

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 308**

51 Int. Cl.:

C12P 7/56 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)
A01N 65/00 (2009.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12C 11/00 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2007 PCT/US2007/064592**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2007 WO07109750**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2007 E 07759075 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 1999265**

54 Título: **Procesos de fermentación**

30 Prioridad:

22.03.2006 US 784777 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2019

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)
77 Perry Chapel Church Road
Franklinton, North Carolina 27525, US y
NOVOZYMES A/S (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DEINHAMMER, RANDY y
FESTERSEN, RIKKE MONICA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 728 308 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procesos de fermentación

5 CAMPO DE LA INVENCION

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los procesos de fermentación se utilizan para producir un gran número de productos comerciales, incluyendo alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol) ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, 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, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); hormonas, y otros compuestos que son difíciles de producir sintéticamente. Los procesos de fermentación también se usan habitualmente las industrias láctica (por ejemplo, en la producción de yogur y queso), del cuero y del tabaco.

[0003] Los productos de fermentación se producen industrialmente en grandes tanques de fermentación capaces de retener más de 10 metros cúbicos de medio de fermentación. Para desarrollar una población de organismos fermentadores adecuados y una concentración adecuada en el tanque de fermentación, un proceso de fermentación normalmente requiere un tiempo de proceso de entre 48 y 120 horas o más. A causa de los tanques de gran tamaño y de los tiempos largos de fermentación, resulta difícil mantener el sistema de fermentación libre de contaminación. Las bacterias contaminantes no deseadas a menudo son bacterias gram-positivas del género *Lactobacillus* que convierten la glucosa en ácido láctico y ácido acético. Se sabe que las bacterias gram-negativas también contaminan los procesos de fermentación. Desafortunadamente, las condiciones de fermentación suelen ser propicias para el crecimiento bacteriano. Si se produce una contaminación bacteriana, todo el tanque de fermentación debe ser vaciado, limpiado y esterilizado y el medio de fermentación queda inservible. Por supuesto, esto consume mucho tiempo y es costoso. Además, muchas bacterias compiten con el organismo fermentador por el azúcar. Esto resulta en un rendimiento de fermentación reducido.

[0004] Bayrock et al., 2003, Appl. Microbiol. Biotechnol. 62:498-502 describen el control de contaminantes de *Lactobacillus* en fermentaciones continuas de etanol combustible por adición constante o por impulsos de penicilina G.

[0005] Maisetta et al. 2003, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, p. 3349-3351 es un estudio de la beta-defensina humana 3 (hBD-3) sola o en combinación con otros agentes microbianos contra las bacterias orales implicadas en la carcinogénesis o en las enfermedades periodontales.

[0006] WO 2005/089514 divulga un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de: (a) licuefacción de material que contiene almidón; (b) sacarificación usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos; y (c) fermentación usando un organismo fermentador.

[0007] Actualmente se usan antibióticos, calor y desinfectantes químicos para matar y/o inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas. Estos desinfectantes se agregan a la fermentación antes o durante la fermentación. Los agentes antibacterianos conocidos, incluyendo los antibióticos, tales como la penicilina, a veces no son deseables. Por lo tanto, existe la necesidad de medios adicionales para matar y/o inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas durante los procesos de fermentación.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] El objeto de la presente invención es proporcionar procesos de fermentación en los que se mate las bacterias no deseadas y/o se inhiba el crecimiento de bacterias no deseadas.

[0009] La invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

- 60 (a) licuefacción de material que contiene almidón;
 (b) sacarificación usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;
 (c) fermentación utilizando una levadura,

65 donde se agrega una o más defensinas antes y/o durante la fermentación en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento de células bacterianas de ácido láctico contaminantes.

