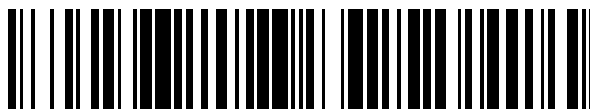


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 694**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2009** **PCT/US2009/031949**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2009** **WO09094614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009** **E 09703704 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** **EP 2245172**

54 Título: **Producción de productos de fermentación en presencia de aldehído deshidrogenasa**

30 Prioridad:

25.01.2008 US 23552 P

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

23.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SOONG, CHEE-LEONG y
LIU, JIYIN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 660 694 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

Producción de productos de fermentación en presencia de aldehído deshidrogenasa.

5 Campo técnico

[0001] La invención se refiere a procesos de producción de etanol a partir de material que contiene almidón en un medio de fermentación utilizando uno o más organismos de fermentación donde una o más enzimas aldehído deshidrogenasas se agregan al medio de fermentación.

10

Estado de la técnica

[0002] Una gran cantidad de productos comerciales que son difíciles de producir sintéticamente se producen hoy mediante organismos de fermentación. Tales productos incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂), y compuestos más complejos, que incluyen, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. La fermentación también se usa comúnmente en el alcohol para consumo (por ejemplo, cerveza y vino), productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso), cuero e industrias del tabaco.

[0003] Una gran cantidad de procesos de producción de productos de fermentación, tales como el etanol, mediante la fermentación de azúcares proporcionados por la degradación del material que contiene almidón y/o que contiene lignocelulosa se conocen en la técnica.

[0004] Sin embargo, la producción de productos de fermentación, tales como el etanol, a partir de tales materiales vegetales sigue siendo demasiado costosa. Por lo tanto, hay una necesidad para proporcionar procesos que puedan aumentar la producción del producto de fermentación y reducir así los costes de producción.

Resumen de la invención

[0005] La invención se refiere a procesos de producción de etanol a partir de material que contiene almidón en un medio de fermentación utilizando un organismo de fermentación, donde una o más aldehído deshidrogenasas seleccionadas del grupo de enzimas clasificadas en EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 y EC 1.2.1.5 se agregan al medio de fermentación, y donde el proceso comprende las etapas de:

- (a) sacarificar material que contiene almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón;
- (b) fermentación utilizando un organismo de fermentación, donde el organismo de fermentación es una levadura.

Breve descripción de las figuras

[0006]

La figura 1 es un diagrama de cómo una aldehído deshidrogenasa puede invertir el equilibrio de acetaldehído a ácido acético en un proceso de fermentación en presencia de una cantidad excesiva de ácido acético y NADH⁺.

La figura 2 demuestra el efecto de la aldehído deshidrogenasa en la producción de etanol a partir de un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas.

Descripción detallada de la invención

[0007] La fermentación de etanol es una reacción redox neutra. Sin embargo, un exceso de NAD(P)H producido durante otros procesos celulares se debe equilibrar mediante un mecanismo donde NAD(P)H se reoxida a NAD(P)⁺ para evitar el desequilibrio en la proporción NAD(P)⁺/NAD(P)H. La presencia de una cantidad excesiva de ácido acético y NAD(P)H puede promover una reacción inversa que genera acetaldehído, que se puede convertir luego a etanol (véase la Fig. 1). Así, la presencia/adición de aldehído deshidrogenasa en un proceso de fermentación puede presentar diferentes efectos positivos que incluyen 1) regenerar NAD(P)⁺ y aumentar la producción de producto de fermentación (por ejemplo, etanol), y 2) crecimiento mejorado del organismo de fermentación (por ejemplo, levadura).

[0008] Consecuentemente, la invención se refiere a procesos de producción de etanol a partir de material que contiene almidón en un medio de fermentación utilizando un organismo de fermentación, donde una o más

aldehído deshidrogenasas seleccionadas del grupo de enzimas clasificadas en EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 y EC 1.2.1.5 se agregan al medio de fermentación, y donde el proceso comprende las etapas de:

- (a) sacarificación del material que contiene almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón;
- (b) fermentación utilizando un organismo de fermentación, donde el organismo de fermentación es una levadura. La aldehído deshidrogenasa puede proceder de una fuente exógena, y/o se puede producir, por ejemplo, *in situ* mediante la sobreexpresión de aldehído deshidrogenasa por el(los) organismo(s) de fermentación. Esto último se puede conseguir mediante la preparación de organismos de fermentación modificados, tales como levadura, que son capaces de expresar ALDH, por ejemplo, transformando la levadura con uno o más genes que codifican ALDH o introduciendo un promotor que aumenta la expresión del gen ALDH endógeno. Las técnicas para introducir genes ALDH en organismos de fermentación, tales como levadura, y/o sobreexpresar genes ALDH en organismos de fermentación se conocen en la técnica. La aldehído deshidrogenasa también puede estar presente/se puede introducir en el medio de fermentación en forma de material vegetal transgénico que contiene y/o expresa aldehído deshidrogenasa.

Aldehído deshidrogenasas (ALDH)

[0009] Según la invención, la aldehído deshidrogenasa (ALDH) seleccionada del grupo de enzimas clasificadas en EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 y EC 1.2.1.5 puede ser cualquier aldehído deshidrogenasa única, o combinación de dos de más ALDH, de cualquier origen, tal como origen mamífero o microbiano, tal como origen bacteriano o fúngico. En una forma de realización preferida, la ALDH es de origen fúngico, preferiblemente de origen de levadura. En una forma de realización preferida, la ALDH se deriva de una cepa de *Saccharomyces*, tal como una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0010] Las ALDH son enzimas clasificadas en EC 1.2.1.3 (Aldehído deshidrogenasa (NAD(+)); EC 1.2.1.4 Aldehído deshidrogenasa (NADP(+)); y EC 1.2.1.5 Aldehído deshidrogenasa (NAD(P)(+)). Las clases EC se basan en recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). La descripción de las clases EC se puede encontrar en internet, por ejemplo, en "expasy.org/enzyme/". Las ALDH son enzimas que catalizan las siguientes reacciones:

EC 1.2.1.3: Un aldehído + NAD(+) + H₂O $\rightleftharpoons$ un ácido + NADH
EC 1.2.1.4: Un aldehído + NADP(+) + H₂O $\rightleftharpoons$ un ácido + NADPH
EC 1.2.1.5: Un aldehído + NAD(P)(+) + H₂O $\rightleftharpoons$ un ácido + NAD(P)H

[0011] Existen múltiples formas en mamíferos en el citosol, las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Se clasifican como clase 1 (citósolicas), clase 2 (mitocondriales) y clase 3 (tumor y otras isoenzimas).

[0012] En una forma de realización de la invención, la ALDH se clasifica como EC 1.2.1.3.

