

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 575**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2009 PCT/US2009/036477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2009 WO09114451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2009 E 09719801 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2265720**

54 Título: **Utilización de glucoamilasa y fitasa de Buttiauxella durante la sacarificación**

30 Prioridad:

11.03.2008 US 35672

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

27.10.2017

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US**

72 Inventor/es:

**BRENEMAN, SUZANNE;
LANTERO, ORESTE;
PAULSON, BRADLEY y
SHETTY, JAYARAMA**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 639 575 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

Utilización de glucoamilasa y fitasa de *Buttiauxella* durante la sacarificación

CAMPO TÉCNICO

5 [0001] Los métodos descritos se refieren a la utilización de glucoamilasa y de una fitasa de especie de *Buttiauxella* en procesos de conversión de almidón, por ejemplo, para la producción de DDGS para pienso para animales o en procesos de fermentación para la producción de compuestos orgánicos, tal como etanol.

ANTECEDENTES

10 [0002] Los métodos de fermentación industriales utilizan, principalmente, glucosa como materia prima para la producción de una variedad de productos finales, incluidas las enzimas, las proteínas, los aminoácidos, los ácidos orgánicos, los polialcoholes, los medicamentos y otros productos bioquímicos. En una gran cantidad de aplicaciones, la glucosa se produce a partir de la conversión enzimática de sustratos que comprenden almidón y celulosa (p. ej., granos molidos de cereal entero). El procesamiento de almidón para producir glucosa por lo general conlleva dos etapas, a saber la licuefacción del almidón granular y la sacarificación del almidón licuado para producir glucosa. Otras etapas pueden incluir la purificación y la isomerización, por ejemplo, cuando el producto final deseado es una dextrina o una fructosa purificada, o la fermentación y la destilación, por ejemplo, cuando el producto final deseado es un alcohol (p. ej., etanol).

20 [0003] La licuefacción convierte una suspensión de gránulos de polímero de almidón en una solución de dextrinas de longitud de cadena más corta de viscosidad inferior. La etapa de sacarificación también convierte dichas dextrinas de cadena más corta en glucosa. Habitualmente, el almidón se licua mediante la exposición a una temperatura elevada y bioconversión enzimática. Un proceso de licuefacción enzimático habitual conlleva la adición de una alfa (α)-amilasa bacteriana termoestable (p. ej., SPEZYME® FRED o SPEZYME® XTRA (Danisco US, Inc, Genencor Division) o TERMAMYL® SC o TERMAMYL™ 120L (Novozymes)) a una suspensión que comprende un sustrato que incluye almidón granular. El pH se ajusta a entre 5,5 y 6,5 y se eleva la temperatura a más de 90 °C. En primer lugar, se gelatiniza el almidón y, a continuación, se expone a las enzimas sacarificantes. Normalmente, la sacarificación tiene lugar en presencia de enzimas glucoamilasa, tal como glucoamilasa de *Aspergillus niger* (p. ej., OPTIDEX® L-400 (Danisco US, Inc. Genencor Division)) a un pH más ácido que el que se utiliza en la etapa de licuefacción. El pH de una etapa de sacarificación normal se encuentra entre pH 4,0 y 5,0. A continuación, los azúcares resultantes se fermentan para producir los productos finales deseados (es decir, etanol). En el proceso de producción de etanol, se producen productos derivados y productos residuales, tales como residuos desecados y solubles de destilería (DDGS, por sus siglas en inglés), que se utilizan para pienso. Asimismo, el líquido resultante del proceso (es decir, la vinaza fina) se recicla mezclándolo con suspensión.

35 [0004] Existe una cantidad de variaciones para la licuefacción y la sacarificación de un sustrato de almidón. Por ejemplo, el documento de patente WO 2008/097620 (agosto de 2008) describe métodos para la hidrólisis del almidón con el empleo de una alfa-amilasa y una fitasa. En el documento de patente WO 2008/097619 (agosto de 2008) se describen fitasas específicas y su utilización en la hidrólisis del almidón. Sin embargo, todavía se necesitan avances en la licuefacción, sacarificación y fermentación del almidón. Shi *et al*, Aquaculture, 275 (enero de 2008), 70-75, describe fitasas de *Buttiauxella*, separadas del intestino de la carpa china.

BREVE SUMARIO

40 [0005] Se describen métodos que conllevan la utilización de una glucoamilasa en combinación con una fitasa en un proceso de conversión de almidón. Dicho proceso puede utilizarse para la producción de compuestos orgánicos, tales como etanol, para la producción de DDGS para pienso para animales, o para ambas. En algunos modos de realización, los métodos comprenden la adición de una mezcla de enzimas que comprende una glucoamilasa y una fitasa a procesos de conversión de almidón durante la fase previa a la sacarificación, la sacarificación y/o la sacarificación/fermentación combinadas. Dichos métodos ofrecen diversas ventajas en comparación con la utilización de una glucoamilasa solamente.

[0006] La invención da a conocer un método de producción de un alcohol, que comprende:

- 50 (a) poner en contacto una suspensión que comprende un sustrato de almidón con al menos una α -amilasa que produce oligosacáridos;
- (b) poner en contacto los oligosacáridos con al menos una glucoamilasa y al menos una fitasa, donde la fitasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 5, para producir azúcares fermentescibles;
- (c) fermentar los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación para producir alcohol; y opcionalmente

(d) recuperar el alcohol y/o los DDGS. En algunos modos de realización, la temperatura puede elevarse por encima de la temperatura de gelatinización del sustrato de almidón después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).

5 **[0007]** En algunos modos de realización, el sustrato de almidón es un grano molido y el grano molido se escoge entre maíz, cebada, trigo, arroz, sorgo, centeno, mijo y/o tritical. En algunos modos de realización, la fitasa tiene una alanina en el aminoácido 92 y/o al menos uno de los siguientes aminoácidos: una treonina en la posición 89, una isoleucina en la posición 134, una serina en la posición 164, una lisina en la posición 176, una prolina en la posición 178, un ácido glutámico en la posición 207, una serina en la posición 209, una leucina en la posición 248, una tirosina en la posición 256, un ácido glutámico en la posición 261 y una lisina en la posición 269. En
10 algunos modos de realización, la fitasa tiene al menos uno de los siguientes cambios aminoacídicos: A89T, D92A, T134I, F164S, T176K, A178P, K207E, A209S, S248L, Q256Y, A261E y N269K. En algunos modos de realización, la fitasa es *Buttiauxella* spp. de tipo salvaje, fitasa (BP-WT, por sus siglas en inglés) o una variante seleccionada entre BP-11 y BP-17. En algunos modos de realización, la fitasa tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8.

15 **[0008]** En algunos modos de realización, el método también incluye poner en contacto los oligosacáridos con al menos una enzima diferente/adicional seleccionada entre una α -amilasa, una segunda glucoamilasa, una segunda fitasa, una celulasa, una pululanasa, una proteasa y/o una lacasa. El alcohol puede ser etanol.

[0009] La invención también da a conocer un método para la reducción del ácido fítico durante la fermentación de etanol, que comprende:

20 (a) poner en contacto una suspensión que incluye un sustrato de almidón con al menos una α -amilasa para producir un producto de licuefacción;
(b) poner en contacto el producto de licuefacción con al menos una glucoamilasa y al menos una fitasa, donde la fitasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 5 y donde la fitasa tiene una alanina en la posición 92, en condiciones tales que se producen azúcares fermentescibles;
25 (c) fermentar los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación en condiciones tales que se produce etanol y/o DDGS; y opcionalmente
(d) recuperar el etanol y/o los DDGS. En algunos modos de realización, el método incluye elevar la temperatura por encima de la temperatura de licuefacción para el sustrato de almidón. En algunos modos de
30 realización, la puesta en contacto del producto de licuefacción con al menos una glucoamilasa y al menos una fitasa y la fermentación de los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación se producen simultáneamente.

[0010] En algunos modos de realización, la glucoamilasa procede de un hongo filamentoso que se escoge entre *Trichoderma*, *Penicillium*, *Taleromyces*, *Aspergillus* y/o *Humicola*. En algunos modos de realización, la
35 *Trichoderma* es *Trichoderma reesei*. En algunos modos de realización, la fitasa es BP-17. En algunos modos de realización, los DDGS poseen fitasa activa residual. Los DDGS pueden mezclarse con un pienso. En algunos modos de realización, cuando se mezclan los DDGS con granos o pienso para producir un pienso para animales, la fitasa activa reduce el ácido fítico en el pienso. En algunos modos de realización, el sustrato de almidón es un grano molido, tal como maíz, cebada, mijo, trigo, arroz, sorgo, centeno y/o tritical.

40 **[0011]** La invención también da a conocer un método de reducción de ácido fítico en DDGS, que comprende:

(a) poner en contacto una suspensión que comprende un sustrato de almidón con al menos una α -amilasa para producir un producto de licuefacción;
(b) poner en contacto el producto de licuefacción con al menos una glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA) y al menos una fitasa, donde la fitasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de
45 aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 5 en condiciones tales que se producen azúcares fermentescibles;
(c) y fermentar los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación para producir etanol y/o DDGS. En algunos modos de realización, la puesta en contacto del sustrato de almidón con al menos una glucoamilasa y al menos una fitasa y la fermentación de los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación se producen simultáneamente.

50 En algunos modos de realización, la fitasa tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la fitasa de SEQ ID NO: 5 y tiene una alanina en el aminoácido 92. En algunos modos de realización, la fitasa es *Buttiauxella* spp. de tipo salvaje, fitasa (BP-WT, por sus siglas en inglés) o una variante seleccionada entre BP-11 y BP-17.

