiento del etanol en los procesos de hidrólisis de almidón crudo.

10 [0090] En una forma de realización preferida, la presente invención implica tratar la mezcla de almidón granulado con una lipoxigenasa y una o más actividades del grupo de fitasa, esterasa, proteasa, lacasa, glucoamilasa y/o alfa-amilasa (maltogénica), levadura a una temperatura por debajo de la temperatura inicial de gelatinización del almidón granulado. Preferiblemente, la levadura es levadura Ethanol Red™. La amilasa es preferiblemente una alfa-amilasa ácida, más preferiblemente una alfa-amilasa fúngica ácida.

15 [0091] Se pueden utilizar otras enzimas y estimuladores de la fermentación en combinación con el tratamiento de lipoxigenasa en el proceso RSH. Preferiblemente, la otra enzima es seleccionada del grupo consistente en una esterasa, como una lipasa, o cutinasa, fitasa, proteasa, celulasa, xilanasa, y alfa-amilasa, como una alfa-amilasa maltogénica, glucoamilasa y combinaciones de las mismas. En los procesos RSH, el ácido fítico está presente en cantidades significativas. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, se pueden utilizar fitasas para promover la liberación de fosfato inorgánico de ácido fítico (hexakisfosfato de mioinositol) o de cualquier sal 20 derivada (fitatos), tal y como se describe anteriormente.

[0092] En otra forma de realización preferida, se usa una alfa-amilasa maltogénica en combinación con el tratamiento de lipoxigenasa en el proceso RSH.

25 [0093] Una aplicación preferida de los procesos de fermentación y de las composiciones descritas en el presente documento se encuentra en un proceso de etanol para utilizarse como un combustible o un aditivo combustible, más preferiblemente para utilizarse en un proceso de hidrólisis de almidón crudo. Los procesos descritos en el presente documento pueden ser usados, por ejemplo, para aumentar el índice y/o rendimiento de producción de etanol. La adición de una cantidad eficaz de lipoxigenasa puede utilizarse para mejorar el rendimiento del etanol 30 del producto de fermentación.

35 [0094] Los procesos de producción de etanol generalmente implican las fases de molienda, licuefacción, sacarificación, fermentación y destilación. En la producción de etanol y otros productos a base de almidón, la materia prima, como los granos enteros, preferiblemente maíz, se muelen para abrir la estructura y permitir otro tratamiento. Se prefieren dos procesos según la invención: molienda en húmedo y molienda en seco. Para la producción de etanol se prefiere la molienda en seco donde el grano entero se muele y se usa en la parte restante del proceso. También se puede usar la molienda en húmedo y esta proporciona una separación buena de germen y maicena (gránulos de almidón y proteína) y se aplica con unas pocas excepciones en lugares en los que hay una producción paralela de jarabes. Ambos procesos de molienda en seco y en húmedo se conocen en la técnica.

40 [0095] En la producción de etanol, el organismo fermentador es preferiblemente levadura, que se aplica al triturado. La levadura preferida es procedente de *Saccharomyces* spp., más preferiblemente, de *Saccharomyces cerevisiae*. En formas de realización preferidas, la levadura se aplica al triturado y la fermentación se lleva a cabo durante 24-96 horas, típicamente 35-60 horas. En formas de realización preferidas, la temperatura es generalmente de entre 26-34 °C, en particular aproximadamente de 32 °C, y el pH es generalmente de pH 3-6, preferiblemente alrededor de pH 4-5. Las células de levadura se aplican preferiblemente en cantidades de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , especialmente un recuento de 5×10^7 de levadura viable por ml de caldo de fermentación. Durante la fase de producción de etanol el recuento de células de levadura debería preferiblemente encontrarse en la gama de 10^7 a 10^{10} , especialmente alrededor de 2×10^8 . Se puede encontrar más información sobre el uso de la levadura en la fermentación en, por ejemplo, "The alcohol Textbook" (Editores K. Jacques, T.P. Lyons y D.R.Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999).

45 50 [0096] Después de la fermentación, el triturado se puede destilar para extraer el etanol. El etanol, obtenido según los procesos de la invención, se pueden utilizar como, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, licores neutros potables; o etanol industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

[0097] Enzima oxidativa de ácido graso: lipoxigenasa procedente de *Magnaporthe salvinii*, descrita en WO 02/086114 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

5 Lipasa: LIPOLASE™ 100 L (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

Glucoamilasa: SPIRIZYME FUEL (disponible en Novozymes A/S).

Proteasa: NOVOZYM™ 50006 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

Levadura: Ethanol Red (disponible en Red Star/Lesaffre, EE.UU).