Definiciones

[0010] El término "actividad antibacteriana" significa una actividad que es capaz de matar y/o inhibir el crecimiento de bacterias. Un "péptido antibacteriano" es un péptido capaz de matar y/o inhibir el crecimiento de bacterias. De manera similar, un "polipéptido antibacteriano" y una "enzima antibacteriana son polipéptidos y enzimas, respectivamente, capaces de matar y/o inhibir el crecimiento de bacterias. En el contexto de la presente invención, se pretende que el término "inhibir el crecimiento de bacterias microbianas" signifique que las bacterias están en un estado de no crecimiento, es decir, que no pueden multiplicarse. Debe entenderse que un "péptido antibacteriano" o similar también puede ser capaz de matar y/o inhibir el crecimiento de otras células microbianas, como algunas células fúngicas.

[0011] Cuando se usa en este documento, un "fragmento" de una secuencia de aminoácidos, péptido, polipéptido, enzima, etc. significa una subsecuencia en la que uno o más aminoácidos se han eliminado del extremo amino y/o carboxilo terminal. Preferiblemente, uno o más aminoácidos se han eliminado del extremo carboxilo terminal. Un fragmento también debe tener actividad antibacteriana.

[0012] Un péptido, polipéptido, proteína, enzima o similar antimicrobianos usados en un proceso de la invención puede ser una "variante" que comprende, preferiblemente que consiste en, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos original/de tipo salvaje. Dicha variante puede construirse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como mediante mutagénesis dirigida/aleatoria y técnicas de barajado de dominios. En una forma de realización, el/los cambio(s) de aminoácidos (tanto en la variante como en la secuencia original/de tipo salvaje) es/son de naturaleza menor, como la(s) sustitución(es) conservadora(s) de aminoácidos, que no afectan significativamente al plegamiento y/o a la actividad de la molécula.

[0013] El término "homología" entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad".

[0014] El grado de "identidad" entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el programa FASTA incluido en la versión 2.0x del paquete de programa FASTA (véase W. R. Pearson & D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85: 2444-2448; y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183: 63-98). La matriz de puntuación utilizada fue BLOSUM50, la penalización por espacio fue de -12 y la penalización por extensión de espacio fue de -2.

[0015] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el mismo algoritmo y paquete de software descritos anteriormente. La matriz de puntuación utilizada fue la matriz de identidad, la penalización por espacio fue de -16 y la penalización por extensión de espacio fue de -4.

[0016] El término "bacterias no deseadas" en el contexto de la invención significa bacterias que no son deseables porque pueden afectar a la producción del producto de fermentación de manera negativa, por ejemplo, al convertir el sustrato del organismo fermentador en un producto de fermentación no deseado. Un ejemplo de bacterias contaminantes no deseadas en, por ejemplo, la producción de alcohol, incluida la producción de etanol, son los *Lactobacillus* que convierten la glucosa en ácido láctico y ácido acético.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS.

[0017]

La figura 1 muestra el crecimiento de una mezcla de cuatro cepas de *Lactobacillus* a lo largo de 24 horas a diferentes concentraciones del Péptido A antibacteriano.

La figura 2 muestra el crecimiento de una mezcla de cuatro cepas de *Lactobacillus* a lo largo de 24 horas a diferentes concentraciones del Péptido B antibacteriano.

La figura 3 muestra el recuento total de *Lactobacillus* después de 0, 24, 48 y 72 horas de SSF.

La Figura 4 muestra el efecto antibacteriano de 0-1,000 mg de lisozima/L de medio de fermentación en *Lactobacillus* durante más de 48 horas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0018] El objeto de la presente invención es proporcionar procesos de fermentación en los que se eliminen bacterias no deseadas y/o se inhiba el crecimiento de bacterias no deseadas. Las bacterias no deseadas en sí mismas y sus productos finales metabólicos, como el ácido láctico y/o el ácido acético, causan rendimientos de fermentación reducidos que conducen a una pérdida económica considerable para el productor (véase Thomas et al., 2001, J. Applied Microbiology, 90: 819-828). Las bacterias no deseadas compiten con el organismo de fermentación (por ejemplo, la levadura) por el azúcar (fuente de carbono) en el medio de fermentación. El ácido

láctico y/o el ácido acético producidos por las bacterias no deseadas también pueden tener un impacto negativo en el crecimiento de la levadura.