[0012] Los métodos de la invención pueden utilizar una única composición que comprende una mezcla de una glucoamilasa en combinación con una fitasa. Dicha mezcla puede añadirse durante las etapas de fase previa a la sacarificación, sacarificación y/o sacarificación/fermentación combinadas de un proceso de conversión de almidón.

[0013] A continuación, se describen con mayor detalle estos y otros aspectos de las presentes composiciones y métodos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **[0014]** En la figura 1, se muestra el contenido de fósforo libre en los DDGS obtenido mediante la utilización de una composición enzimática que incluye fitasa BP-17 con distintas concentraciones en una fermentación de levadura de maíz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS SECUENCIAS

[0015]

10 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA).
 SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de TrGA correspondiente a los residuos 1-453.
 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la región de enlace de TrGA correspondiente a los residuos 453-491.
 15 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos del dominio de unión a almidón de TrGA correspondiente a los residuos 492-599.
 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia proteica madura de fitasa de *Buttiauxella*.
 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia proteica madura de la variante de fitasa de *Buttiauxella* D92A.
 20 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia proteica madura de la variante de fitasa de *Buttiauxella* BP-11.
 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la secuencia proteica madura de la variante de fitasa de *Buttiauxella* BP-17.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Introducción

25 **[0016]** En el presente documento, se describen composiciones y métodos que se refieren a una mezcla enzimática que incluye una glucoamilasa en combinación con al menos una fitasa para su utilización en procesos de conversión de almidón, por ejemplo, para la producción de DDGS para pienso para animales o en procesos de fermentación para la producción de compuestos orgánicos, tales como etanol. Las composiciones y los métodos pueden utilizarse para la reducción de ácido fítico durante la sacarificación, la fermentación y/o la
 30 fermentación y la sacarificación simultáneas (SSF, por sus siglas en inglés), lo que da lugar a una reducción de ácido fítico en los productos o productos derivados de la fermentación (p. ej., los DDGS y la vinaza fina).

[0017] La fitasa utilizada en los métodos de la invención tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 5, incluidos al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99% y hasta un 100 %, inclusive. En algunos modos de realización, la fitasa incluye además una alanina en la posición 92. En algunos
 35 modos de realización, la fitasa incluye una alanina en la posición 92 y, adicionalmente, tiene al menos una de las siguientes características de secuencia de aminoácidos: una treonina en la posición 89, una isoleucina en la posición 134, una serina en la posición 164, una lisina en la posición 176, una prolina en la posición 178, un ácido glutámico en la posición 207, una serina en la posición 209, una leucina en la posición 248, una tirosina en la posición 256, un ácido glutámico en la posición 261 y una lisina en la posición 269. En algunos modos de
 40 realización, la fitasa tiene al menos una de las siguientes sustituciones aminoacídicas: A89T, T134I, F164S, T176K, A178P, K207E, A209S, S248L, Q256Y, A261E y N269K con o sin la sustitución adicional D92A.

[0018] En algunos modos de realización, la glucoamilasa se obtiene a partir de un hongo filamentoso. En modos de realización específicos, la glucoamilasa tiene al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia con respecto a la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA; SEQ ID NO: 1), incluidos al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99% y hasta un 100 %.

[0019] A continuación, se describen con mayor detalle estas y otras características de los presentes métodos.

II. Definiciones

50 **[0020]** A menos que se indique lo contrario, los presentes métodos conllevan técnicas convencionales utilizadas habitualmente en biología molecular, ingeniería de proteínas, técnicas de ADN recombinante, microbiología, biología celular, cultivo de células, biología transgénica, inmunología y purificación de proteínas. Los expertos en la materia conocen dichas técnicas, que se describen en numerosos textos y obras de referencia. Si bien se ejemplifican métodos y materiales específicos, pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes.

A menos que se definan de otra forma, debería otorgarse a todos los términos técnicos y científicos su significado habitual. Por motivos de claridad, se definen los siguientes términos a continuación:

Las "alfa amilasas" son α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasas (E.C. 3.2.1.1) que son capaces de escindir o hidrolizar enlaces α -1,4 -glicosídicos internos en el almidón (p. ej., polímeros de amilopectina o de amilosa).

5 **[0021]** Los términos "enzima hidrolizante del almidón granular (GSH)" y "enzimas con actividad hidrolizante del almidón granular (GSH)" se refieren a enzimas capaces de hidrolizar almidón en forma granular.

[0022] El término "equivalente funcional" se refiere a una molécula, por ejemplo, una enzima, que tiene las mismas características funcionales (tales como actividad enzimática) de otra molécula. El término "variante", cuando se utiliza con referencia a una enzima (p. ej., una α -amilasa, una glucoamilasa, una proteasa de ácido fúngico, una fitasa o similares), se refiere a una enzima derivada de una enzima original pero con una sustitución, inserción o delección de uno o más aminoácidos en comparación con la enzima original. El término también incluye formas híbridas de la enzima, donde, por ejemplo, la enzima puede tener un extremo C-terminal derivado de una especie de *Bacillus* (p. ej., *B. licheniformis*) y un extremo N-terminal derivado de una especie de *Bacillus* diferente (p. ej., *B. stearothermophilus*) o viceversa. Una variante puede tener una o más propiedades alteradas en comparación con la enzima original, tal como una estabilidad térmica aumentada, una estabilidad proteolítica aumentada, una actividad específica aumentada, una especificidad de sustrato más amplia, una actividad más amplia a lo largo de un rango de pH, una resistencia a la inhibición (p. ej., sustrato) o combinaciones de las mismas. Una "enzima original" se refiere a una enzima que se utiliza como un punto de comienzo para modificaciones. Una enzima original puede ser una enzima de origen natural o de "tipo salvaje".

20 **[0023]** Tal como se entiende en el presente documento, "licuefacción" o "licuar" se refieren a un proceso mediante el que el almidón se convierte en dextrinas de cadena más corta y menos viscosas.

[0024] Tal como se entiende en el presente documento, las "dextrinas" se refieren a polímeros de glucosa de cadena corta (p. ej., de 2 a 10 unidades).

25 **[0025]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "almidón" se refiere a cualquier material formado por los carbohidratos de polisacárido complejos (amilosa y amilopectina) que tienen la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, donde x es cualquier número.

[0026] Tal como se entiende en el presente documento, el término "almidón granular" significa almidón crudo, es decir, almidón que no se ha sometido a una temperatura en la que se produce la gelatinización.

30 **[0027]** Tal como se entiende en el presente documento, los términos "enzima sacarificante" y "glucoamilasa" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a cualquier enzima capaz de catalizar la liberación de D-glucosa de los extremos no reductores de almidón y de los oligosacáridos y polisacáridos relacionados.

[0028] Tal como se entiende en el presente documento, el término "oligosacárido" se refiere a moléculas que tienen de 2 a 10 unidades de monosacáridos unidas mediante enlaces glucosídicos. Los monosacáridos pueden ser glucosa y/u otros azúcares. Los oligosacáridos incluyen dextrinas y almidón.

35 **[0029]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "azúcares fermentescibles" se refiere a azúcares capaces de fermentarse con un organismo de fermentación. Los azúcares fermentescibles incluyen, pero sin carácter limitativo, oligosacáridos y dextrinas.

40 **[0030]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "dextrosa equivalente" o "DE" se refiere a una norma común para medir la concentración de los azúcares reductores totales, que se calcula como D-glucosa en peso seco. El almidón granular no hidrolizado tiene una DE que es, fundamentalmente, 0, y la D-glucosa tiene una DE de 100.

[0031] Tal como se entiende en el presente documento, el término "contenido total de azúcar" se refiere al contenido total de azúcar presente en una composición de almidón. El "contenido total de azúcar" puede medirse en diversos momentos o puntos en un proceso.

45 **[0032]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "materia seca" o "ms" se refiere a los sólidos totales en una suspensión y se expresa como un porcentaje en peso seco.

[0033] Tal como se entiende en el presente documento, "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos o de nucleótidos en una secuencia que son idénticos a los residuos de aminoácidos o nucleótidos en otra secuencia, lo que se determina mediante el alineamiento de las secuencias y la introducción de huecos (*gaps*), en caso de ser necesario, para conseguir la mejor alineación posible (es decir, el máximo porcentaje de identidad de secuencia), y sin considerar ninguna sustitución conservativa en la determinación de la identidad de secuencia. Se conocen métodos para llevar a cabo el alineamiento de secuencias y determinar la identidad de secuencia

que pueden llevarse a cabo sin experimentación indebida para obtener valores definitivos. Se dispone de un número de algoritmos para alinear secuencias y determinar la identidad de secuencia, incluidos, pero sin carácter limitativo, el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman *et al.* (1970) J. Mol Biol. 48:443; el algoritmo de homología local de Smith *et al.*, (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; la búsqueda de un método de similitud de Pearson *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444; el algoritmo de Smith-Waterman (1997) Meth. Mol. Biol. 70:173-187; los algoritmos de BLASTP, BLASTN, y BLASTX (véase Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410). También se dispone de los programas computerizados que utilizan estos algoritmos, incluidos, pero sin carácter limitativo: el *software* ALIGN o Megalign (DNASTAR), o WU-BLAST-2 (véase, p. ej., Altschul *et al.* (1996) Meth. Enzym. 266:460-480); o GAP, BESTFIT, BLAST (p. ej., Altschul *et al.*, *supra*, FASTA y TFASTA, disponibles en el paquete de Genetics Computing Group (GCG), versión 8, Madison, Wisconsin, EE. UU); y CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California, EE. UU.