Métodos:

Preparación del contenido analcohólico:

10 [0098] Centrar tras la centrifugación del almidón crudo fermentado a partir de una columna de destilación de cerveza.

Actividad de lipoxigenasa

15 [0099] La actividad de lipoxigenasa se puede determinar espectrofotométricamente a 25 °C supervisando la formación de hidroperóxidos. Para el análisis estándar, se añaden 10 microlitros de enzima a una cubeta de cuarzo de 1 ml que contiene 980 microlitros con 25 mM de solución tampón de fosfato sódico (pH 7.0) y 10 microlitros de solución de sustrato (10 mM de ácido linoleico dispersado con Tween20 al 0,2 % (v/v (no debería mantenerse durante periodos de tiempo extensos)). La enzima se diluye típicamente lo suficiente como para asegurar una rotación circulatoria de como máximo un 10 % del sustrato añadido durante el primer minuto. La absorbancia a 234 nm se sigue y el índice se estima a partir de la parte lineal de la curva. Se supone que los ácidos grasos de hidro(peró)rido *cis-trans*-conjugado tienen un coeficiente de extinción molecular de 23.000 M⁻¹ cm⁻¹.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

25 [0100] La actividad amilolítica se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado por la enzima, y tras la reacción se mezclan muestras de la solución de almidón/enzimas con una solución de yodo. Inicialmente, se genera un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se va apagando y se va volviendo de un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

30 [0101] Una Unidad Kilo Novo de alfa-amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzimas 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.

[0102] Un archivo EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo demanda a Novozymes A/S, Dinamarca, y dicha carpeta se incluye en la presente por referencia.

Actividad de fitasa

35 [0103] La actividad de fitasa se mide en unidades FYT, y una FYT es la cantidad de enzimas que libera 1 micromol ortofosfato inorgánico por min. bajo las condiciones siguientes: pH 5,5; temperatura 37 °C; sustrato: fitato de sodio (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) a una concentración de 0,0050 mol/l.

Determinación de actividad FAU

40 [0104] Una unidad de alfa-amilasa fúngica (FAU) se define como la cantidad de enzimas, que rompe 5,26 g de almidón (Merck Amylum soluble Erg. B.6, lote 9947275) por hora basándose en las siguientes condiciones estándar:

Sustrato	Almidón soluble
Temperatura	37 °C
pH	4,7
Tiempo de reacción	7-20 minutos

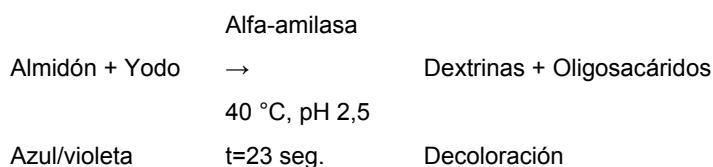
Determinación de actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

5 [0105] La actividad de alfa-amilasa ácida se mide en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determina con respecto a un estándar enzimático.

[0106] El estándar usado es AMG 300 L (de Novozymes A/S, Dinamarca, un tipo salvaje de glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1, también descrito en Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102) y WO 92/00381). La alfa-amilasa neutra en el AMG desciende tras su almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 semanas de aprox. 1 FAU/mL a menos de 0,05 FAU/mL.

10 [0107] 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 enzimas, que degrada 5.260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo condiciones estándar.

15 [0108] El yodo forma un compuesto azul con el almidón, pero no con sus productos de degradación. La intensidad del color es por lo tanto 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)

[0109]

Sustrato:	Almidón, aprox. 0,17 g/L
Disolución de tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodar (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
Gama de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

20 [0110] Si se desean más detalles, estos se pueden encontrar en EB-SM-0259.02/01, disponible bajo demanda a Novozymes A/S, Dinamarca.

Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

[0111] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida), lo cual es un método absoluto. Una unidad de amilasa ácida (AAU) es la cantidad de enzimas que convierten 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 fuerza conocida igual al de la referencia de color.

5

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0112]

Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g de DS/L.
Disolución de 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:	620nm
Concentración enzimática:	0,13-0,19 AAU/mL
Gama de trabajo de enzima:	0,13-0,19 AAU/mL

[0113] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene tratando con ácido clorhídrico diluido el almidón natural de modo que éste retenga la capacidad de volverse azul con el yodo. Se pueden encontrar más detalles en EP0140410B2.

10

Determinación de actividad de glucoamilasa (AGI)

[0114] La glucoamilasa (equivalente a amiloglucosidasa) convierte el almidón en glucosa. La cantidad de glucosa se determina aquí mediante el método de glucosa-oxidasa para determinar la actividad. El método descrito en la sección 76-11 Starch-Glucoamylase Method with Subsequent Measurement of Glucose with Glucose Oxidase 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.