[0013] En una forma de realización de la invención, la ALDH se clasifica como EC 1.2.1.4. En una forma de realización de la invención, la ALDH se clasifica como EC 1.2.1.5. En una forma de realización de la invención, la ALDH es una ALDH de clase 1. En una forma de realización, la ALDH es una ALDH de clase 2. En una forma de realización, la ALDH es una ALDH de clase 3. Ejemplos de ALDH se pueden encontrar en las siguientes referencias:

Saigal *et al.*, 1991, J. Bacteriology 173(10): 3199-3208, se refiere a la clonación del gen ALDH mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae*.
Farres *et al.* (1989) divulga la estructura primaria de ALDH mitocondrial de hígado bovino y de rata.
Guan *et al.* (1990) divulga la secuencia de ALDH mitocondrial de hígado bovino precursora.
Hsu *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:3771-3775 divulga la clonación de ADNc para ALDH 1 y 2 humana.
Jones *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85:1782-1786 se refiere a la clonación y la secuencia completa de nucleótidos de un ADNc de longitud total que codifica una ALDH asociada a un tumor funcional catalíticamente.
Hempel *et al.*, 1984, Eur. J. Biochem. 141:21-25, divulga la estructura primaria de ALDH de hígado humano.
Johansson *et al.*, 1988, Eur. J. Biochem. 172:527-533, se refiere a ALDH mitocondrial de hígado de caballo.
Las ALDH disponibles comercialmente incluyen una de *Saccharomyces cerevisiae* disponible de SIGMA, EE.UU. (producto # A6338).

Medio de fermentación

[0014] La frase "medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al ambiente donde se realiza la fermentación y comprende el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidrato que se metaboliza mediante el(los) organismo(s) de fermentación, y puede incluir el(los) organismo(s) de fermentación.

[0015] El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el(los) organismo(s) de fermentación. El nutriente y los estimuladores de crecimiento se usan ampliamente en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.

[0016] Después de la fermentación, los medios de fermentación o el medio de fermentación puede(n) comprender además el producto de fermentación.

Organismo de fermentación

[0017] El término "organismo de fermentación" se refiere a levadura adecuada para producir etanol. El organismo de fermentación puede ser organismos de fermentación de C6 o C5, o una combinación de los mismos. Ambos organismos de fermentación de C6 y C5 se conocen en la técnica.

[0018] Los organismos de fermentación adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir azúcares fermentables, tales como glucosa, fructosa maltosa, xilosa, manosa o arabinosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

[0019] La levadura preferida incluye cepas del género *Saccharomyces*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis* tal como *Pichia stipitis* CBS 5773 o *Pichia pastoris*; una cepa del género *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida arabinofementans*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, o *Candida boidinii*.

Otros organismos de fermentación incluyen cepas de *Hansenula*, en particular *Hansenula polymorpha* o *Hansenula anomala*; *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces fragilis* o *Kluyveromyces marxianus*; y *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*.

[0020] En una forma de realización, el organismo de fermentación es una cepa de fermentación de azúcar C6 de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0021] En una forma de realización, la levadura se adiciona al medio de fermentación de modo que el recuento de levadura viable por mL de medio de fermentación esté en el rango de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , especialmente de aproximadamente 5×10^7 .

[0022] La levadura es el organismo de fermentación para la fermentación del etanol. Las cepas preferidas son las de *Saccharomyces*, especialmente cepas de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que son resistentes hacia niveles altos de etanol, es decir, hasta, por ejemplo, aproximadamente etanol de 10, 12, 15 o 20 % vol. o más.

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

[0024] Según la invención, el organismo de fermentación capaz de producir un producto de fermentación deseado a partir de azúcares fermentables, que incluyen glucosa, fructosa maltosa, xilosa, manosa o arabinosa, se cultiva preferiblemente bajo condiciones precisas a un índice de crecimiento particular. Cuando el organismo de fermentación se introduce/se añade al medio de fermentación, el organismo de fermentación inoculado pasa a través de un número de etapas. Inicialmente no ocurre crecimiento. A este periodo se hace referencia como "fase de latencia" y se puede considerar un periodo de adaptación. Durante la fase siguiente referida como "fase exponencial", el ritmo de crecimiento aumenta gradualmente. Después de un periodo de crecimiento máximo, el ritmo cesa y el organismo de fermentación entra en la "fase estacionaria". Después de un periodo de tiempo adicional, el organismo de fermentación entra en la "fase de declinación", donde el número de células viables se reduce.

[0025] En una forma de realización, la aldehído deshidrogenasa se añade al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase de latencia.

[0026] En otra forma de realización, la aldehído deshidrogenasa se añade al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase exponencial.

[0027] En otra forma de realización, aldehído deshidrogenasa se añade al medio de fermentación cuando el organismo de fermentación está en la fase estacionaria.

Productos de fermentación

[0028] El producto de fermentación es etanol. El etanol se puede usar preferiblemente como combustible. Sin embargo, el etanol también se puede usar como etanol potable.

5 Fermentación

[0029] El material de partida vegetal usado en los procesos de la invención es material que contiene almidón. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de fermentación adecuadas. La fermentación puede efectuarse según la invención en condiciones usadas de forma convencional. Los procesos de fermentación preferidos son procesos anaeróbicos.

[0030] Los procesos de la invención se pueden realizar como un proceso por lotes o como un proceso continuo. Las fermentaciones de la invención se pueden conducir en un sistema de ultrafiltración donde la parte retenida se somete a recirculación en presencia de sólidos, agua y el organismo de fermentación, y donde el permeado es líquido que contiene el producto de fermentación deseado. Igualmente se contemplan procesos conducidos en reactores de membrana continuos con membranas de ultrafiltración y donde la parte retenida se somete a recirculación en la presencia de sólidos, agua y el(los) organismo(s) de fermentación y donde el permeado es líquido que contiene el producto de fermentación.

[0031] Después de la fermentación, el organismo de fermentación se puede separar de la mezcla fermentada y reciclarse.

Fermentación de azúcares derivados del almidón

[0032] Las fermentaciones se realizan de forma convencional usando levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, como organismo de fermentación. Ejemplos de organismos de fermentación adecuados se pueden encontrar en la sección "Organismos de fermentación" anterior.

[0033] Para producir etanol usando levadura, la fermentación puede, en una forma de realización, continuar durante de 24 a 96 horas, en particular durante de 35 a 60 horas. En una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura de entre 20 y 40°C, preferiblemente entre 26 y 34°C, en particular alrededor de 32 °C. En una forma de realización, el pH es de 3 a 6, preferiblemente alrededor de pH de 4 a 5.

[0034] Las fermentaciones se realizan típicamente en un rango de pH de entre 3 y 7, preferiblemente de pH de 3,5 a 6, tal como alrededor de pH 5. Las fermentaciones continúan típicamente durante 24-96 horas.

Recuperación

[0035] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. El medio de fermentación se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado se puede extraer del medio de fermentación mediante técnicas de microfiltración o filtración con membranas.

Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por separación física. Los métodos de recuperación se conocen en la técnica.

Producción de productos de fermentación a partir de material que contiene almidón

Procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón no gelatinizado

[0036] La invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón sin gelatinización (frecuentemente referido como "sin cocción") del material que contiene almidón. Según la invención, el etanol se puede producir sin licuefacción de la mezcla acuosa que contiene el material que contiene almidón. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye la sacarificación de material (por ejemplo, molido) que contiene almidón, por ejemplo, almidón granulado, por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, preferiblemente en presencia de alfa-amilasa y/o enzima(s) que genera(n) fuentes de carbohidratos para producir azúcares que se pueden fermentar en el producto de fermentación deseado con un organismo de fermentación adecuado.

[0037] En una forma de realización de la invención, el etanol se produce a partir de granos de cereal no gelatinizados (es decir, sin cocción), preferiblemente molidos, tales como maíz.