[0034] Los expertos en la materia pueden determinar parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para conseguir un alineamiento máximo a lo largo de las secuencias que se comparan. En algunos modos de realización, la identidad de secuencia se determina mediante la utilización de los parámetros por defecto determinados por el programa. En algunos modos de realización, la identidad de secuencia puede determinarse mediante el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman (véase, p. ej., (1997) Meth. Mol. Biol. 70:173-187) implementado en el programa MSPRCH (Oxford Molecular, Accelrys Ltd., Oxford, Inglaterra) mediante la utilización de una búsqueda de hueco afín (*affine gap*) con los los siguientes parámetros de búsqueda: penalización por apertura de hueco (*gap open penalty*) de 12 y penalización por extensión de hueco (*gap extension penalty*) de 1. En algunos modos de realización, pueden llevarse a cabo comparaciones de aminoácidos emparejados mediante la utilización del programa GAP del paquete de *software* de análisis de secuencias GCG de Genetics Computer Group, Inc., Madison, Wisconsin, con la matriz de sustitución de aminoácidos blosum62, con un peso de hueco (*gap weight*) de 12 y un peso de longitud (*length weight*) de 2. En algunos modos de realización, con respecto a un alineamiento óptimo de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener al menos otro residuo de aminoácido más o al menos un residuo de aminoácido delecionado con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluye al menos aproximadamente 20 residuos de aminoácido contiguos y puede incluir al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50 o más residuos de aminoácido. Las correcciones para el aumento de la identidad de secuencia asociadas a la inclusión de huecos en la secuencia de aminoácidos derivada pueden realizarse mediante la asignación de penalizaciones de hueco (*gap penalties*).

[0035] Normalmente, las búsquedas de secuencias se llevan a cabo con el programa BLASTN cuando se evalúa una secuencia de ácido nucleico determinada en relación con las secuencias de ácido nucleico de la base de datos de secuencias de ADN de GENBANK® y de otras bases de datos públicas. Se prefiere el programa BLASTX para buscar secuencias de ácido nucleico que se han traducido en todos los marcos de lectura con respecto a las secuencias de aminoácidos de las secuencias de proteínas de GENBANK® y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTN como BLASTX funcionan, normalmente, con parámetros por defecto de una penalización por hueco abierto de 11.0 y una penalización por hueco extendido de 1.0, y utilizan la matriz BLOSUM-62 (véase, p. ej., Altschul *et al.* (1997)).

[0036] Los alineamientos de las secuencias seleccionadas se utilizan en la determinación del % de identidad (un término que se utiliza de manera intercambiable en el presente documento con respecto al término % de homología) entre dos o más secuencias. Puede utilizarse el programa CLUSTAL-W en MacVector, versión 6.5, que funciona con parámetros por defecto, incluidas una penalización por hueco abierto de 10.0, una penalización por hueco extendido de 0.1, así como una matriz de similitud BLOSUM 30.

[0037] Tal como se entiende en el presente documento, el término "molido" se refiere a material vegetal cuyo tamaño se ha reducido, por ejemplo, mediante molienda, trituración, fraccionamiento o cualquier otro medio de reducción o de selección del tamaño de las partículas. El término abarca la molienda en seco y la molienda en húmedo. La "molienda en húmedo" se refiere a la molienda del grano seco entero, mientras que la "molienda en húmedo" se refiere al proceso mediante el que, en primer lugar, se pone el grano en remojo (es decir, se empapa) con agua para reblandecer el grano.

[0038] Tal como se entiende en el presente documento, el término "gelatinización" se refiere a la solubilización de una molécula de almidón, por lo general mediante cocido a una temperatura elevada, para formar una suspensión viscosa.

[0039] Tal como se entiende en el presente documento, el término "temperatura de gelatinización" se refiere a la temperatura a la que comienza la gelatinización de un sustrato que contiene almidón. En algunos modos de realización, se refiere a la temperatura más baja a la que comienza la gelatinización de un sustrato que contiene almidón. La temperatura exacta de gelatinización depende de la forma específica del almidón presente y puede

variar en función de factores tales como la especie vegetal, las condiciones ambientales, las condiciones de crecimiento y otros parámetros.

[0040] Tal como se entiende en el presente documento, el término "por debajo de la temperatura de gelatinización" se refiere a una temperatura que es menor que la temperatura de gelatinización.

5 **[0041]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "suspensión" se refiere a una mezcla acuosa que comprende sólidos insolubles (p. ej., almidón granular).

10 **[0042]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "fermentación" se refiere a la descomposición enzimática de las sustancias orgánicas por medio de microorganismos para producir compuestos orgánicos más simples. Si bien la fermentación se produce en condiciones anaeróbicas, no se pretende que el término se limite únicamente a condiciones anaeróbicas estrictas, puesto que la fermentación también se produce en presencia de oxígeno (p. ej., en condiciones microaerófilas y otras condiciones).

15 **[0043]** Tal como se entiende en el presente documento, la frase "sacarificación y fermentación simultáneas" o "SSF" se refiere a un proceso en la producción de un producto final en el que un organismo de fermentación, tal como un microorganismo de producción de etanol y al menos una enzima, tal como una enzima sacarificante, se mezclan en la misma etapa del proceso en el mismo recipiente.

[0044] Tal como se entiende en el presente documento, el término "vinaza fina" significa la parte del líquido de la vinaza separada de los sólidos (p. ej., mediante tamizado o centrifugación) que contiene partículas finas suspendidas y material disuelto. El término "*backset*" se utiliza, por lo general, para referirse a la vinaza fina reciclada.

20 **[0045]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "producto final" se refiere a un producto derivado de una fuente de carbono que se convierte enzimáticamente a partir de un sustrato fermentescible. En algunos modos de realización, el producto final es un alcohol (p. ej., etanol).

[0046] Tal como se entiende en el presente documento, el término "derivado/a/os/as de" abarca los términos "originado/a/os/as de", "obtenido/a/os/as de", "que se puede obtener de" y "aislado/a/os/as de".

25 **[0047]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "organismo de fermentación" se refiere a un microorganismo o una célula adecuados para su utilización en métodos de fermentación para producir, de forma directa o indirecta, un producto final. En algunos modos de realización, el organismo de fermentación es eucariota (p. ej., hongos), mientras que en otros es procariota (p. ej., bacterias).

30 **[0048]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "productor de etanol" o "microorganismo de producción de etanol" se refiere a un organismo de fermentación capaz de producir etanol a partir de un monosacárido u oligosacárido.

[0049] Tal como se entiende en el presente documento, los términos "recuperado", "aislado" y "separado" se refieren a una proteína, célula, ácido nucleico o aminoácido que se elimina de al menos un componente con el que está asociado de manera natural.

35 **[0050]** Tal como se entiende en el presente documento, los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente para hacer referencia a una serie de residuos de aminoácidos enlazados mediante enlaces peptídicos. Se emplean tanto los códigos de una y tres letras convencionales para residuos de aminoácidos. El código de tres letras se ajusta a la comisión conjunta de nomenclatura bioquímica (JBCN, por sus siglas en inglés) de la IUPAC-IUB. Queda entendido que más de una secuencia de nucleótidos puede codificar un polipéptido debido a la degeneración del código genético. A menos que se indique lo contrario, los aminoácidos indicados se escriben de izquierda a derecha en orientación amino a carboxi.

45 **[0051]** Tal como se entiende en el presente documento, el término "fitasa" se refiere a una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, incluido el fitato, y de liberar fosfato inorgánico e inositol. En algunos modos de realización, además del fitato, la fitasa puede hidrolizar al menos uno de los inositol fosfatos de grados de fosforilación intermedios.

[0052] Tal como se entiende en el presente documento, el término "tipo salvaje" se refiere a un polipéptido o polinucleótido (nativo) de origen natural. El término tipo salvaje puede, en algunos casos, emplearse de manera intercambiable con los términos "original" o "secuencia original".

50 **[0053]** Tal como se entiende en el presente documento, los términos "poner en contacto" y "exponer" se refieren a la colocación de al menos una enzima lo suficientemente cerca de su sustrato similar para posibilitar que la enzima convierta el sustrato en al menos un producto final. El producto final puede ser un "producto de interés" (es decir, un producto final que sea el resultado deseado de la reacción de fermentación). "Poner en contacto" incluye mezclar una solución que comprende una enzima con el sustrato similar.

[0054] Tal como se entiende en el presente documento, los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen el plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. En consecuencia, por ejemplo, una referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. El término "o", por lo general, significa "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 **[0055]** Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Cuando se proporcione un intervalo de valores, queda entendido que cada valor intermedio entre el límite superior e inferior de dicho intervalo también se expone específicamente hasta una décima parte de la unidad del límite inferior (a menos que el contexto indique claramente lo contrario). El límite superior e inferior de intervalos más pequeños puede, de forma independiente, incluirse en el intervalo o excluirse del mismo.

10 III. Ejemplos de modos de realización

A. Glucoamilasas

[0056] En la invención pueden utilizarse diversas glucoamilasas (GA) (E.C.3.2.1.3). En algunos modos de realización, las GA se expresan endógenamente por medio de bacterias, plantas y/u hongos, mientras que en otros modos de realización las GA son heterólogas a las células huésped (p. ej., bacterias, plantas y/u hongos).