15

[0115] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzimas que formará 1 micromol de glucosa por minuto bajo las condiciones estándar del método.

20

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0116]

Sustrato:	Almidón soluble.
	Concentración aprox. 16 g materia seca/L.
Disolución de 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.

[0117] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene tratando con ácido clorhídrico diluido el almidón natural de modo que éste retenga la capacidad de volverse azul con el yodo.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

5 [0118] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzimas, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37 °C, pH 4,3, sustrato: maltosa 2,2 mM, disolución de tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

10 [0119] Se puede utilizar 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, y forma NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

<u>Incubación AMG:</u>	
Sustrato:	maltosa 23,2 mM
Disolución de tampón:	acetato 0,1 M
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37 °C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Gama de trabajo de enzima:	0,5-4,0 AGU/mL

<u>Reacción de color:</u>	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0,21 mM
Disolución de 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

15 [0120] Un archivo ([EB-SM-0131.02/01](#)) que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo demanda a Novozymes A/S, Dinamarca, y dicho archivo se incluye en la presente por referencia.

Determinación de la actividad de cutinasa (LU)

[0121] La actividad de cutinasa se determina como actividad lipolítica y se determina usando tributirina como sustrato. Este método se basó en la hidrólisis de tributirina mediante la enzima, y el consumo de álcali se registra en función del tiempo. Una unidad de lipasa (LU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones

estándar (es decir a 30,0 grados Celsius; pH 7,0; con goma arábica como emulsionante y tributirina como sustrato) libera 1 micromol de ácido butírico titulable por minuto. Un archivo AF 95/5 que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo demanda a Novozymes A/S, Dinamarca, y dicho archivo se incluye en la presente por referencia.

5 Actividad xilanolítica (FXU)

[0122] La actividad xilanolítica se puede expresar en unidades FXU, determinadas con un pH 6,0 con remazol-xilano (4-O-metil-D-glucurono-D-xilano teñido con Remazol Brilliant Blue R, Fluka) como sustrato.

[0123] Una muestra de xilanasa se incuba con el sustrato de remazol-xilano. Los antecedentes del sustrato teñido no degradado se precipitan mediante etanol. El color azul restante en el sobrenadante (determinado espectrofotométricamente a 585 nm) es proporcional a la actividad de xilanasa, y las unidades de xilanasa se determinan a continuación relativamente en un estándar enzimático bajo condiciones de reacción estándar, es decir a 50,0 °C, pH 6,0, y 30 minutos de tiempo de reacción.

[0124] Un archivo [EB-SM-352.02/01](#) que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo demanda a Novozymes A/S, Dinamarca, y dicho archivo se incluye en la presente por referencia.

15 Determinación de la actividad de Amilasa Maltogénica (MANU)

[0125] Una MANU (Unidad Novo de Amilasa Maltogénica) se puede definir como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de maltosa por minuto a una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378) por ml de la disolución de tampón de 0,1 M de citrato, pH 5,0 a 37 °C durante 30 minutos.

20 Actividad celulítica (EGU)

[0126] La actividad celulítica se puede medir en unidades de endoglucanasa (EGU), determinadas con un pH de 6,0 con carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Se prepara una solución de sustrato, que contiene 34,0 g/l CMC (Hercules 7 LFD) en 0,1 M de disolución de tampón de fosfato con un pH de 6,0. La muestra enzimática que se analiza se disuelve en la misma disolución de tampón. Se mezclan y se transfieren 5 ml de solución de sustrato y 0,15 ml de solución enzimática a un viscosímetro de vibración (por ejemplo, MIVI 3000 de Sofraser, Francia), termostatizado a 40 °C durante 30 minutos. Una EGU se define como la cantidad de enzimas que reduce la viscosidad a la mitad bajo estas condiciones. La cantidad de muestra de enzimas debería ajustarse para proporcionar 0,01-0,02 EGU/ml en la mezcla reactiva. El estándar de arco se define como 880 EGU/g.

[0127] Un archivo [EB-SM-0275.02/01](#) que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo demanda a Novozymes A/S, Dinamarca, y dicho archivo se incluye en la presente por referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Medición de la actividad de enzimas oxidativas de ácido graso en ácido linoleico

[0128] Se usó un oxímetro "Oxi 3000 Oximeter" (WTW, Weilheim, Alemania) con un electrodo de oxígeno TriOxmatic 300 y un volumen de reacción estándar de 4 ml.