[0038] Por consiguiente, en este aspecto, la invención se refiere a procesos de producción de etanol a partir de material que contiene almidón en un medio de fermentación utilizando un organismo de fermentación, donde una o más aldehído deshidrogenasas seleccionadas del grupo de enzimas clasificadas en EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 y EC 1.2.1.5 se agregan al medio de fermentación, y donde el proceso comprende las etapas de:

- (a) sacarificación del material que contiene almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón;
- (b) fermentación utilizando uno o más organismos de fermentación, donde el organismo de fermentación es una levadura.

5

[0039] En una forma de realización preferida, las etapas (a) y (b) se realizan simultáneamente (es decir, fermentación en una etapa) o consecutivamente.

10

[0040] El etanol se puede recuperar opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, mediante destilación. Materiales de partida que contienen almidón adecuados se enumeran en la sección "Materiales que contienen almidón". Las enzimas contempladas se enumeran a continuación en la sección "Enzimas". Típicamente, la(s) amilasa(s), tales como la(s) glucoamilasa(s) y/o otras enzimas que generan fuentes de carbohidratos y/o alfa-amilasa(s), están presentes durante la fermentación.

15

[0041] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima a la que comienza la gelatinización de almidón. En general, el almidón calentado en agua empieza a gelatinizarse entre aproximadamente 50 °C y 75 °C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y se puede determinar fácilmente por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie vegetal, la variedad particular de las especies vegetales, así como con las condiciones de cultivo. En el contexto de la presente invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón determinado se puede determinar como la temperatura en la que la birrefringencia se pierde en 5 % de los gránulos de almidón utilizando el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., 1992, Starch/Stärke 44 (12): 461-466.

20

25

[0042] Antes de la etapa (a), se puede preparar una mezcla de material que contiene almidón, tal como almidón granulado, con 10-55 % en peso de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 % en peso de sólidos secos, más preferiblemente 30-40 % en peso de sólidos secos del material que contiene almidón. La mezcla puede incluir agua y/o aguas de proceso, tales como vinaza (backset), agua de lavado, condensado o destilado de evaporador, agua de decapante secundario de destilación, o aguas de proceso de otras plantas de productos de fermentación. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización inicial y así no tiene lugar ningún aumento de viscosidad significativo, se pueden utilizar niveles altos de vinaza si se desea. En una forma de realización, la mezcla acuosa contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 % vol., preferiblemente de 15-60 % vol., especialmente de aproximadamente 30 a 50 % vol. de agua y/o aguas de proceso, tales como vinaza (backset), agua de lavado, condensado o destilado de evaporador, agua de decapante secundario de destilación, o aguas de proceso de otras plantas de productos de fermentación, o combinaciones de los mismos, o similar.

30

35

40

[0043] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de las partículas, preferiblemente mediante molienda en seco o húmedo, a 0,05-3,0 mm, preferiblemente a 0,1-0,5 mm. Después de someterse a un método o proceso de la invención, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o preferiblemente al menos el 99 % de los sólidos secos en el material que contiene almidón se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

45

50

[0044] El proceso de este aspecto de la invención se conduce a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Cuando la etapa (a) se realiza de forma separada de la etapa de fermentación (b), la temperatura se extiende típicamente en el rango de entre 30-75 °C, preferiblemente en el rango de 45-60 °C. La posterior etapa de fermentación separada (b) se realiza entonces a una temperatura adecuada para el organismo de fermentación, que está típicamente en el rango de entre 25-40 °C cuando el organismo de fermentación es levadura.

55

[0045] En una forma de realización preferida, la etapa (a) y la etapa (b) se realizan como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. En tal forma de realización, el proceso se realiza típicamente a una temperatura de entre 25 °C y 40 °C, tal como de entre 29 °C y 35 °C, tal como de entre 30 °C y 34 °C, tal como de alrededor de 32 °C, cuando el organismo de fermentación es levadura. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué condiciones del proceso son adecuadas.

60

65

[0046] En una forma de realización, la fermentación se realiza de modo que el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se mantenga a un nivel bajo, tal como por debajo de 6 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 3 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 2 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 1 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0,5 % en peso, o por debajo de 0,25 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0,1 % en peso. Tales bajos niveles de azúcar se pueden conseguir utilizando sencillamente cantidades ajustadas de enzima y organismo de fermentación. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente qué dosis/cantidades de enzima y organismo de fermentación usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo de fermentación también se pueden seleccionar para

mantener bajas concentraciones de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener por debajo de aproximadamente 0,5 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0,2 % en peso.

- 5 [0047] El proceso de la invención se puede realizar a un pH de aproximadamente 3 y 7, preferiblemente de pH 3,5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

Materiales que contienen almidón

- 10 [0048] Cualquier material de partida que contiene almidón adecuado, incluido el almidón granulado (almidón crudo sin cocción), se puede utilizar según la presente invención. El material de partida se selecciona generalmente basado en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales de partida que contienen almidón adecuados para usar en los métodos o procesos de la presente invención incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos integrales, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, sorgo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, 15 guisantes de arroz, alubias, o patatas dulces, o mezclas de los mismos, o cereales. También se contemplan tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

- [0049] El término "almidón granular" significa almidón sin cocción crudo, es decir, almidón en su forma natural encontrada en el cereal, los tubérculos o los granos. El almidón se forma dentro de células vegetales como 20 gránulos diminutos insolubles en agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta de 50 °C a 75 °C, la inflamación puede ser reversible. Sin embargo, con temperaturas más altas empieza una inflamación irreversible llamada "gelatinización". El almidón granulado que se va a procesar puede ser un almidón de calidad altamente refinado, preferiblemente al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 % o al menos 99,5 % puro, o puede ser un material 25 que contiene almidón más crudo que comprende (por ejemplo, molidos) granos integrales con fracciones no amiláceas tales como residuos germinales y fibras. La materia prima, tal como los granos integrales, puede tener tamaño de partículas reducido, por ejemplo, mediante molienda, para abrir la estructura y permitir tratamiento adicional. Dos procesos se prefieren según la invención: molienda en seco y húmedo. En la molienda en seco, se muelen y se usan granos integrales. La molienda en húmedo proporciona una buena separación de germen y 30 sémola (gránulos de almidón y proteína) y se aplica frecuentemente en situaciones donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de, por ejemplo, jarabes. Tanto la molienda en seco como en húmedo son muy conocidas en la técnica del tratamiento del almidón y se contemplan por igual para un proceso de la invención. En una forma de realización, el tamaño de las partículas se reduce a entre 0,05-3,0 mm, preferiblemente a 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 70 %, aún más preferiblemente al menos el 90 % del material que contiene almidón quepa a través de un tamiz 35 con un filtro de 0,05-3,0 mm, preferiblemente un filtro de 0,1-0,5 mm.

Enzimas

- 40 [0050] Aunque no se menciona específicamente en el contexto de un método o proceso de la invención, debe entenderse que la(s) enzima(s) se usa(n) en una "cantidad efectiva".

Alfa-amilasa

- 45 [0051] Según la invención, cualquier alfa-amilasa se puede ser utilizar, tales como de origen fúngico, bacteriano o vegetal. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa fúngica ácida o alfa-amilasa bacteriana ácida. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que adicionada en una cantidad eficaz tiene actividad óptima con un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

50

Alfa-amilasa bacteriana

[0052] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana se deriva preferiblemente del género *Bacillus*.