[0019] Los presentes inventores han descubierto que los agentes antibacterianos pueden usarse ventajosamente para matar y/o inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas que se sabe que contaminan los procesos de fermentación. Un proceso de la invención se puede usar como una alternativa a, por ejemplo, la adición de antibióticos, como especialmente la penicilina, a los procesos de fermentación, que pueden ser no deseados por una razón u otra. Un proceso de la invención puede dar como resultado un rendimiento de fermentación incrementado en comparación con el rendimiento obtenido en un proceso correspondiente en el que no se agrega ningún agente antibacteriano.

[0020] De acuerdo con la invención, se puede prevenir y/o reducir especialmente la contaminación bacteriana por bacterias productoras de ácido láctico y/o ácido acético. Se sabe que las bacterias productoras de ácido láctico y/o ácido acético, especialmente las del género *Lactobacillus*, contaminan los procesos de fermentación. Algunos ejemplos de especies de *Lactobacillus* que se ha descubierto que contaminan los procesos de fermentación incluyen cepas de *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y/o *Lactobacillus rhamnosus*, o una mezcla de las mismas.

Procesos de la invención

[0021] La invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende las etapas de:

- a) licuefacción del material que contiene almidón;
- (b) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;
- (c) fermentación utilizando una levadura,

donde una o más defensinas se agregan antes y/o durante la fermentación en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento de células bacterianas de ácido láctico contaminantes. Un proceso de la invención se puede usar para producir productos de fermentación que incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, 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, betacaroteno); hormonas, y otros compuestos. En una forma de realización preferida, la fermentación es una etapa en un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (proceso SSF) o un proceso de fermentación en una única etapa de material que contiene almidón crudo (a veces denominado licuefacción, sacarificación y fermentación simultáneas (LSF)). Los ejemplos de procesos en una sola etapa incluyen los procesos descritos en la patente de EE. UU. n° 4,316,956; US 2004/0234649 y WO 2003/066816 y WO 2003/066826.

[0022] La fermentación, en una forma de realización, puede llevarse a cabo a una temperatura en el rango de 20-40 °C, preferiblemente 30-35 °C, especialmente alrededor de 32 °C. Este suele ser el caso cuando se producen productos de fermentación alcohólica como el etanol, especialmente etanol combustible, etanol potable y/o etanol industrial.

[0023] El pH durante la fermentación puede estar, en una forma de realización preferida, en el rango entre 4-7, preferiblemente en el rango entre 5 y 6.

[0024] En una forma de realización, la defensina se agrega durante la licuefacción y/o la sacarificación, es decir, antes de la fermentación, o durante la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). En otra forma de realización, la defensina se agrega a la vinaza reciclada y/o al líquido sobrenadante reciclado en las etapas de licuefacción y/o fermentación.

[0025] Las fermentaciones se realizan generalmente como fermentación discontinua, es decir, la fermentación se realiza de principio a fin en un solo tanque, o como fermentación continua, es decir, un sistema de fermentación en estado estable que funciona sin interrupción y donde cada etapa de la fermentación se realiza en una sección separada del sistema de fermentación y los caudales están configurados para corresponder a los tiempos de residencia requeridos. En otras palabras, las etapas individuales del proceso en un proceso que comprende un proceso de fermentación se pueden realizar de manera discontinua o continua. Los procesos en los que todos los pasos del proceso se realizan por lotes (de manera discontinua), o los procesos en los que todos los pasos del proceso se realizan de forma continua, o los procesos en los que se realizan uno o más pasos del proceso por lotes y una o más etapas del proceso de manera continua están contemplados de acuerdo con la invención. El proceso en cascada es un ejemplo de un proceso en el que una o más etapas del proceso se realizan de forma continua y, como tal, se contempla para la invención. Para más información sobre el proceso en cascada y otros procesos especialmente de etanol, consúltese "The Alcohol Textbook ", Ethanol production by fermentation and

distillation. Eds. T.P. Lyons, D.R. Kesall and J.E. Murtagh. Nottingham University Press 1995. En una forma de realización preferida, la fermentación es parte de un proceso continuo de producción de productos de fermentación.