[0129] Se disolvieron 10 mg de ácido linoleico (10 ml 60 % de ácido linoleico) en 1 ml de etanol, y se añadieron 2 microlitros de Tween 20. De esta solución de sustrato madre se añadieron 50 microlitros en un vaso de precipitado de reacción que contenía 3,85 ml de disolución de tampón (Britton-Robinson: 100 mM de ácido fosfórico, acético y bórico; pH ajustado con NaOH) con una pequeña barra para remover para permitir que la solución se mezclara bien, y el electrodo de oxígeno se insertó en el vaso de precipitado de reacción. Se añadieron 100 microlitros de solución enzimática purificada, es decir (a) lipoxigenasa procedente de *Magnaporthe salvinii* con una concentración de aprox. 0,4 mg/ml; o (b) lipoxigenasa procedente de *Gaeumannomyces graminis* con una concentración de aprox. 0,76 mg/ml (que significa aproximadamente 0,02 mg/ml en la reacción final). Estas lipoxigenasas fueron preparadas tal y como se describe anteriormente. La temperatura fue de 25 °C. La concentración de oxígeno disuelto (mg/l) se mide y se fija en función del tiempo (min.). La actividad enzimática se calcula como la pendiente de la parte lineal de la curva (mg/l/min.) tras la adición de la enzima. La referencia fue corregida por sustracción cuando fue pertinente, lo que significa que si la

curva que muestra concentración de oxígeno en función del tiempo tuvo una pendiente de más de aproximadamente 0,05 mg de oxígeno/ml/min antes de añadir la enzima oxidativa de ácido graso (es decir, el control), este valor fue sustraído del valor de pendiente de muestra.

[0130] La Tabla 1 a continuación muestra los resultados de los experimentos.

5

Tabla 1

Enzima oxidativa de ácidos grasos		
pH	(a) LOX de <i>M. salvinii</i> mgO ₂ /ml/min	(b) LOX de <i>G. graminis</i> mgO ₂ /ml/min
2	0,0	0,0
4	0,4	0,1
5	0,7	0,4
6	1,1	0,4
7	1,0	0,4
8	0,7	0,5
9	0,8	0,4
10	0,7	0,4
11	0,6	0,2

Ejemplo 2

Enzimas oxidativas de ácidos grasos

[0131] Cuatro enzimas, a saber dos lacasas y dos lipoxigenasas, fueron evaluadas como se describe a continuación. La lacasa derivada de *Polyporus pinsitus* tuvo un PM por SDS-PAGE de 65 kDa, un pl por IEF de

10 3,5, y una temperatura óptima con un pH de 5,5 de 60 °C. La lacasa derivada de *Coprinus cinereus* tuvo un PM por SDS-PAGE de 67-68 kDa, un pl por IEF de 3,5-3,8, y una temperatura óptima con un pH de 7,5 de 65 °C. Las enzimas fueron preparadas y purificadas tal y como se describe en WO 96/00290 y en la patente estadounidense nº 6,008,029. Las dos lipoxigenasas eran procedentes de *Magnaporthe salvinii* y *Gaeumannomyces graminis*, y se prepararon tal y como se ha descrito previamente.

15 [0132] La dosificación enzimática se ajustó para asegurar el máximo aumento de absorbancia por minuto a 234 nm/530 nm, es decir, en la gama de 0,1 - 0,25 unidades de absorbancia por min.

[0133] Solución de sustrato: se mezclaron 11,65 mg de ácido linoleico (60 % Sigma), al igual que 12,5 ml 0,56 mM de Siringaldazina (Sigma) en el etanol con agua desionizada con un volumen total de 25 ml.

20 [0134] Se transfirieron 50 microlitros de la preparación enzimática que se iba a evaluar a una cubeta de cuarzo que contenía 900 microlitros de disolución de tampón de fosfato (50 mM, pH 7,0) y 50 microlitros de la solución de sustrato. La cubeta se colocó en un espectrofotómetro, termostatizado a 23 °C, y las absorbancias a 234 nm y 530 nm se midieron en función del tiempo. La absorbancia a 530 nm indica una degradación de la siringaldazina, mientras que la absorbancia a 234 nm indica una degradación del ácido linoleico. El aumento de la absorbancia en función del tiempo se calcula basándose en los minutos 2 a 4 del tiempo de reacción, es decir, $d(A_{234})/dt$, al igual que $d(A_{530})/dt$.

25 [0135] Los resultados se muestran en la tabla 2 a continuación. De estas cuatro enzimas, solo las dos lipoxigenasas se consideran una enzima oxidativa de ácidos grasos. Esto es porque la RRD = diferencia del índice de reacción = $(dA_{234}/dt - dA_{530}/dt)$ se encuentra por encima de cero solo en estas dos enzimas.