- 55 [0053] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otras especies de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEQ ID N°: 4 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* SEQ ID N°: 5 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la 60 SEQ ID N°: 3 en WO 99/19467. En una forma de realización, la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos el 60 %, preferiblemente de al menos el 70 %, más preferido de al menos el 80 %, aún más preferido de al menos el 90 %, tal como de al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % con cualquiera de las secuencias mostradas en las SEQ ID N°: 1, 2 o 3, respectivamente, en WO 99/19467.

65

[0054] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o un híbrido, especialmente una/uno que se describa en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente se describen en las patentes de EE.UU. N° 6,093,562, 6,297,038 o la patente de EE.UU. N° 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) que tienen una delección de uno o dos aminoácidos en las posiciones de R179 a G182, preferiblemente una delección doble descrita en WO 1996/023873 - véase, por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta (181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa de tipo salvaje BSG establecida en la SEQ ID N° :3 descrita en WO 99/19467 o delección de los aminoácidos R179 y G180 usando la SEQ ID N°: 3 en WO 99/19467 para la numeración. Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una delección doble que corresponde con delta (181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denominada 1181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa de tipo salvaje BSG expuesta en la SEQ ID N°: 3 descrita en WO 99/19467.

Alfa-amilasa híbrida bacteriana

[0055] Una alfa-amilasa híbrida contemplada específicamente comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEQ ID N°: 4 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en la SEQ ID N°: 5 de WO 99/19467), con una o más, especialmente todas, de las siguientes sustituciones:

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

[0056] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se dosifica en una cantidad de 0,0005-5 KNU por g DS (sólidos secos), preferiblemente de 0,001-1 KNU por g DS, tal como aproximadamente de 0,050 KNU por g DS.

Alfa-amilasa fúngica

[0057] Las alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas a partir de una cepa del género *Aspergillus*, tales como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus kawachii*.

[0058] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que se deriva de una cepa de *Aspergillus oryzae*. Según la presente invención, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una identidad elevada, es decir, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 100 % de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N°: 10 en WO 96/23874.

[0059] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *Aspergillus niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el número de registro primario P56271 y descrita en WO 89/01969 (Ejemplo 3. Una alfa-amilasa fúngica de ácido disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca)).

[0060] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas incluyen aquellas derivadas a partir de una cepa de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178) o *Meripilus giganteus*.

[0061] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y se describe por Kaneko *et al.*, 1996, J. Ferment. Bioeng. 81: 292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL: #AB008370.

[0062] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un dominio de unión a almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, no híbrido), o una variante de los mismos. En una forma de realización, la alfa-amilasa de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-amilasa híbrida fúngica

[0063] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las que se describen en WO 2005/003311 o en la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0054071 (Novozymes) o WO 2006/069290 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de unión a

carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión a almidón, y un conector opcional.

[0064] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen las que se describen en las tablas 1 a 5 de los ejemplos en WO 2006/069290, que incluyen variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N°: 100 en US 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con conector AMG de *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID N°: 101 en US 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con conector de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD (que se describe en la tabla 5 como una combinación de las secuencias de aminoácidos SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 72 y SEQ ID N°: 96 en la solicitud de EE.UU. n° 11/316,535) o como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290, y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con conector de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID N°: 102 en WO 2006/069290). Otras alfa-amilasas híbridas contempladas específicamente son cualquiera de las que se enumeran en las tablas 3, 4, 5, y 6 en el ejemplo 4 de la solicitud de EE.UU. N° 11/316,535 y WO 2006/069290.

[0065] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen las que se describen en la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0054071, incluidas las que se divulgan en la tabla 3 en la página 15, tales como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con conector de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión a almidón.

[0066] También se contemplan las alfa-amilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las alfa-amilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 100 % de identidad con las secuencias enzimáticas maduras.

[0067] Unas alfa-amilasas ácidas se pueden adicionar según la invención en una cantidad de 0,001 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente de 0,01 a 5 AFAU/g DS, especialmente de 0,3 a 2 AFAU/g DS o de 0,001 a 1 FAU-F/g DS, preferiblemente de 0,01 a 1 FAU-F/g DS.

Productos de alfa-amilasa comercial

[0068] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X, LIQUOZYME™ SC y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

Enzima que genera fuentes de carbohidratos

[0069] El término "enzima que genera fuentes de carbohidratos" incluye glucoamilasa (que son generadores de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (que son generadores de maltosa) y también pululanasa y alfa-glucosidasa. Una enzima que genera fuentes de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como una fuente de energía por el(los) organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como el etanol. El carbohidrato generado se puede convertir directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención, se puede utilizar una mezcla de enzimas que generan fuentes de carbohidratos. Las mezclas esencialmente contempladas son mezclas que comprenden al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, aún más preferido una alfa-amilasa fúngica ácida.

[0070] La proporción entre la actividad de la actividad de glucoamilasa (AGU) y la actividad de la alfa-amilasa fúngica ácida (FAU-F) (es decir, AGU por FAU-F) puede ser, en una forma de realización preferida de la invención, de entre 0,1 y 100 AGU/FAU-F, en particular de entre 2 y 50 AGU/FAU-F, tal como en el rango de 10-40 AGU/FAU-F, especialmente cuando se hace una fermentación en una etapa (hidrólisis de almidón crudo - RSH), es decir, cuando la sacarificación en la etapa (a) y la fermentación en la etapa (b) se realizan simultáneamente (es decir, sin una etapa de licuefacción).

[0071] En un proceso de almidón a etanol convencional (es decir, con una etapa de licuefacción (a)), la proporción puede preferiblemente ser tal y como se define en EP 140,410-B1, especialmente cuando la sacarificación en la etapa ii) y la fermentación en la etapa iii) se realizan simultáneamente.

Glucoamilasa

[0072] Una glucoamilasa usada según la invención se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivarse a partir 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 de *Aspergillus niger* G1 o G2 (Boel *et al.*, 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102), o variantes de la misma, tales como las que se describen en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (1991, Agric. Biol. Chem. 55(4): 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen *et al.*, 1996, Prot. Eng. 9: 499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al.*, 1995, Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen *et al.*, 1994, Biochem. J. 301: 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe *et al.*, 1996, Biochemistry 35: 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li *et al.*, 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204.

[0073] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (denominado previamente *Corticium rolfsii*) (véase la patente de EE.UU. Nº 4,727,026 y (Nagasaka, Y. *et al.*, 1998, "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE.UU. Nº Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente de EE.UU. Nº 4,587,215).

[0074] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas a partir del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) y *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea*; y *Leucopaxillus giganteus* todas descritas en WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* descrita en PCT/US2007/066618; o una mezcla del mismo. También se contemplan glucoamilasas híbridas según la invención. Ejemplos de glucoamilasas híbridas se describen en WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en la tabla 1 y 4 del ejemplo 1.

[0075] También se contemplan glucoamilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas mencionadas anteriormente, es decir, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 100 % de identidad con las secuencias enzimáticas maduras mencionadas anteriormente.

[0076] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SANTM SUPER, SANTM EXTRA L, SPIRIZYMETM PLUS, SPIRIZYMETM FUEL, SPIRIZYMETM B4U, SPIRIZYME ULTRATM y AMGTM E (de Novozymes A/S, Dinamarca); OPTIDEXTM 300, GC480TM y GC147TM (de Genencor Int., EE.UU.); AMIGASETM y AMIGASETM PLUS (de DSM); G-ZYMETM G900, G-ZYMETM y G990 ZR (de Genencor Int.).