[0026] En una forma de realización preferida, la defensina se deja en contacto con el medio de fermentación por una duración de entre 1 minuto y 48 horas, preferiblemente al menos 1 hora, especialmente al menos 24 horas antes de la inoculación del organismo fermentador.

[0027] La fermentación se puede llevar a cabo durante un período de 1 a 250 horas, preferiblemente de 25 a 190 horas, más preferiblemente de 30 a 180 horas, más preferiblemente de 40 a 170 horas, incluso más preferiblemente de 50 a 160 horas, y aún más preferiblemente de 60 a 150 horas, y todavía más preferiblemente de 70 a 140 horas, y de la manera más preferible de 80 a 130 horas.

Medio de fermentación

[0028] "Medio de fermentación" o "caldo de fermentación" se refiere al entorno en el que se realiza la fermentación y que incluye el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidratos que es metabolizada por el organismo fermentador. El medio de fermentación, incluido el sustrato de fermentación y otras materias primas utilizadas en el proceso de fermentación, puede procesarse, por ejemplo, mediante molienda, licuefacción y/o sacarificación u otras etapas deseadas antes o simultáneamente con el proceso de fermentación. Por consiguiente, el medio de fermentación puede referirse al medio antes de que se agregue el organismo de fermentación, tal como, el medio de o resultante de la licuefacción y/o la sacarificación, así como el medio que comprende el organismo de fermentación, tal como, el medio utilizado en los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) o de fermentación en un solo paso (LSF) de, por ejemplo, materias primas en crudo.

Organismos de fermentación

[0029] "Organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo adecuado para su uso en un proceso de fermentación deseado. Según la invención, el organismo de fermentación es una levadura capaz de fermentar, es decir, de convertir azúcares, como la glucosa o la maltosa, directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., y en particular, cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, la levadura ETHANOL RED™ (disponible en Fermentis/Lesaffre, EE. UU.), FALI (disponible en Fleischmann's Yeast, EE. UU.), la levadura fresca SUPERSTART™ y THERMOSACC™ (disponible en Ethanol Technology, WI, EE. UU.), BIOFERM AFT y XR (disponibles en NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE. UU.), GERT STRAND (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible en DSM Specialties).

Materiales que contienen almidón

[0030] De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier material adecuado que contenga almidón, incluyendo almidón granular, como sustrato. El material se selecciona generalmente en función del producto de fermentación deseado. Los ejemplos de materiales que contienen almidón adecuados para usar en un proceso de la presente invención incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, maíz, raquis, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, yuca, tapioca, sorgo, sorgo dulce, arroz, guisantes, frijoles o batatas, o mezclas de los mismos, o cereales, materias primas que contienen azúcar, como melaza, materias de frutas, caña de azúcar o remolacha azucarera, patatas y materiales que contienen celulosa, como residuos de madera o de plantas, o mezclas de estos. Se contemplan los tipos de maíz y cebada tanto cerosos como no cerosos.

[0031] Los sustratos adecuados también incluyen fuentes de carbohidratos, en particular azúcares de bajo peso molecular DP₁₋₃ que pueden ser metabolizados por el organismo fermentador, y que pueden suministrarse por adición directa al medio de fermentación.

Agentes antibacterianos

[0032] El agente antibacteriano utilizado de acuerdo con la invención es una defensina. En una forma de realización preferida, el péptido antibacteriano es una defensina fúngica, preferiblemente derivable de *Pseudoplectania nigrella*, especialmente *Pseudoplectania nigrella* CBS 444.97. Se contempla específicamente el péptido descrito como los aminoácidos 1-40 de la SEQ ID N°: 2 de WO 2003/044049 o un fragmento del mismo que tenga actividad antibacteriana o una variante del mismo que tenga actividad antibacteriana que tenga al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 97%, especialmente al menos el 99% de identidad con los aminoácidos 1-40 de la SEQ ID N°: 2 de WO 2003/044049.

[0033] La defensina se agrega en concentraciones suficientes para matar y/o inhibir el crecimiento de células bacterianas, preferiblemente bacterias gram-positivas y/o células bacterianas gram-negativas, especialmente células bacterianas gram-positivas del género *Lactobacillus*, incluyendo *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus*

collinoides, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y/o *Lactobacillus rhamnosus*, o mezclas de uno o más de las mismas.