Tabla 2

Enzima	dA_{530}/dt (unidades/min)	dA_{234}/dt (unidades/min)	$dA_{234}/dt - dA_{530}/dt$ (unidades/min)
Lacasa de <i>Polyporus pinsitus</i>	0,20	0,002*	-0,20
Lipoxigenasa de <i>Magnaporthe salvinii</i>	0,0001*	0,13	0,13
Lacasa <i>Coprinus cinereus</i>	0,17	-0,001*	-0,17
Lipoxigenasa de <i>Gaeumannomyces graminis</i> lipoxygenase	-0,03*	0,21	0,21

* esto equivale a actividad cero (imprecisión analítica)

Ejemplo 3

LSF con 50 % m/m de contenido analcohólico

- [0136] La hidrólisis de almidón crudo (RSH) se efectuó de la siguiente manera: la levadura Ethanol Red se propagó aeróbicamente a 500 rpm y 32,2 °C durante 8 horas en presencia de 0,02 % DS NOVOZYME 50006™. Una mezcla de maíz (36 % DS) se preparó mezclando maíz molido (pantalla 2-mm), agua del grifo y contenido analcohólico y ajustando el pH a pH 5 con ácido fosfórico. El contenido de contenido analcohólico fue de 50 % m/m de la fase líquida. SP288,0,8 AFAU/g de DS, combustible de SPIRIZYME™, 2 AGU/g de DS, y propagado de levadura se introdujeron en la mezcla inmediatamente antes de llenar los fermentadores de 25-ml equipados con compartimentos herméticos. Los compartimentos herméticos fueron provistos de filtros de jeringa de 0,2-micro m para prevenir el contraflujo de aceite y las contaminaciones microbianas. La fermentación se efectuó a 32,2 °C durante 64 horas. Cuando la fermentación se completó se hicieron girar los fermentadores a 3.000 rpm. a 20 °C durante 15 minutos. Se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 micro m y se analizó mediante HPLC.

15

Tabla 1

Contenido analcohólico, %	Etanol, % v/v
Control	19,81
50	17,7

[0137] Efecto de la concentración del contenido analcohólico en 64 horas de rendimiento de etanol en RSH. Los datos son la media de 7 fermentaciones hechas en momentos diferentes. La Tabla 1 muestra que la adición de contenido analcohólico al medio de fermentación reduce el rendimiento de etanol.

Ejemplo 4

- 20 LSF con medio de fermentación pretratado con lipoxigenasa de *Magnaporthe salvinii* y un 50 % de contenido analcohólico

[0138] El experimento descrito en el ejemplo 3 se repitió utilizando un medio de fermentación pretratado con lipoxigenasa y lipoxigenasa con lipasa incorporada al medio de fermentación.

Tabla 2

Actividad de lipoxigenasa, U/g de DS	Lipasa	Actividad, UL/g de DS	Etanol, % v/v en la cerveza
0	-	-	17,77
9,3	-	-	18,76
9,3	LIPOLASE™100 L	5	19,13

La Tabla 2 muestra que el pretramiento de 1) lipoxigenasa y 2) lipoxigenasa y lipasa del medio de fermentación aumenta el rendimiento del etanol.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir etanol, que comprende
 - (a) moler los granos enteros;
 - (b) licuar el producto de la fase (a) utilizando una alfa-amilasa;
 - (c) sacarificar el material licuado usando una glucoamilasa;
 - (d) fermentar el material sacarificado en un medio de fermentación usando una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde el contenido analcohólico constituye de un 30 % m/m a un 70 % m/m de la porción líquida del medio de fermentación antes del inicio de la fermentación y el proceso de fermentación comprende poner en contacto el medio de fermentación con una lipoxigenasa, donde las fases (b); (c) y (d) se realizan como un proceso de licuefacción, sacarificación y fermentación simultáneas a una temperatura de 26 °C a 40 °C.
2. Proceso según la reivindicación 1, que comprende además destilar el material fermentado.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde dicho proceso comprende añadir una o más enzimas del grupo de las esterasas, como lipasa o cutinasa, fitasa, celulasa, xilanasa, alfa-amilasa, glucoamilasa o mezclas de estas.
4. Proceso según la reivindicación 1, donde dicha lipoxigenasa es procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pyricularia oryzae*, una cepa de *Geotrichum*, *Gaeumannomyces graminis* o *Magnaporthe salvinii*.
5. Proceso según la reivindicación 1, donde la materia prima que se muele es una materia prima que contiene almidón del grupo de maíz, trigo, cebada o sorgo.