[0077] Las glucoamilasas se pueden adicionar, en una forma de realización, en una cantidad de 0,02-20 AGU/g DS, preferiblemente de 0,1-10 AGU/g DS, especialmente de entre 1-5 AGU/g DS, tal como de 0,1-2 AGU/g DS, tal como 0,5 AGU/g DS o en una cantidad de 0,0001-20 AGU/g DS, preferiblemente de 0,001-10 AGU/g DS, especialmente de entre 0,01-5 AGU/g DS, tal como de 0,1-2 AGU/g DS.

Beta-amilasa

[0078] Una beta-amilasa (E.C 3,2,1,2) es el nombre dado tradicionalmente a las amilasas maltogénicas que actúan como exo, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glicosídicos en la amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relativos. Las unidades de maltosa se quitan sucesivamente de los extremos de cadena no reductora de una manera gradual hasta que la molécula se degrada o, en el caso de la amilopectina, hasta que se alcanza un punto de ramificación. La maltosa liberada tiene la configuración beta anomérica, de ahí el nombre de beta-amilasa.

[0079] Las beta-amilasas se han aislado a partir de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty y C.T. Kelly, 1979, Progress in Industrial Microbiology 15: 112-115). Estas beta-amilasas se caracterizan por tener temperaturas óptimas en el rango de 40 °C a 65 °C y pH óptimo en el rango de 4,5 a 7. Una beta-amilasa disponible comercialmente a partir de cebada es NOVOZYMETM WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYMETM BBA 1500 de Genencor Int., EE.UU.

Amilasa maltogénica

[0080] 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 a maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está disponible comercialmente de Novozymes A/S. Las alfa-amilasas maltogénicas se describen en las patentes de EE.UU. Nº. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

[0081] La amilasa maltogénica se puede adicionar, en una forma de realización preferida, en una cantidad de 0,05-5 mg DS proteína/gramo total o 0,05-5 MANU/g DS.

Proteasas

[0082] Una proteasa se puede adicionar durante la hidrólisis y la fermentación simultáneas. La proteasa puede ser cualquier proteasa. En una forma de realización preferida, la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen fúngico o bacteriano. Se prefiere una proteasa fúngica ácida, pero también se pueden usar otras proteasas.

[0083] Proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

[0084] Las proteasas fúngicas ácidas contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Se contemplan especialmente las proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (véase, por ejemplo, Koaze *et al.*, 1964, Agr. Biol. Chem. Japón 28: 216), *Aspergillus saitoi* (véase, por ejemplo, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japón 28: 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida *et al.*, 1977, Agric. Biol. Chem. 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*, como la proteasa pepA; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

[0085] También se contemplan proteasas neutras o alcalinas, tales como una proteasa derivada a partir de una cepa de *Bacillus*. Una proteasa particular contemplada para la invención se deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible en Swissprot como N° de registro P06832. También se contemplan las proteasas con al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos obtenible en Swissprot como N° de registro P06832 tal como al menos el 92 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o particularmente al menos el 99 % de identidad.

[0086] Además se contemplan las proteasas con al menos el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos descrita como SEQ ID N°:1 en WO 2003/048353 tal como el 92 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, o particularmente al menos el 99 % de identidad.

[0087] También se contemplan proteasas de tipo papaína tales como las proteasas de E.C. 3,4,22.* (proteasa de cisteína), tal como EC 3,4,22,2 (papaína), EC 3,4,22,6 (quimopapaína), EC 3,4,22,7 (asclepaína), EC 3,4,22,14 (actinidaína), EC 3,4,22,15 (catepsina L), EC 3,4,22,25 (glicil endopeptidasa) y EC 3,4,22,30 (caricaína).

[0088] En una forma de realización, la proteasa es una preparación de proteasa derivada a partir de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización, la proteasa se deriva de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor miehei*. En otra forma de realización contemplada, la proteasa es una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada a partir de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, y una proteasa derivada a partir de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor miehei*.

[0089] Las proteasas ácidas aspárticas se describen en, por ejemplo, Hand-book of Proteolytic Enzymes, editado por A.J. Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Aca-demic Press, San Diego, 1998, capítulo 270). Ejemplos adecuados de proteasa ácida aspártica incluyen, por ejemplo, las que se describen en R.M. Berka *et al.*, 1990, Gene 96: 313; R.M. Berka *et al.*, 1993, Gene 125: 195-198; y Gomi *et al.*, 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

[0090] Los productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE[®], ESPERASE[™], FLAVOURZYME[™], PROMIX[™], NEUTRASE[®], RENNILASE[®], NOVOZYM[™] FM 2.0L, y NOVOZYM[™] 50006 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106[™] y SPEZYME[™] FAN de Genencor Int., Inc., EE.UU.

[0091] La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001-1 mg de proteína enzimática por g DS, preferiblemente de 0,001 a 0,1 mg de proteína enzimática por g DS. Alternativamente, la proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001 a 1 LAPU/g DS, preferiblemente de 0,001 a 0,1 LAPU/g DS y/o 0,0001 a 1 mAU-RH/g DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 mAU-RH/g DS.

Materiales y métodos

Métodos:

Identidad

[0092] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias polinucleótidas se describe mediante el parámetro "identidad".

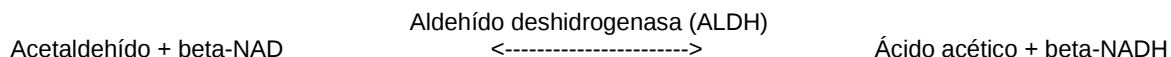
[0093] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina con el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) utilizando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineamiento por pares son Ktuple = 1, penalización de espacio = 3, ventanas = 5, y diagonales = 5.

[0094] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias polinucleótidas se determina con el método Wilbur-Lipman (Wilbur y Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science EE.UU. 80: 726-730) utilizando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiple: penalización de espacio de 10 y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineamiento por pares son Ktuple = 3, penalización de espacio = 3, y ventanas = 20.

Ensayo enzimático SIGMA para aldehído deshidrogenasa

Principio

[0095]



Abreviaturas usadas:

[0096]

Beta-NAD = dinucleótido de beta-nicotinamida y adenina, forma oxidada
 Beta-NADH = dinucleótido de beta-nicotinamida y adenina, forma reducida
 Condiciones: T = 25 °C, pH = 8,0, A₃₄₀ nm, trayecto de luz = 1 cm
 Método: determinación continua del índice espectrofotométrico.

[0097] Una descripción más detallada del ensayo (SPACE05 revisado: 08/30-96) se puede encontrar en el sitio web de Sigma™ con la información del producto del producto ALDH (producto # A6338). Alternativamente el ensayo está disponible previa petición a Novozymes A/S, Dinamarca. La descripción del ensayo se incluye en el presente documento por referencia.

Actividad de la glucoamilasa

[0098] La actividad de la glucoamilasa se puede medir en unidades de glucoamilasa (AGU).

Actividad de la glucoamilasa (AGU)

[0099] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar de 37 °C, pH 4,3, sustrato: 23,2 mM de maltosa, tampón: 0,1 M de acetato, tiempo de reacción 5 minutos.