5 [0034] De acuerdo con la invención, la defensina se agrega en una concentración entre 0,1-1000 mg/L de medio de fermentación, preferiblemente entre 0,5-500 mg/L de medio de fermentación, especialmente entre 1-100 mg/L de medio de fermentación.

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

10 [0035] La presente invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, proceso que incluye una etapa de licuefacción y etapas de sacarificación y fermentación realizadas de forma separada/secuencial o simultánea.

15 [0036] Por lo tanto, en este aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende las etapas de:

- a) licuefacción de material que contiene almidón;
- (b) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos
- (c) fermentación utilizando una levadura,

20 donde una o más defensinas se agregan antes y/o durante la fermentación en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento de células bacterianas de ácido láctico contaminantes.

25 [0037] El producto de fermentación, tal como especialmente el etanol, puede recuperarse opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. La etapa de fermentación (c) puede ser un proceso de fermentación como se describe en el presente documento. Los materiales de partida adecuados que contienen almidón se enumeran en la sección anterior "Materiales que contienen almidón". En una forma de realización preferida, la etapa de licuefacción (a) se realiza usando una alfa-amilasa. Las enzimas contempladas y las concentraciones adecuadas se enumeran en la sección "Enzimas" a continuación. La fermentación se lleva a cabo en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Los organismos de fermentación adecuados se enumeran en la sección anterior "Organismos de fermentación". Los ejemplos de defensinas adecuadas se enumeran en la sección anterior "Agentes antibacterianos".

35 [0038] La defensina también se puede añadir durante la licuefacción y/o la sacarificación, es decir, antes del inicio de la fermentación. Alternativamente, la defensina se puede añadir a la vinaza reciclada y/o al líquido sobrenadante reciclado, por ejemplo, en las etapas de licuefacción y/o fermentación. En una forma de realización preferida, la defensina se deja en contacto con el medio de fermentación durante al menos entre 1 minuto y 48 horas, preferiblemente al menos 1 hora, especialmente al menos 24 horas antes de la inoculación del organismo fermentador.

40 [0039] La licuefacción se lleva a cabo por calentamiento por encima de la temperatura de gelatinización del material que contiene almidón.

45 [0040] En una forma de realización preferida, las etapas (b) y (c) se llevan a cabo simultáneamente (proceso SSF).

[0041] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes de la etapa (a), las etapas de:

- x) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente mediante molienda;
- y) formar una suspensión que comprende material que contiene almidón y agua.

55 [0042] La suspensión puede incluir agua y/o aguas de proceso, como por ejemplo vinaza reciclada y/o líquido sobrenadante, agua de lavado, el condensado o destilado del evaporador, el agua del despojamiento de la destilación u otro producto de agua de proceso de fermentación de la planta. En una forma de realización preferida, el material que contiene almidón se reduce de tamaño mediante molienda en seco o molienda en húmedo. Sin embargo, también se pueden usar otras tecnologías de reducción de tamaño, como la tecnología emulsionante, la pulsación rotatoria. La suspensión acuosa puede contener del 10 al 40% en peso, preferiblemente del 25 al 35% en peso de material que contiene almidón. La suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y se puede agregar alfa-amilasa, preferiblemente alfa-amilasa fúngica bacteriana y/o ácida para iniciar la licuefacción (*thinning*). En una forma de realización, la suspensión puede cocerse a chorro para gelatinizar adicionalmente la suspensión antes de someterla a una alfa-amilasa en la etapa (a). Sin embargo, debe entenderse que la licuefacción puede llevarse a cabo sin una etapa de cocción a chorro.

65 [0043] Más específicamente, la licuefacción se puede llevar a cabo como un proceso de suspensión en caliente en tres pasos. La suspensión se calienta hasta entre 60-95 °C, preferiblemente 80-85 °C, y se agrega alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (*thinning*). Luego, la suspensión se puede cocer a chorro a una temperatura entre 95-

140 °C, preferiblemente 105-125 °C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. La suspensión se enfría a 60-95 °C y se agrega más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción puede llevarse a cabo a pH 4,5-6,5, en particular a un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados se conocen como mosto.