15 En algunos modos de realización, las GA se producen mediante cepas de hongos filamentosos y levadura, por ejemplo, GA disponibles en el mercado producidas mediante cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma*. Entre las GA adecuadas, se encuentran las enzimas de tipo salvaje de origen natural, así como variante de enzima y enzima mutante creada genéticamente, tal como GA híbrida. Las GA híbridas incluyen las que tienen un dominio catalítico de una GA de un organismo (p. ej., GA de *Talaromyces*) y un dominio de unión al almidón (SBD, por sus siglas en inglés) de una GA de un organismo diferente (p. ej., GA de *Trichoderma*). En algunos modos de realización, el enlace está incluido con el dominio de unión al almidón (SBD) o el dominio catalítico. A continuación, se presentan ejemplos de GA adecuados para su utilización como se describe: GA de *Aspergillus niger* G1 y G2 (véase, p. ej., Boel *et al.* (1984) EMBO J. 3:1097-1102; los documentos de patente WO 92/00381, WO 00/04136 y USP 6,352,851); GA de *Aspergillus awamori* (véase, p. ej., el documento de patente WO 84/02921); GA de *Aspergillus oryzae* (véase, p. ej., Hata *et al.* (1991) Agric. Biol. Chem. 55:941-949), y GA de *Aspergillus shirousami* (véase, p. ej., Chen *et al.* (1996) Prot. Eng. 9:499-505; Chen *et al.* (1995) Prot. Eng. 8:575-582; y Chen *et al.* (1994) Biochem J. 302:275-281).

[0057] Entre otras GA, se encuentran las que se obtienen a partir de cepas de *Talaromyces* (p. ej., *T. emersonii*, *T. leycettanus*, *T. duponti* y *T. thermophilus* (véanse, p. ej., los documentos de patente WO 99/28488; U.S. Pat. N.º RE 32,153; U.S. Pat. N.º 4,587,215); cepas de *Trichoderma* (p. ej., *T. reesei*); cepas de *Rhizopus*, (p. ej., *R. niveus* y *R. oryzae*); cepas de *Mucor* y cepas de *Humicola*, (p. ej., *H. grisea* (véase, p. ej., Boel *et al.* (1984) EMBO J. 3:1097-1102; WO 92/00381; WO 00/04136; Chen *et al.* (1996) Prot. Eng. 9:499-505; Taylor *et al.* (1978) Carbohydrate Res. 61:301-308; U.S. Pat. N.º 4,514,496, 4,092,434 y 4,618,579; Jensen *et al.* (1988) Can. J. Microbiol. 34:218-223; y SEQ ID NO: 3 del documento de patente WO 2005/052148); así como GA que tienen al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 % o al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia en relación con SEQ ID NO: 4 expuesta en el documento de patente U.S. Pat. Pub. N.º 2006-0094080.

[0058] En algunos modos de realización, la GA tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, e incluso al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 del documento de patente WO 05/052148. Otras GA útiles en la presente invención abarcan las que se obtienen a partir de *Athelia rolfsii* y sus variantes (véase, p. ej., el documento de patente WO 04/111218) y de especies de *Penicillium* (véase, p. ej., *Penicillium chrysogenum*).

45 **[0059]** Las GA disponibles en el mercado adecuadas para su utilización descritas incluyen, pero sin carácter limitativo, DISTILLASE®, OPTIDEX® L-400 y G ZYME® G990 4X, GC480, G-ZYME 480, FERMGEN® 1-400 (Danisco US, Inc, Genecor Division) CU.CONC® (Shin Nihon Chemicals, Japón), GLUCZYME (Amano Pharmaceuticals, Japón (véase, p. ej., Takahashi *et al.* (1985) J. Biochem. 98:663-671)). Otras enzimas para su utilización como se describe incluyen tres formas de GA (E.C.3.2.1.3) producidas mediante una especie de *Rhizopus*, a saber "Gluc1" (MW 74.000), "Gluc2" (MW 58.600) y "Gluc3" (MW 61.400). Por lo general, puede utilizarse cualquier GA adecuada de acuerdo con la presente composición y los presentes métodos.

[0060] A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos madura (SEQ ID NO: 1) de la GA de *Trichoderma reesei* (TrGA). La secuencia tiene 599 aminoácidos; el dominio catalítico (SEQ ID NO: 2) está subrayado y corresponde a los residuos 1-453; la región de enlace (SEQ ID NO: 3) corresponde a los residuos 453-491; y el dominio de unión al almidón SEQ ID NO: 4 (en cursiva) corresponde a los residuos 492-599.

Secuencia proteica madura de glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA) (SEQ ID NO: 1)

1 SVDDFISTET PIALNNLLCN VGPDGCRAFG TSAGAVIASP STIDPDYYM
 51 WTRDSALVFK NLIDRFTETY DAGLQRRIEQ YITAQVTLQG LSNPSGSLAD
 101 GSGLGEPKFE LTLKPFTGNW GRPQRDGPAL RAIALIGYSK WLINNNYQST
 151 VSNVIWPIVR NDLNYVAQYW NQTGFDLWEE VNGSSFFTVA NQHRALVEGA
 5 201 TLAATLGQSG SAYSSVAPQV LCFLQRFWVS SGGYVDSNIN TNEGRTGKDV
 251 NSVLTSIHTF DPNLGCDAGT FQPCSDKALS NLKVVVDSFR SIYGVNKGIP
 301 AGAAVAIGRY AEDVYYNGNP WYLATFAAAE QLYDAIYVWK KTGSITVTAT
 351 SLAFFQELVP GVTAGTYSSS SSTFTNIINA VSTYADGFLS EAAKYVPADG
 401 SLAEQFDRNS GTPLSALHLT WSYASFLTAT ARRAGIVPPS WANSSASTIP
 10 451 STCSGASVVG SYSRPTATSF PPSQTPKPGV PSGTPYTPLP CATPTSAVAT
 501 FHELVSTQFG QTVKVAGNAA ALGNWSTSAA VALDAVNYAD NHPLWIGTVN
 551 LEAGDVVEYK YINVGQDGSV TWESDPNHTY TVPAVACVTQ VVKEDTWQS

15 **[0061]** En algunos modos de realización, la GA tiene al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % e incluso al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1 o 2. En algunos modos de realización, la GA es la TrGA expuesta en el documento de patente U.S. Pat. N.º 7,413,887.

20 **B. Fitasas**

25 **[0062]** En la invención, pueden utilizarse diversas fitasas, como se define en las reivindicaciones. Entre las fitasas útiles, se encuentran las que pueden hidrolizar ácido fítico en las condiciones definidas de sacarificación, fermentación y/o sacarificación y fermentación simultáneas, que se han descrito en el presente documento. Los métodos conllevan la adición de al menos una fitasa a una sacarificación y/o una SSF y la fitasa es capaz de liberar al menos un fosfato inorgánico de un inositol hexafosfato (p. ej., ácido fítico). Según sea necesario, la fitasa se obtiene a partir de una especie de *Bittiauxella*, tal como *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferragutiase*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae* o *B. warmboldiae*. El DSMZ, es decir, el Centro de Recursos de Material Biológico alemán (Inhoffenstrabe 7B, 38124 Braunschweig, Alemania), así como otros depósitos, disponen de especies de *Buttiauxella*. La fitasa tiene al menos un 90%, por ejemplo, al menos aproximadamente un 91%, al menos aproximadamente un 92%, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % e incluso al menos aproximadamente un 99 % de identidad de secuencia en relación con la fitasa de especie de *Bittiauxella*, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

35 Secuencia proteica madura de fitasa de *Buttiauxella* (SEQ ID NO: 5)

NDTPASGYQV EKVVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPTWTP EWPVKLGYIT
 PRGEHLISLM GGFYRQKFOO QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VDQRTLKTGE
 AFLAGLAPQC GLTIHHQONL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
 QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSTSAWC QKHSADKSCD LGLSMPSKLS
 IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAWNI HSEQEWASLL
 KLHNQFDLM ARTPYIARHN GTPLLQAIN ALNPNTATESK LPDISPDNKI
 LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
 VVSMVYQTLQ QLRSTPLSL NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR
 VVSQSVPEPGC QLQ

[0063] En SEQ ID NO: 6 se expone una variante de fitasa de especie de *Bittiauxella* que tiene una alanina en el aminoácido 92.

Secuencia proteica madura de variante de fitasa de *Buttiauxella* D92A (SEQ ID NO: 6)

NDTPASGYQV EKVVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPTNTWP EWPVKLGYYIT
 PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VAQRTLKTGE
 AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
 QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSSTSAWC QKHSADKSCD LGLSMP SKLS
 IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAWNI HSEQEWASLL
 KLHNVQFDLM ARTPYIARHN GTPLLQAI SN ALNPNATESK LPDISPDNKI
 LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
 SVSMVYQ TLE QLRSTPLSL NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR
 VVSQSVEPGC QLQ

- 5 **[0064]** En algunos modos de realización, la fitasa es la variante de fitasa de *Buttiauxella* BP-11, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y que incluye sustituciones en los residuos de aminoácido A89, T134, F164, T176, A178, K207, A209, S248, Q256, A261 y N269, en relación con la secuencia de la enzima de tipo salvaje (SEQ ID NO: 5). Las sustituciones específicas son A89T, T134I, F164S, T176K, A178P, K207E, A209S, S248L, Q256Y, A261E y N269K.

Secuencia proteica madura de la variante de fitasa de *Buttiauxella* BP-11 (SEQ ID NO: 7)

NDTPASGYQV EKVVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPTNTWP EWPVKLGYYIT
 PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWTD VDQRTLKTGE
 AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
 QTPIDNLNQH YIPSLALMNT TLNFSKSPWC QKHSADKSCD LGLSMP SKLS
 IKDNGNEVSL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAWNI HSEQEWALLL
 KLHNVYFDLM ERTPYIARHK GTPLLQAI SN ALNPNATESK LPDISPDNKI
 LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
 SVSMVYQ TLE QLRSTPLSL NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR
 VVSQSVEPGC QLQ

- 10 **[0065]** En algunos modos de realización, la fitasa tiene una alanina en la posición 92 (como se expone en SEQ ID NO: 6) y al menos uno de los siguientes aminoácidos: una treonina en la posición 89, una isoleucina en la posición 134, una serina en la posición 164, una lisina en la posición 176, una prolina en la posición 178, un ácido glutámico en la posición 207, una serina en la posición 209, una leucina en la posición 248, una tirosina en la posición 256, un ácido glutámico en la posición 261 y una lisina en la posición 269.
- 15 **[0066]** En algunos modos de realización, la fitasa tiene al menos uno de los siguientes cambios aminoacídicos: A89T, D92A, T134I, F164S, T176K, A178P, K207E, A209S, S248L, Q256Y, A261E y N269K.