[0100] Se puede utilizar un sistema autoanalizador. Se añade mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se vuelva 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.

Incubación AMG:	
Sustrato:	23,2 mM de maltosa
Tampón:	0,1 M de acetato
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37 °C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Rango de trabajo enzimático:	0,5-4,0 AGU/mL

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

Tampón:	0,12 M de fosfato; 0,15 M de NaCl
pH:	7,60 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37 °C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

[0101] Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa petición a Novozymes A/S, Dinamarca, carpeta que se incluye en el presente documento por referencia.

5 Actividad de la alfa-amilasa (KNU)

10 [0102] La actividad de la alfa-amilasa 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 a la reacción le sigue la mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se hace más débil y se vuelve gradualmente de un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

[0103] Una unidad Kilo Novo de alfa-amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37 °C +/- 0,05; 0,0003 M de Ca²⁺; y pH 5,6) dextrina 5260 mg de sustancia seca de almidón de almidón soluble de Merck.

[0104] Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa petición a Novozymes A/S, Dinamarca, carpeta que se incluye en el presente documento por referencia.

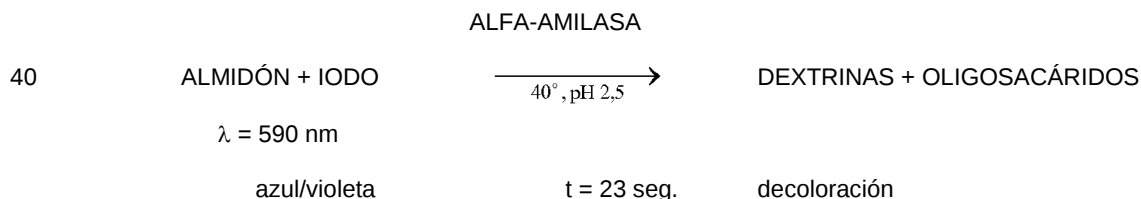
20 Actividad de la alfa-amilasa ácida

[0105] Cuando se usa según la presente invención, la actividad de una alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida) o FAU-F.

25 Actividad de la alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0106] La actividad de la alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan en relación con un estándar enzimático. 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5.260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándar mencionadas a continuación.

[0107] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, E.C. 3,2,1,1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes. La intensidad del color formado con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de la amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.



Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0108]

50	Sustrato:	almidón soluble, aprox. 0,17 g/L
	Tampón:	citrato, aprox. 0,03 M
	Yodo (I2):	0,03 g/L
	CaCl ₂ :	1,85 mM
	pH:	2,50 ± 0,05
55	Temperatura de incubación:	40 °C
	Tiempo de reacción:	23 segundos
	Longitud de onda:	590 nm
	Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
	Rango de trabajo enzimático:	0,01-0,04 AFAU/mL

[0109] Una carpeta EB-SM-0259.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa petición a Novozymes A/S, Dinamarca, carpeta que se incluye en el presente documento por referencia.

Determinación de FAU-F

5 [0110] Las unidades de alfa-amilasa fúngica FAU-F (Fungamyl) se miden en relación con un estándar enzimático de una fuerza declarada.

Condiciones de reacción	
Temperatura	37 °C
pH	7,15
Longitud de onda	405 nm
Tiempo de reacción	5 min
Tiempo de medición	2 min

10 [0111] Una carpeta (EB-SM-0216.02) que describe este método estándar con más detalle está disponible previa petición a Novozymes A/S, Dinamarca, carpeta que se incluye en el presente documento por referencia.

Medición de actividad de la celulasa usando ensayo de papel de filtro (ensayo FPU)

15 1. Fuente del método

[0112] 1.1 El método se describe en un documento titulado "Measurement of Cellulase Activities" por Adney, B. y Baker, J. 1996. Laboratory Analytical Procedure, LAP-006, National Renewable Energy Laboratory (NREL). Se basa en el método IUPAC para medir la actividad de la celulasa (Ghose, T.K., 1987, Measurement of Cellulase Activities, Pure & Appl. Chem. 59: 257-268.

2. Procedimiento

[0113]

25 2.1 El método se realiza como se describe por Adney y Baker, 1996, *supra*, salvo el uso de placas de 96 pocillos para leer los valores de absorbancia después del desarrollo del color, como se describe a continuación.

2.2 Tubos de ensayo enzimático:

30 2.2.1 Una banda de papel de filtro laminado (#1 Whatman; 1 cm X 6 cm; 50 mg) se adiciona al fondo de un tubo de ensayo (13 mm X 100 mm).

2.2.2 Al tubo se añade 1,0 mL de 0,05 M de tampón de Na-citrato (pH 4,80).

2.2.3 Los tubos que contienen el papel de filtro y tampón se incuban 5 min. a 50 °C ($\pm 0,1$ °C) en un baño de agua en circulación.

35 2.2.4 Después de la incubación, 0,5 mL de dilución enzimática en el tampón de citrato se añaden al tubo. Las diluciones enzimáticas se diseñan para producir valores ligeramente por encima y por debajo del valor objetivo de 2,0 mg de glucosa.

2.2.5 Los contenidos del tubo se mezclan mediante agitación vorticial suave durante 3 segundos.

40 2.2.6 Después de la agitación vorticial, los tubos se incuban durante 60 min. a 50 °C ($\pm 0,1$ °C) en un baño de agua en circulación.

2.2.7 Inmediatamente después de los 60 min. de incubación, los tubos se quitan del baño de agua, y 3,0 mL de reactivo DNS se añaden a cada tubo para detener la reacción. Los tubos se agitan vorticialmente 3 segundos para que se mezclen.

2.3 Blanco y controles

45 2.3.1 Un blanco de reactivo se prepara añadiendo 1,5 mL de tampón de citrato a un tubo de ensayo.

2.3.2 Un control de sustrato se prepara colocando una banda de papel de filtro laminado en el fondo de un tubo de ensayo, y añadiendo 1,5 mL de tampón de citrato.

2.3.3 Controles enzimáticos se preparan para cada dilución enzimática mezclando 1,0 mL de tampón de citrato con 0,5 mL de la dilución enzimática apropiada.

50 2.3.4 El blanco de reactivo, el control de sustrato y los controles enzimáticos se someten a ensayos de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y se hacen junto con estos.

2.4 Estándares de glucosa

2.4.1 Una solución madre de 100 mL de glucosa (10,0 mg/mL) se prepara, y partes alícuotas de 5 mL se congelan. Antes del uso, las partes alícuotas se descongelan y se agitan vorticialmente para que se mezclen.

55 2.4.2 Diluciones de la solución madre se hacen en el tampón de citrato de la siguiente manera:

G1 = 1,0 mL de solución madre + 0,5 mL de tampón = 6,7 mg/mL = 3,3 mg/0,5 mL

G2 = 0,75 mL de solución madre + 0,75 mL de tampón = 5,0 mg/mL = 2,5 mg/0,5 mL

G3 = 0,5 mL de solución madre + 1,0 mL de tampón = 3,3 mg/mL = 1,7 mg/0,5 mL

G4 = 0,2 mL de solución madre + 0,8 mL de tampón = 2,0 mg/mL = 1,0 mg/0,5 mL

2.4.3 Tubos estándar de glucosa se preparan añadiendo 0,5 mL de cada dilución a 1,0 mL de tampón de citrato.

2.4.4 Los tubos estándar de glucosa se someten a ensayos de la misma manera que los tubos de ensayo enzimático, y se hacen junto con estos.