[0044] La etapa de sacarificación (b) se puede llevar a cabo usando condiciones ampliamente conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso completo de sacarificación puede durar de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, pero es común hacer una presacarificación de 40 a 90 minutos a una temperatura de entre 30 y 65 °C, típicamente de 60 a 90 °C, seguida de la sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (proceso SSF). La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 30-65 °C, típicamente alrededor de 60 °C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4,5.

[0045] El proceso más ampliamente utilizado en los procesos de producción de productos de fermentación, especialmente la producción de etanol, es la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF, por sus siglas en inglés), en las cuales no existe una etapa de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, como la levadura y la(s) enzima(s), se puede agregar junto. La SSF se puede llevar a cabo a una temperatura en el rango de 20-40 °C, preferiblemente 30-35 °C, especialmente alrededor de 32 °C. El pH durante la SSF está típicamente en el rango entre 4 y 7, preferiblemente entre 5 y 6.

ENZIMAS

Alfa-amilasas

[0046] La alfa-amilasa puede ser de cualquier origen según la invención. Se prefieren las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

[0047] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) que, agregada en una cantidad efectiva, tiene actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0048] De acuerdo con el procedimiento de la invención, una alfa-amilasa bacteriana se puede derivar preferiblemente del género *Bacillus*.

[0049] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. liqueniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también puede derivar de otras especies de *Bacillus*. Algunos ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada en la SEQ ID N°: 4 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN) mostrada en la SEQ ID N°: 5 en WO 99/19467, y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en la SEQ ID N°: 3 en WO 99/19467. En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una enzima que tiene un grado de identidad de al menos el 60%, preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, tal como al menos el 95% %, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente, en WO 99/19467.

[0050] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrida, especialmente una descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355. Las variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente se describen en las patentes de EE.UU. 6,093,562, 6,297,038 o la patente de EE.UU. 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 la posición 179 a 182, preferiblemente una delección doble descrita en WO 1996/023873 - véase, por ejemplo, la página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID N°: 3 descrita en WO 99/19467 o una delección de los aminoácidos 179 y 180 utilizando la SEQ ID N°: 3 de WO 99/19467 para la numeración. Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una doble delección correspondiente a delta(181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denotada I181 * + G182 * + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID N°: 3 divulgada en WO 99/19467.

[0051] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar la amilosa y la amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está

disponible comercialmente en Novozymes A/S, Dinamarca. La alfa-amilasa maltogénica se describe en las patentes de EE.UU. nº 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

5

[0052] Una alfa-amilasa híbrida contemplada específicamente comprende 445 residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como la SEQ ID N°: 4 en WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como SEQ ID N°: 3 en WO 99/194676), con uno o más, especialmente todas, de las siguientes

10

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

15

[0053] La alfa-amilasa bacteriana se puede agregar en cantidades que son ya conocidas en la técnica. Cuando se mide en unidades KNU (descritas a continuación en la sección "Materiales y métodos"), la actividad de alfa-amilasa está presente preferiblemente en una cantidad de 0,5-5,000 NU/g de MS, en una cantidad de 1-500 NU/g de MS, o más preferiblemente en una cantidad de 5-1,000 NU/g de MS, tal como 10-100 NU/g de MS.

20

Alfa-amilasas fúngicas

[0054] Las alfa-amilasas ácidas fúngicas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus kawachii*.

25

[0055] Una alfa-amilasa ácida fúngica preferida es una alfa-amilasa similar a Fungamyl que se deriva preferiblemente de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente divulgación, el término "alfa-amilasa similar a Fungamyl" indica una alfa-amilasa que posee una identidad elevada, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso el 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N°: 10 en WO 96/23874.