- 20 **[0067]** En algunos modos de realización, la fitasa es la variante de fitasa de *Buttiauxella* BP-17, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8 y que incluye sustituciones en los residuos de aminoácido A89, D92, T134, F164, T176, A178, K207, A209, S248, Q256, A261 y N269, en relación con la secuencia de la enzima de tipo salvaje (SEQ ID NO: 5).

[0068] Las sustituciones específicas son A89T, D92A, T134I, F164S, T176K, A178P, K207E, A209S, S248L, Q256Y, A261E y N269K.

Secuencia proteica madura de la variante de fitasa de *Buttiauxella* BP-17 (SEQ ID NO: 8)

NDTPASGYQV EKVVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPTNTWP EWPVKLGYYIT
 PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWTD VAQRTLKTGE
 AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT QVQQAVEKEA
 QTPIDNLNQH YIPSLALMNT TLNFSKSPWC QKHSADKSCD LGLSMP SKLS
 IKDNGNEVSL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ GMPQAAWNI HSEQEWALLL
 KLHNVYFDLM ERTPYIARHK GTPLLQAI SN ALNPNATESK LPDISPDNKI
 LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR WTLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV
 SVSMVYQ TLE QLRSTPLSL NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR
 VVSQSVEPGC QLQ

- 25 **[0069]** En la técnica, se conocen métodos para la identificación de fitasas adecuadas, como se define en las reivindicaciones, incluidas las de especies de *Buttiauxella* (véase, p. ej., el documento de patente WO 06/043178).

C. Enzimas y componentes secundarios

- 30 **[0070]** Los métodos que se describen en el presente documento incluyen, de forma opcional, otras enzimas, incluidas, pero sin carácter limitativo, las α -amilasas, las proteasas de ácido fúngico, otras GA, otras fitasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, proteasas, pululaninas, beta amilasas, lipasas, cutinasas, pectinasas, β -glucosidasas, galactosidasas, esterases, ciclodextrina transglicosiltransferasas (CGTasas), óxidoreductasas, esterases, β -amilasas y combinaciones de las mismas. En algunos modos de realización, la enzima secundaria

es una segunda GA, incluida cualquier GA anteriormente mencionada. En algunos modos de realización, la enzima adicional es una segunda fitasa, incluida cualquier fitasa bacteriana o fúngica, tales como las anteriormente mencionadas. En los métodos de la invención, una (primera) α -amilasa está siempre presente en la etapa (a). En algunos modos de realización, la enzima adicional es una α -amilasa, tal como una α -amilasa estable en ácido que, cuando se añade en una cantidad eficaz, tiene actividad en el rango de pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0, incluido desde aproximadamente 3,5 hasta aproximadamente 6,5. Las α -amilasas que se utilizan en la presente invención incluyen, pero sin carácter limitativo, α -amilasas fúngicas o α -amilasas bacterianas. En algunos modos de realización, la α -amilasa es una α -amilasa de tipo salvaje, una variante o un fragmento de la misma, o una α -amilasa híbrida derivada de, por ejemplo, un dominio catalítico de una enzima y un dominio de unión al almidón de otra. Las α -amilasas incluyen α -amilasas estables en ácido y α -amilasas que tienen actividad hidrolizante de almidón granular (GSHE, por sus siglas en inglés).

[0071] En algunos modos de realización, las α -amilasas incluyen las que se obtienen a partir de cepas fúngicas filamentosas incluidas, pero sin carácter limitativo, las cepas tales como *Aspergillus* (p. ej., *A. niger*, *A. kawachi* y *A. oryzae*); especies de *Trichoderma*, especies de *Rhizopus*, especies de *Mucor* y especies de *Penicillium*. En algunos modos de realización, la α -amilasa se obtiene a partir de *Aspergillus kawachi* o de una cepa de *Trichoderma reesei*. En algunos modos de realización, la α -amilasa es una GSHE, tal como TrAA o AkAA. En algunos modos de realización, la α -amilasa es una enzima híbrida que comprende un fragmento derivado de las enzimas obtenidas a partir de *A. kawachi* y *A. niger*.

[0072] Otras α -amilasas útiles como enzimas secundarias incluyen las que se obtienen a partir de bacterias tales como *Bacillus* (p. ej., *B. stearothermophilus*, *B. lentus*, *B. coagulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e híbridos, mutantes y sus variantes (véanse, p. ej., los documentos U.S. Pat N.º 5,763,385, 5,824,532, 5,958,739, 6,008,026 y 6,361,809). Algunas de estas amilasas están disponibles en el mercado; por ejemplo, Novo Nordisk A/S dispone de TERMAMYL®, LIQUEZYME® SC y SUPRA®; Diversa dispone de ULTRATHIN® y Danisco US, Inc, Genencor Division. dispone de SPEZYME® FRED, SPEZYME® XTRA y GZYME® G997.

[0073] En algunos modos de realización, la enzima secundaria es una celulasa. Las celulasas son enzimas que hidrolizan celulosa (enlaces β -1, 4-D-glucano) y/o derivados de la misma, tal como celulosa hinchada de ácido fosfórico. Entre las celulasas, se encuentran exo-celobiohidrolasas (CBH), endoglucanasas (EG) y β -glucosidasas (BG) (EC3.2.191, EC3.2.1.4 y EC3.2.1.21). Entre los ejemplos de celulasas adecuadas, se encuentran, pero sin carácter limitativo, las de *Penicillium*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Cellulomonas*, *Clostridium* y *Aspergillus*. Entre las celulasas disponibles en el mercado para aplicaciones alimentarias se encuentran las β -glucanasas tales como ROVABIO® (Adisseo), NATUGRAIN® (BASF), MULTIFECT® BGL (Danisco Genencor) y ECONASE® (AB Enzymes).

[0074] En algunos modos de realización, la enzima secundaria es una xilanasas. Las xilanasas (p. ej., las endo- β -xilanasas (E.C. 3.2.1.8)) hidrolizan cadenas principales de xilano. Entre las xilanasas adecuadas, se encuentran las que se obtienen a partir de fuentes bacterianas (p. ej., *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Acidothermus*, *Microtetraspora* y *Thermomonospora*) y de fuentes fúngicas (p. ej., *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium* y *Fusarium* (véanse, p. ej., los documentos de patente EP 473 545, U.S. Pat N.º 5,612,055, WO 92/06209 y WO 97/20920). Las preparaciones que se encuentran en el mercado incluyen MULTIFECT® y FEEDTREAT® Y5 (Danisco US, Inc. Genencor Division), RONOZYME® WX (Novozymes A/S) y NATUGRAIN® WHEAT (BASF).

[0075] En algunos modos de realización, la enzima secundaria es una proteasa. En algunos modos de realización, la proteasa se obtiene a partir de *Bacillus* (p. ej., *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. licheniformis* y *B. subtilis*). Estas enzimas incluyen subtilisin (véase, p. ej., el documento de patente U.S. Pat. N.º 4,760,025). Las proteasas adecuadas que se encuentran en el mercado incluyen MULTIFECT® P 3000 (Danisco US, Inc. Genencor Division) y SUMIZYME® FP (Shin Nihon). En algunos modos de realización, la proteasa procede de una fuente fúngica (p. ej., *Trichoderma* NSP-24, *Aspergillus*, *Humicola* y *Penicillium*). En algunos modos de realización, la proteasa es una proteasa de ácido fúngico (AFP, por sus siglas en inglés), incluidas, pero sin carácter limitativo, las que se obtienen a partir de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* y *Rhizopus*, tales como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* y *M. miehei*. Las proteasas pueden obtenerse a partir de la expresión de proteínas heterólogas o endógenas de las bacterias, plantas y fuentes fúngicas. Las proteasas incluyen proteasas de tipo salvaje de origen natural, así como variantes de proteasa y proteasas mutantes creadas genéticamente, incluidas las que se describen en el documento de patente U.S. Pat. N.º 7,429,476. En algunos modos de realización, el componente secundario es al menos un organismo de fermentación.

IV. Composiciones para su utilización en los métodos de la invención

[0076] Los métodos de la invención pueden emplear una composición que comprende enzimas mezcladas o formuladas, incluida al menos una glucoamilasa y al menos una fitasa. La fitasa es una fitasa de especie de *Buttiauxella* como se define en las reivindicaciones. En modos de realización específicos, la fitasa es una fitasa BP-WT, BP-11 o BP-17.

[0077] En algunos modos de realización, la fitasa tiene una alanina en la posición 92. La fitasa puede incluir además otras mutaciones descritas en el presente documento.

[0078] En algunos modos de realización de los métodos, los componentes enzimáticos de la composición son una formulación mezclada que comprende al menos los dos componentes enzimáticos mezclados. En algunos modos de realización, las composiciones comprenden una GA y una fitasa formuladas en una formulación enzimática adecuada. En algunos modos de realización, la composición enzimática formulada produce una ratio preseleccionada específica de GA y fitasa y, opcionalmente, otras enzimas secundarias. En algunos modos de realización, los componentes enzimáticos se añaden de forma individual durante una o más etapas del proceso para producir una composición que comprende las dos enzimas. Esto puede conllevar la adición de los componentes separados de la composición progresivamente para que se mantenga una ratio o mediante la adición de los componentes simultáneamente.