2.5 Desarrollo del color

2.5.1 Después de los 60 min. de incubación y la adición de DNS, los tubos se hierven todos juntos durante 5 min. en un baño de agua.

2.5.2 Después de la ebullición, se enfrían inmediatamente en un baño de hielo/agua.

2.5.3 Cuando están fríos, los tubos se agitan vorticialmente brevemente, y se deja que la pulpa se asiente. Entonces cada tubo se diluye añadiendo 50 microL del tubo a 200 microL de ddH₂O en una placa de 96 pocillos. Cada pocillo se mezcla y la absorbancia se lee a 540 nm.

2.6 Cálculos (ejemplos se dan en el documento NREL)

2.6.1 Una curva de estándar de glucosa se prepara representando gráficamente la concentración de glucosa (mg/0,5 mL) para los cuatro estándares (G1-G4) vs. A₅₄₀. Se ajusta utilizando una regresión lineal (software Prism), y la ecuación para la línea se usa para determinar la glucosa producida por cada uno de los tubos de ensayo enzimático.

2.6.2 Un gráfico de glucosa producida (mg/0,5 mL) vs. dilución enzimática total se prepara, donde el eje y (dilución enzimática) está en una escala logarítmica.

2.6.3 Una línea se traza entre la dilución enzimática que produjo justo por encima de 2,0 mg de glucosa y la dilución que produjo justo por debajo de esa cantidad. A partir de esta línea, se determina la dilución enzimática que habría producido exactamente 2,0 mg de glucosa.

2.6.4 Las unidades/ml del papel de filtro (FPU/ml) se calculan de la siguiente manera: FPU/mL = 0,37/la dilución enzimática que produce 2,0 mg de glucosa

Método de ensayo de proteasa - AU(RH)

[0114] La actividad proteolítica se puede determinar con hemoglobina desnaturalizada como sustrato. En el método de Anson-Hemoglobina para la determinación de la actividad proteolítica se digiere hemoglobina desnaturalizada, y la hemoglobina sin digerir se precipita con ácido tricloroacético (ATC). La cantidad de producto soluble de ATC se determina con reactivo de fenol, lo que da un color azul con tirosina y triptófano.

[0115] Una unidad Anson (AU-RH) se define como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (es decir, 25 °C, pH 5,5 y tiempo de reacción de 10 min.) digiere hemoglobina a un ritmo inicial de manera que se libera por minuto una cantidad de producto soluble de ATC que da el mismo color con reactivo de fenol como un miliequivalente de tirosina.

[0116] El método AU(RH) se describe en EAL-SM-0350 y está disponible de Novozymes A/S Dinamarca previa petición.

Método de ensayo de proteasa (LAPU)

[0117] 1 unidad de leucina aminopeptidasa (LAPU) es la cantidad de enzima que descompone 1 microM de sustrato por minuto en las condiciones siguientes: 26 mM de L-leucina-p-nitroanilida como sustrato, 0,1 M de tampón Tris (pH 8,0), 37 °C, tiempo de reacción de 10 minutos.

[0118] La LAPU se describe en EB-SM-0298.02/01 disponible de Novozymes A/S Dinamarca previa petición.

Determinación de la actividad de la amilasa maltogénica (MANU)

[0119] 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 0,1 M de tampón de citrato, pH 5,0 a 37 °C durante 30 minutos.

Materiales:

[0120] Aldehído deshidrogenasa ALDH: aldehído deshidrogenasa, activada con potasio a partir de polvo liofilizado de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), 2-10 unidades/mg de proteína se compraron de Sigma (A6338).

[0121] Glucoamilasa (G2): glucoamilasa derivada de *Trametes cingulata* descrita en la SEQ ID N°: 2 en WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S.

[0122] Alfa-amilasa A (AA): alfa-amilasa híbrida que consiste en alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con conector de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290 (Novozymes A/S).

5 [0123] Levadura: RED STAR™ disponible de Star/Lesaffre, EE.UU.

Ejemplos

Ejemplo 1

10

Efecto de la aldehído-deshidrogenasa (ALDH) en la producción de etanol a partir de la combinación de α -amilasa (AA) y glucoamilasa (GA) en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas en una etapa única (SSF)

15

[0124] Todos los tratamientos se evaluaron vía fermentaciones de miniescala. 410 g de maíz dentado amarillo molido (con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 0,5 mm) se añadieron a 590 g de agua del grifo. Esta mezcla se suplementó con 3,0 ml de 1 g/L de penicilina y 1 g de urea. El pH de esta mezcla se ajustó a 4,5 con 40 % de H₂SO₄.

20

El nivel de sólidos secos (DS) se determinó para ser 35 % en peso. Aproximadamente 5 g de esta mezcla se añadieron a 15 ml del tubo de polipropileno. Los tubos se prepararon perforando un agujero de 1/32 pulgadas (1,5 mm) y los tubos vacíos se pesaron entonces antes de añadir la mezcla de maíz. Los tubos se pesaron nuevamente después de añadir la mezcla triturada para determinar el peso exacto de la mezcla triturada en cada tubo. Cada tubo se dosificó con la cantidad apropiada de dosificación enzimática mostrada en la tabla 1 seguido de la adición de 200 microlitros de propagado de levadura/5 g de mezcla. Las dosificaciones enzimáticas reales se basaron en el peso exacto de la mezcla de maíz en cada tubo. Los tubos se incubaron a 32 °C. Se ejecutaron nueve fermentaciones duplicadas de cada tratamiento. Tres duplicados se seleccionaron para análisis en puntos de tiempo de 24 horas, 48 horas y 70 horas. Los tubos se agitaron vorticialmente a 24, 48 y 70 horas y se analizaron mediante HPLC. La preparación de HPLC consistió en parar la reacción mediante la adición de 50 microlitros de 40 % H₂SO₄, centrifugar, y filtrar a través de un filtro de 0,45 micrómetros. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el análisis. El sistema Agilent™ 1100 HPLC acoplado con detector RI se usó para determinar la concentración de etanol y oligosacáridos. La columna de separación fue la columna de exclusión de iones aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) de BioRad™. Los resultados se resumen en la figura 2.

25

30

Tabla 1

	Tratamientos	dosis AA (FAU-F/g DS)	dosis GA (AGU/g DS)	dosis ALDH (unidades/g DS)
1	AA + GA	0,0475	0,50	
2	AA + GA + ALDH	0,0475	0,50	1
3	AA + GA + ALDH	0,0475	0,50	2

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso de producción de etanol a partir de material que contiene almidón en un medio de fermentación utilizando un organismo de fermentación, donde una o más aldehído deshidrogenasas seleccionadas del grupo de enzimas clasificadas en EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4 y EC 1.2.1.5 se agregan al medio de fermentación, y donde el proceso comprende las etapas de:
- 10 (a) sacarificación del material que contiene almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón;
(b) fermentación utilizando un organismo de fermentación, donde el organismo de fermentación es una levadura.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde las etapas (a) y (b) se realizan simultáneamente.
- 15 3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde el material que contiene almidón se selecciona del grupo que consiste en maíz, mandioca, trigo, cebada, centeno, sorgo, y patatas, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el organismo de fermentación es una levadura de fermentación de C6.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el etanol se recupera mediante destilación.

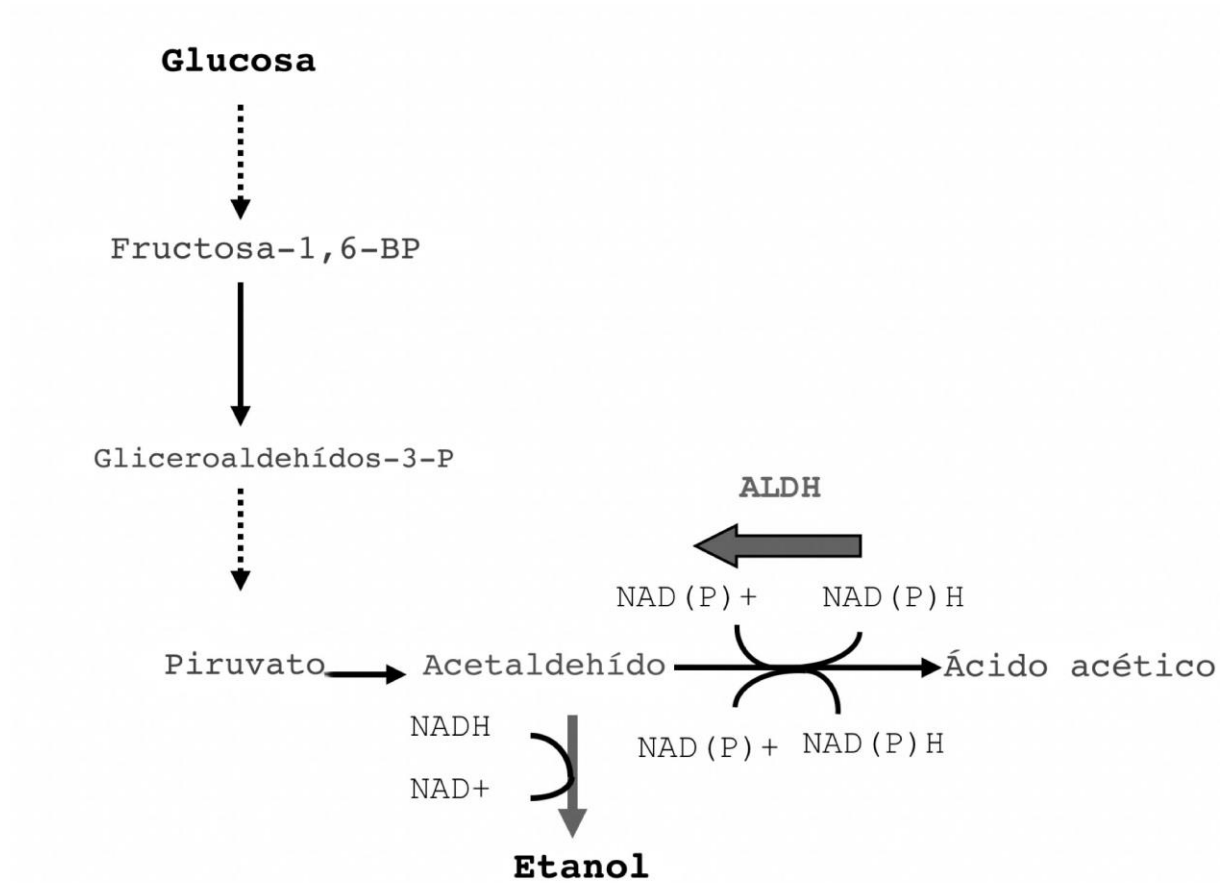


FIGURA 1

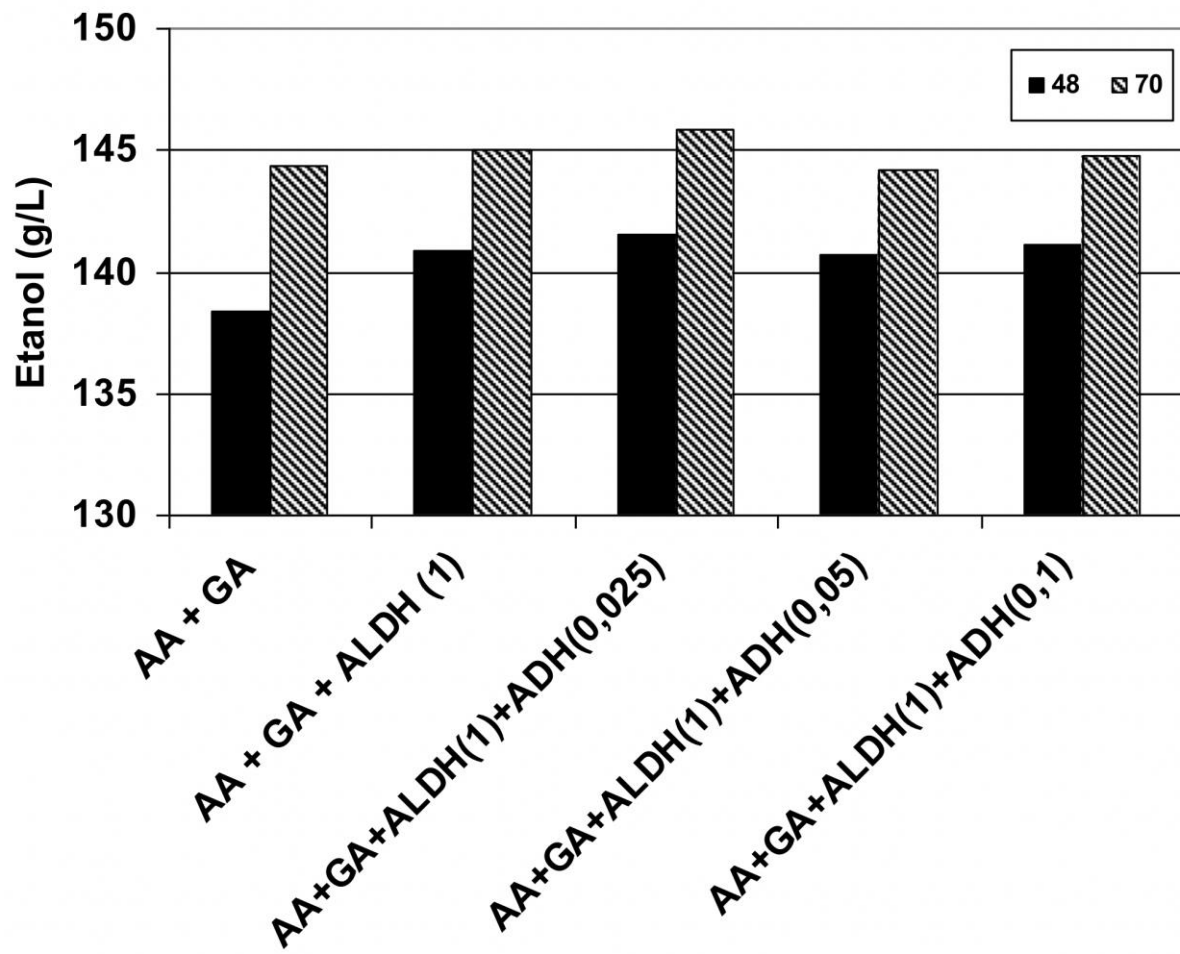


FIGURA 2