[0079] En algunos modos de realización, la cantidad de fitasa utilizada oscila entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 FTU/g, incluidas aproximadamente las siguientes cantidades: 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,25, 0,28, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,1, 1,5, 1,8, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20. También pueden utilizarse cantidades de fitasa mayores. En algunos modos de realización, la cantidad de fitasa utilizada oscila entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1,0 FTU/g. En algunos modos de realización, la cantidad de fitasa utilizada es al menos aproximadamente 0,01 FTU/g, incluidas al menos aproximadamente las siguientes cantidades: 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,2, 0,25, 0,28, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8 FTU/g.

V. Métodos de utilización

[0080] Los métodos descritos utilizan una glucoamilasa en combinación con una fitasa durante la sacarificación, la fermentación y/o la SSF en procesos de conversión de almidón, lo que da lugar a un proceso que produce menos productos finales y/o productos derivados de ácido fítico que los que se producen mediante la utilización de métodos convencionales. En algunos modos de realización, el proceso da lugar a DDGS con ácido fítico reducido en comparación con los métodos convencionales. En algunos modos de realización, el proceso da lugar a etanol y produce vinaza fina con ácido fítico reducido en comparación con los métodos convencionales.

[0081] Pueden utilizarse diversos tipos de material vegetal con los presentes métodos. En algunos modos de realización, la material vegetal es grano. En algunos modos de realización, el material vegetal se obtiene a partir de trigo, maíz, centeno, sorgo (p. ej., milo), arroz, mijo, cebada, tritical, mandioca (p. ej., tapioca), patata, boniato, remolacha azucarera, caña de azúcar, y de legumbres, tales como la soja y los guisantes, así como de combinaciones de los mismos. Los materiales vegetales incluyen variedades híbridas y variedades modificadas genéticamente (p. ej., maíz, cebada o granos de soja transgénicos que comprenden genes heterólogos). Puede utilizarse cualquier parte de la planta como sustrato, incluidos, pero sin carácter limitativo, las hojas, los tallos, las vainas, las cáscaras, los tubérculos, las mazorcas, los granos y similares. En algunos modos de realización, se utiliza fundamentalmente la planta entera, por ejemplo, el rastrojo de maíz entero. En algunos modos de realización, se utiliza el grano entero como fuente de almidón granular. Entre los granos enteros, se encuentran el maíz, el trigo, el centeno, la cebada, el sorgo y combinaciones de los mismos. En otros modos de realización, el almidón granular se obtiene a partir de granos de cereales fraccionados, incluidos la fibra, el endospermo y/o componentes del germen. En la técnica, se conocen métodos para fraccionar material vegetal, tal como maíz y trigo. En algunos modos de realización, se mezcla el material vegetal obtenido a partir de distintas fuentes (p. ej., maíz y milo o maíz y cebada). El material vegetal se prepara mediante molienda, entre otros medios. Los procesos de molienda generales son la molienda en húmedo y la molienda en seco. En la molienda en seco, el grano entero se muele y se utiliza, mientras que en la molienda en húmedo, el grano se separa (p. ej., el germen de la harina). Se conocen medios de molienda de granos de cereales enteros, que incluyen la utilización de molinos de martillos y de molinos de cilindros. Se hace referencia al manual THE ALCOHOL TEXTBOOK: A REFERENCE FOR THE BEVERAGE, FUEL AND INDUSTRIAL ALCOHOL INDUSTRIES 3a ed. K.A. Jacques *et al.*, Eds, (1999) Nottingham University Press. Véanse los capítulos 2 y 4. El material vegetal que contiene un sustrato de almidón se hidroliza y/o se licua mediante la utilización de una α -amilasa para producir oligosacáridos. En algunos modos de realización, se añade una alfa α -amilasa a una suspensión de sustrato de almidón molido (p. ej., grano molido) para producir un producto de licuefacción que contiene dextrinas y/u oligosacáridos. El experto en la materia será capaz de determinar la dosis, el pH y el tiempo de contacto eficaces de α -amilasa que se han de utilizar en los procesos. El nivel de utilización óptimo en una licuefacción depende de parámetros de procesamiento tales como el tipo de material vegetal, la viscosidad, el tiempo de procesamiento, el pH, la temperatura y la ms.

VI. Sacarificación y fermentación simultáneas y secuenciales

[0082] El producto de licuefacción que contiene dextrinas y/u oligosacáridos de la licuefacción, se somete a sacarificación, fermentación y/o sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La sacarificación también reduce los azúcares en un producto de licuefacción que contiene dextrinas y/u oligosacáridos en azúcares fermentescibles. A continuación, se convierten los azúcares fermentescibles mediante microorganismos de fermentación para obtener productos finales tales como alcoholes y DDGS, que pueden recuperarse mediante la utilización de un método adecuado.

[0083] En algunos modos de realización, la sacarificación y la fermentación se producen simultáneamente, en un proceso llamado sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). En algunos modos de realización, la sacarificación y la fermentación se producen por separado. En algunos modos de realización, la composición enzimática de GA/fitasa se añade durante una etapa previa a la sacarificación, durante el proceso de sacarificación, durante el proceso de fermentación o durante el proceso de SSF.

[0084] En algunos modos de realización, el proceso de sacarificación dura entre 12 y 120 horas. Sin embargo, es habitual llevar a cabo una etapa previa a la sacarificación durante entre 30 minutos y 2 horas (incluido, por ejemplo, entre 30 y 60 minutos) y, a continuación, completar la sacarificación durante la fermentación. La sacarificación se suele llevar a cabo a temperaturas de entre 30 y 65 °C y, normalmente, a un pH de entre 4,0 y 5,0. En los casos en que se incluye una etapa previa a la sacarificación, la fitasa se añade durante la etapa previa a la sacarificación.

[0085] Cualquiera de las GA descritas en el presente documento se pueden utilizar como enzimas sacarificantes. En algunos modos de realización, las composiciones enzimáticas se añaden al principio de la etapa de sacarificación como mezcla de GA/fitasa. En otros modos de realización, la GA y la fitasa se añaden por separado. En algunos modos de realización, la GA se añade al principio de la etapa de sacarificación y la fitasa se añade más adelante, pero antes de que se complete la etapa de fermentación. En algunos modos de realización, la sacarificación y la fermentación se llevan a cabo a la vez y se añade una mezcla de GA/fitasa durante la sacarificación/fermentación simultáneas (SSF). Los azúcares fermentescibles resultantes se someten a fermentación con microorganismos de fermentación. En algunos modos de realización, la etapa de puesta en contacto y la etapa de fermentación se llevan a cabo simultáneamente en el mismo recipiente en el que tiene lugar la reacción. En otros modos de realización, estas etapas se llevan a cabo de forma secuencial. En el libro *The Alcohol Textbook 3^a ed., A Reference for the Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Industries*, Eds. Jacques *et al.*, (1999) Nottingham University Press, Reino Unido. se describen, de forma general, procesos de fermentación.

[0086] Los azúcares fermentescibles o dextrinas (p. ej., glucosa) obtenidos a partir de la sacarificación se utilizan como materia prima de fermentación en fermentaciones microbianas en condiciones adecuadas para obtener productos finales, tales como alcohol (p. ej., etanol), ácidos orgánicos (p. ej., ácido succínico, ácido láctico), polialcoholes (p. ej., glicerol), intermedios de ácido ascórbico (p. ej., gluconato, DKG, KLG) aminoácidos (p. ej., lisina) y/o proteínas (p. ej., anticuerpos y fragmentos de los mismos).

[0087] Los azúcares fermentescibles pueden fermentarse con levadura a temperaturas entre aproximadamente 15 y aproximadamente 40 °C, aproximadamente 20 y aproximadamente 38 °C e incluso aproximadamente 25 y aproximadamente 35 °C; a un rango de pH de aproximadamente 3,0 y aproximadamente 6,5; aproximadamente 3,0 y aproximadamente 6,0; aproximadamente 3,0 y aproximadamente 5,5, aproximadamente 3,5 y aproximadamente 5,0, e incluso aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5; y durante un periodo temporal de aproximadamente 5 h y aproximadamente 120 h, incluidos periodos de aproximadamente 12 y aproximadamente 120 y desde aproximadamente 24 y aproximadamente 90 horas, para producir un producto alcohólico, tal como etanol.

[0088] Las células de levadura pueden suministrarse en una cantidad de entre aproximadamente 10^4 y aproximadamente 10^{12} células o desde aproximadamente 10^7 y aproximadamente 10^{10} células de levadura viables por ml de medio de fermentación. El proceso de fermentación puede incluir la adición de materias primas, tales como nutrientes, ácidos y otras enzimas, así como de suplementos, tales como vitaminas (p. ej., biotina, ácido fólico, ácido nicotínico, riboflavina), cofactores, macronutrientes, micronutrientes y sales (p. ej., $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; K_2HPO_4 ; NaCl ; MgSO_4 H_3BO_3 ; ZnCl_2 ; y CaCl_2).

VII. Organismos de fermentación

[0089] Puede utilizarse cualquier organismo de fermentación adecuado con los presentes métodos. Entre los ejemplos de organismos de fermentación adecuados se encuentran los microorganismos etanológicos o microorganismos de producción de etanol, tales como las bacterias etanológicas que expresan alcohol deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa, que pueden obtenerse a partir de *Zymomonas mobilis* (véanse, p. ej., los documentos de patente U.S. Pat. Nos. 5,000,000, 5,028,539, 5,424,202, 5,514,583 y 5,554,520). Los microorganismos etanológicos pueden expresar xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, que son enzimas que convierten xilosa en xilulosa. De forma alternativa o adicional, se utiliza xilosa isomerasa para convertir xilosa en xilulosa. Puede utilizarse un microorganismo capaz de fermentar tanto pentosas como hexosas en

etanol. El microorganismo puede ser un microorganismo de origen natural o no creado genéticamente o un microorganismo modificado o recombinante. Los microorganismos de fermentación incluyen cepas bacterianas de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *E. coli*, *Erwinia*, *Pantoea* (p. ej., *P. citrea*), *Pseudomonas* y *Klebsiella* (p. ej., *K. oxytoca*) (véanse, p. ej. los documento de patente U.S. Pat. N.º 5,028,539 y 5,424,202, y el documento de patente WO 95/13362). El microorganismo de fermentación seleccionado depende del producto final que se produzca.

[0090] El microorganismo de producción de etanol puede ser un microorganismo fúngico, tal como una cepa de *Saccharomyces*, incluida, pero sin carácter limitativo, *S. cerevisiae* (véase, p. ej., el documento de patente U.S. Pat. N.º 4,316,956). En el mercado, hay diversas *S. cerevisiae* disponibles, incluidas, pero sin carácter limitativo, FALI® (Fleischmann's Yeast), SUPERSTART® (Alltech), FERMIOL® (DSM Specialties), RED STAR® (Lesaffre) y ANGEL ALCOHOL YEAST® (Angel Yeast Company, China).

VIII. Recuperación de alcohol, DDGS y otros productos finales

[0091] El producto final del proceso de fermentación es un alcohol (p. ej., etanol o butanol), que pueden separarse y/o purificarse de los medios de fermentación. En la técnica, se conocen métodos de separación y purificación, que incluyen métodos tales como someter los medios a extracción, destilación, cromatografía en columna, deshidratación mediante tamiz molecular o ultrafiltración. El producto final puede identificarse directamente al someter los medios a cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) o a análisis de cromatografía de gases (CG).

[0092] En los casos en que el producto final sea etanol, puede utilizarse para combustible, limpieza o síntesis química, o inyectarse como bebida. Los productos derivados de la fermentación, tales como los residuos desecados de destilería (DDG) y los residuos desecados y solubles de destilería (DDGS), pueden utilizarse como pienso para animales.

[0093] Los presentes métodos pueden reducir el contenido de ácido fítico del medio de fermentación, de la vinaza fina y/o de los productos derivados de la fermentación, tales como los residuos desecados de destilería (DDG); los residuos desecados y solubles de destilería (DDGS); residuos húmedos de destilería (DWG, por sus siglas en inglés) y residuos húmedos y solubles de destilería (DWGS, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, las composiciones y métodos pueden reducir el contenido de ácido fítico del filtrado de fermentación al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 % e incluso al menos aproximadamente un 90 % o más en comparación con, esencialmente, el mismo proceso pero sin la fitasa. La cantidad de fitasa encontrada en los DDGS puede reducirse al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % y al menos aproximadamente un 90 % en comparación con el contenido de fitato en los DDGS de un proceso correspondiente, que es esencialmente el mismo que el proceso reivindicado, pero sin una incubación de tratamiento previo de fitasa. Por ejemplo, si bien el porcentaje de contenido de fitato en las muestras comerciales de DDGS puede variar, un rango general de porcentaje de fitato oscila entre aproximadamente un 1 % y aproximadamente un 3 % o más. En comparación, el porcentaje de fitato en los DDGS obtenido mediante la utilización del presente proceso es menor que aproximadamente un 1,0 %, menor que aproximadamente un 0,8 % e incluso menor que aproximadamente un 0,5 %. Los DDGS pueden añadirse a un pienso para animales antes o después de la peletización y pueden incluir fitasa activa.

[0094] En algunos procesos de etanol industriales, se destila el etanol del filtrado, lo que da lugar a una porción de vinaza fina, que es adecuada para reciclarse en el flujo de fermentación. Mediante la utilización de las presentes composiciones y métodos, la vinaza fina tiene un contenido de ácido fítico inferior en comparación con el que se obtiene mediante la utilización de un método convencional. La reducción de ácido fítico puede ser consecuencia de la adición de fitasa durante una etapa de tratamiento previo, durante la sacarificación, durante la sacarificación/fermentación o una combinación de los mismos. La reducción del contenido de ácido fítico de la vinaza fina puede ser al menos aproximadamente de un 60 %, al menos aproximadamente de un 65 %, al menos aproximadamente de un 70 %, al menos aproximadamente de un 75 %, al menos aproximadamente de un 80 %, al menos aproximadamente de un 85 % e incluso al menos aproximadamente de un 90 % o más, en comparación con, esencialmente, el mismo proceso pero sin la fitasa. De forma similar, la cantidad de fitasa encontrada en la vinaza fina puede reducirse al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 % o incluso al menos aproximadamente un 90 % en comparación con el contenido de fitato en la vinaza fina como consecuencia de un proceso similar, de cualquier otro modo, que carece de una fitasa.

55 EJEMPLOS

[0095] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo ilustrativo, pero no limitan los métodos.

[0096] En la exposición y la sección de experimentos, que se muestran a continuación, se aplican las siguientes abreviaturas: %p/p (% en peso); °C (grados centígrados); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); dH₂O (agua desionizada, filtración Milli-Q); g o gm (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); kg (kilogramos); µL (microlitros); ml y mL (mililitros); mm (milímetros); µm (micrómetro); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); MW (peso molecular); s (segundos); min (minuto/minutos); h (hora/horas); ms (materia seca); DO (oxígeno disuelto); W/V (porcentaje en masa); W/W (peso por peso); % v (porcentaje en volumen); Genencor (Danisco US, Inc., Genencor Division, Palo Alto, California); IKA (IKA Works Inc. 2635 North Chase Parkway SE, Wilmington, Carolina del Norte); MT (tonelada métrica); Ncm (centímetro Newton); GAU (unidad de actividad de glucoamilasa); FTU (unidad de actividad de fitasa) y ETOH (etanol).

10 EJEMPLO 1: Mediciones de viscosidad

[0097] Se utilizó una cocina de vidrio -viscosímetro, LR-2.ST system, IKA, para determinar la viscosidad. En resumen, el viscosímetro consiste en un recipiente de vidrio de doble pared de 2.000 ml con un agitador tipo ancla que se remueve con un viscosímetro de control de potencia Eurostar Labortechnik. El rango de viscosidad del viscosímetro es 0-600 Ncm.

15 **[0098]** En general, se vertió una suspensión que comprende un sustrato de almidón y una cantidad adecuada de enzima en el recipiente del viscosímetro. Se registró la temperatura y la viscosidad durante el calentamiento a 85 °C y se continuó la incubación durante otros 60-120 min. Se midió la viscosidad en Ncm y se registró en intervalos.

EJEMPLO 2: Utilización de una glucoamilasa y una fitasa en fermentación de etanol

20 **[0099]** Este ejemplo muestra la eficacia de la glucoamilasa (GA) y la fitasa en la fermentación de etanol para producir DDGS y vinaza fina con un contenido inferior de fitato en comparación con el obtenido mediante la utilización de un método convencional. La GA que se utilizó fue la GA de *Trichoderma reesei* (TrGA) correspondiente a SEQ ID NO: 1 (véanse, p. ej. los documento de patente U.S. Pat N.º 7,354,752 y 7,413,887). La fitasa utilizada fue fitasa de *Buttiauxella* BP-17, correspondiente a SEQ ID NO: 8.

25 **[0100]** Las unidades de actividad de la glucoamilasa (GAU, por sus siglas en inglés) se definieron como la cantidad de enzima requerida para producir 1 g de azúcar reductor, calculado como glucosa por hora de un sustrato de almidón soluble a un pH de 4,2 y a 60 °C. El ensayo PNPG se utiliza para medir la actividad de la glucoamilasa.

30 **[0101]** La actividad de la fitasa (FTU, por sus siglas en inglés) se midió mediante la liberación de fosfato inorgánico, que forma un complejo amarillo con reactivo de vanadato/molibdato ácido, que puede medirse a una longitud de onda de 415 nm en un espectrofómetro. El fosfato inorgánico liberado se cuantificó con una curva patrón de fosfato. Una unidad de fitasa (FTU) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fosfato inorgánico de fitato por minuto en las condiciones de reacción determinadas en la norma europea (CEN/TC 327, 2005-TC327WI 003270XX).

35 **[0102]** Para medir el contenido de ácido fítico, se extrajo ácido fítico de una muestra mediante el ajuste del pH de una suspensión del 5 % (para muestras secas) a un pH del 10,0 y, a continuación, mediante la utilización de una columna de intercambio iónico HPLC para unir el ácido fítico, que se eluyó de la columna mediante la utilización de un sistema de gradiente de NaOH. El contenido de ácido fítico en el líquido se calculó mediante la comparación del ácido fítico con un patrón.

40 EJEMPLO 3: Utilización de TrGA y BP17 en fermentación de levadura - efecto en DDGS

45 **[0103]** Los DDGS (residuos desecados y solubles de destilería), un componente presente en algunos piensos para animales, que se obtiene a partir de plantas de procesamiento de etanol, contiene ácido fítico, que las especies no rumiantes como las aves, los peces y los cerdos no digieren. A continuación, el ácido fítico se descarga a través del estiércol, lo que da lugar a una contaminación de fosfato. Como se muestra en este ejemplo, la adición de una enzima hidrolizante de ácido fítico, como la fitasa, en combinación con glucoamilasa durante el proceso de sacarificación/fermentación simultáneas reduce las concentraciones de ácido fítico en los DDGS.

50 **[0104]** Se preparó un producto de licuefacción a partir de un proceso de licuefacción de almidón convencional mediante la utilización de maíz como materia prima y se congeló para su utilización en el experimento. Se descongeló el producto de licuefacción, se añadieron 200 ppm de urea y se ajustaron los sólidos a un 32,9 % de ms antes de ajustar el pH a 4,2 con ácido sulfúrico 6N. Las fermentaciones tuvieron lugar en matraces de 250 ml que contenían una alícuota de 200 gm de mezcla (es decir, la mezcla que contiene el producto de licuefacción). Se diluyeron las enzimas de modo que se añadiera 1,0 ml de cada una en la actividad designada a los matraces. Se repitió cada condición. Se inocularon los matraces mediante la adición de 1 ml de 10 % de suspensión de
55 levadura que contenía un 1 % de glucosa aproximadamente una hora antes de la utilización. Se añadió la fitasa

- BP-17 en la muestra de 1,0 ml a diferentes concentraciones de actividad (0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 3,0 y 5,0 FTU/g ms de maíz) durante la sacarificación/fermentación simultáneas. También se añadió GA de *Trichoderma* para hidrolizar las dextrinas solubles para proporcionar glucosa. Después de la fermentación, se analizaron los DDGS para observar el fósforo libre/fosfato libre. Se determinó el fosfato libre con el método colorimétrico de Fiske-Subbarow (véase, p. ej., Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925) J. Biol.Chem. 66:375-400). Se molieron las muestras en un molino analítico Tekmar y se extrajo el fosfato libre en agua mediante la adición de 1 g de muestra a un matraz aforado de 100 ml con 80 ml de agua. Se añadió una barra magnética a cada matraz y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se enrasaron los matraces con agua, se mezclaron bien y se filtraron a través de papel de filtro Whatman n.º 1. Se colocaron los matraces en un baño María a 32 °C y se mezclaron de vez en cuando. A continuación, se analizaron los filtrados para observar el fosfato de la siguiente manera. A 3,0 ml de muestra, se le añadió 1 ml de reactivo de molibdato ácido, seguido de 1 ml de reactivo reductor, y la absorbancia del color desarrollado a temperatura ambiente durante 20 minutos se midió a 660 nm. A continuación, se calculó la concentración de fosfato en las muestras a partir de una curva patrón de fosfato. Los resultados finales se calcularon como µg de fósforo por g de muestra.
- 5
- 10
- 15 **[0105]** En la figura 1, aparece un gráfico que muestra el efecto de la concentración de fitasa BP-17 durante la fermentación de levadura en las reducciones de ácido fítico. En estos experimentos, se utilizó un 32 % de maíz de grano entero que contenía un 50 % de vinaza fina a un pH de 4,2 que contenía 0,325 GAU/g ms, GC147. El gráfico muestra que la concentración de fósforo libre alcanzó un estancamiento de aproximadamente un 0,75 % de fósforo libre con la adición de aproximadamente un 0,7 % de FTU/g de fitasa. En consecuencia, las
- 20 concentraciones de ácido fítico se redujeron con la adición de una cantidad muy pequeña de fitasa, es decir, 0,1 FTU/g ms, de manera que se eliminara más de un 80 % del ácido fítico.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un alcohol que comprende:
 - a) poner en contacto una suspensión que comprende un sustrato de almidón con al menos una α -amilasa que produce oligosacáridos;
 - 5 b) poner en contacto los oligosacáridos con al menos una glucoamilasa y al menos una fitasa, donde la fitasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 5, para producir azúcares fermentescibles;
 - c) fermentar los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación para producir alcohol; y opcionalmente
 - 10 d) recuperar el alcohol y/o los residuos desecados y solubles de destilería (DDGS).
2. El método según la reivindicación 1, que comprende además elevar la temperatura por encima de la temperatura de gelatinización del sustrato de almidón después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).
3. El método según la reivindicación 1, donde el sustrato de almidón es un grano molido seleccionado del grupo que consiste en maíz, cebada, trigo, arroz, sorgo, centeno, mijo y triticale.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, donde la fitasa tiene una alanina en el aminoácido 92 y/o al menos uno de los siguientes aminoácidos: una treonina en la posición 89, una isoleucina en la posición 134, una serina en la posición 164, una lisina en la posición 176, una prolina en la posición 178, un ácido glutámico en la posición 207, una serina en la posición 209, una leucina en la posición 248, una tirosina en la posición 256, un ácido glutámico en la posición 261 y una lisina en la posición 269.
- 20 5. El método según la reivindicación 4 donde la fitasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8.
6. El método según la reivindicación 5 donde la fitasa consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 8.
- 25 7. El método según la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto los oligosacáridos con al menos otra enzima seleccionada entre una α -amilasa, una segunda glucoamilasa, una segunda fitasa, una celulasa, una pululanasa, una proteasa y una lacasa.
8. El método según la reivindicación 1 donde el alcohol es etanol.
9. Un método de reducción de ácido fítico durante la fermentación de etanol, que comprende:
 - a) poner en contacto una suspensión que comprende un sustrato de almidón con al menos una α -amilasa para producir un producto de licuefacción;
 - 30 b) poner en contacto el producto de licuefacción con al menos una glucoamilasa y al menos una fitasa, donde la fitasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:5, y donde la fitasa tiene una alanina en la posición 92, en condiciones tales que se producen azúcares fermentescibles
 - 35 c) fermentar los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación en condiciones que producen etanol y/o DDGS; y opcionalmente
 - d) recuperar el etanol y/o los DDGS.
10. El método según la reivindicación 9, que comprende además una etapa de elevar la temperatura por encima de la temperatura de licuefacción del sustrato de almidón.
- 40 11. El método según la reivindicación 9, donde la glucoamilasa proviene de un hongo filamentoso seleccionado del grupo que consiste en *Trichoderma*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus* y *Humicola*.
12. El método según la reivindicación 11, donde la *Trichoderma* es *Trichoderma reesei*.
13. El método según la reivindicación 9, donde la fitasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.
14. El método según la reivindicación 13, donde la fitasa consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8.
- 45 15. El método según la reivindicación 9, donde los DDGS comprenden fitasa activa.
16. El método según la reivindicación 15 donde, cuando se mezclan los DDGS con granos o pienso para producir un pienso para animales, la fitasa activa reduce el ácido fítico en el pienso.
17. El método según la reivindicación 9, donde el sustrato de almidón es un grano molido.

18. El método según la reivindicación 17, donde el grano molido se selecciona entre maíz, cebada, mijo, trigo, arroz, sorgo, centeno y tritical.
19. Un método de reducción de ácido fítico en DDGS, que comprende:
- 5 a) poner en contacto una suspensión que comprende un sustrato de almidón con al menos una α -amilasa para producir un producto de licuefacción;
- b) poner en contacto el producto de licuefacción con al menos una glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA) y al menos una fitasa, donde la fitasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO:5, en condiciones tales que se producen azúcares fermentescibles; y
- 10 c) fermentar los azúcares fermentescibles en presencia de un organismo de fermentación para producir etanol y/o DDGS.
20. El método según la reivindicación 19, donde la fitasa tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y tiene una alanina en el aminoácido 92.
21. El método según la reivindicación 19 donde la fitasa comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8.
- 15 22. El método según la reivindicación 21 donde la fitasa consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 8.

Contenido de fósforo libre en DDGS a partir de fitasa BP-17 con diferentes concentraciones en fermentación de levadura: método colorimétrico (método Fiske-Subbarow)

Fitasa FTU/g	Promedio %P
0	0.408
0.10	0.703
0.25	0.724
0.50	0.727
1.00	0.742
3.00	0.755
5.00	0.766

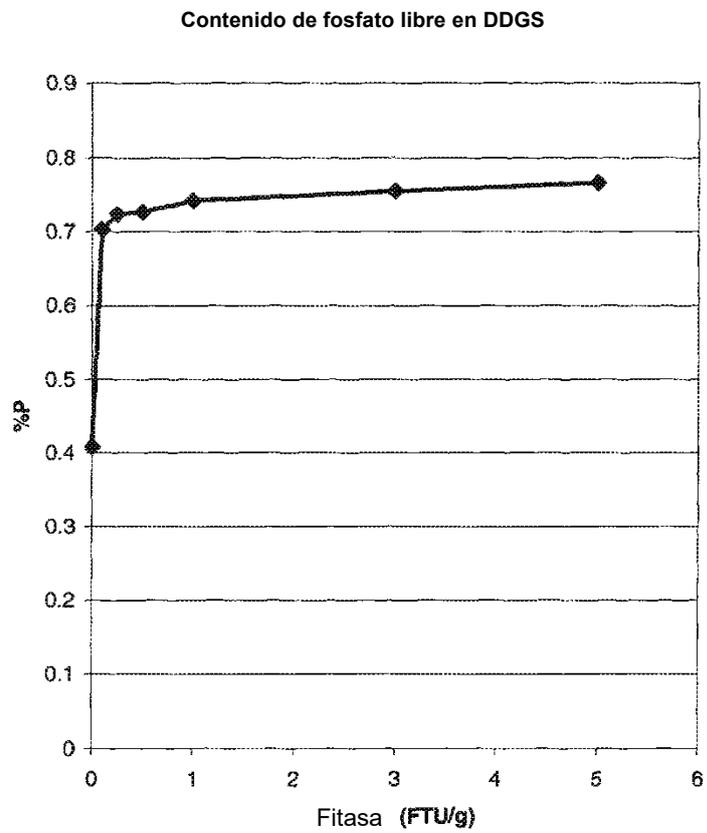


FIGURA 1