30

[0056] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es la de *Aspergillus niger* referenciada como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TeEMBL con el número de depósito primario P56271 y se describe con más detalle en WO 89/01969 (Ejemplo 3). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* también se muestra como la SEQ ID N°: 1 en WO 2004/080923 (Novozymes). Además, también se contemplan variantes de dicha amilasa ácida fúngica que tienen al menos un 70% de identidad, como al menos un 80% o incluso al menos un 90% de identidad, como al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad con la SEQ ID N°: 1 en WO 2004/080923. Una alfa-amilasa ácida fúngica adecuada disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

35

40

[0057] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y es la descrita por Kaneko et al, J. Ferment. Bioeng. 81: 292-298 (1996), "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL:#AB008370.

45

[0058] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, una no híbrida), o una variante de la misma. En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

50

Alfa-amilasas híbridas fúngicas

55

[0059] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Los ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen los descritos en WO 2005/003311 o en la solicitud de publicación de patente de EE. UU. nº 2005/0054071 (Novozymes) o en la solicitud de patente de EE. UU. nº 60/638,614 (publicada como WO 2006/069290). 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 al almidón, y un enlazador opcional.

60

[0060] Los ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen los descritos en las Tablas 1 a 5 de los ejemplos de la solicitud de patente de EE. UU. en tramitación nº 60/638,614, incluida la 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 enlazador de AMG y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N°: 101 en US 60/638,614), alfa-

65

amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Aspergillus niger* (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 de WO 2006/069290 y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N°: 102 en US 60/638,614).
 5 Otras alfa-amilasas híbridas contempladas específicamente son cualquiera de las enumeradas en las Tablas 3, 4, 5 y 6 en el Ejemplo 4 de la solicitud de EE. UU. n° 11/316,535 o WO 2006/069290.

[0061] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen las descritas en la solicitud de publicación de patente de EE. UU. n° 2005/0054071, incluidas las descritas en la Tabla 3 en la página 15, como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con dominio de unión al almidón y enlazador de *Aspergillus kawachii*.

[0062] También se contemplan las alfa-amilasas que poseen una identidad elevada respecto a cualquiera de las anteriores alfa-amilasas, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzimas maduras.

Productos comerciales de alfa-amilasa

[0063] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.) y la alfa-amilasa ácida fúngica que se vende con el nombre comercial SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0064] Una alfa-amilasa ácida puede agregarse de acuerdo con la invención en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica por gramo) de MS, preferiblemente de 0,10 a 5 AFAU/g de MS, especialmente de 0,3 a 2 AFAU/g de MS.

Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos

[0065] El término "enzima generadora de fuentes de carbohidrato" incluye la glucoamilasa (que es generadora de glucosa), la beta-amilasa y la amilasa maltogénica (que son generadoras de maltosa). Una enzima generadora de fuentes de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que puede ser utilizado como 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, como etanol. El carbohidrato generado puede convertirse directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. De acuerdo con la invención, se puede usar una mezcla de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos. Las mezclas especialmente contempladas son mezclas de al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, incluso más preferiblemente una alfa-amilasa ácida fúngica. La relación entre la actividad de alfa-amilasa ácida fúngica (AFAU) por actividad de glucoamilasa (AGU) (AFAU por AGU) puede ser de al menos 0,1, en particular al menos 0,16, tal como en el rango de 0,12 a 0,50, o más.

Glucoamilasas

[0066] Una glucoamilasa usada de acuerdo con la invención puede derivarse de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivarse de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular la glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), pág. 1097-1102), o variantes de las mismas, tales como las descritas en WO 92/00381, WO 00/04136, WO 01/04273 y WO 03/029449 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* (WO 84/02921), de *A. oryzae* (Agric Biol. Chem. (1991), 55 (4), pág. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas.

[0067] Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes para mejorar la estabilidad térmica: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Eng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), prot. Engng. 8, 575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704.; y la introducción de residuos de Pro en las posiciones A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Engng. 10, 1199-1204. Otras glucoamilasas incluyen la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (véase la patente de EE. UU. n° 4,727,026 y Nagasaka, Y. et al. (1998) Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol Biotechnol 50: 323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular, derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE. UU. con n° de registro. 32,153), *Talaromyces Duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente de EE. UU. n° 4,587,215), o *Trametes cingulata* (WO 2006/069289). Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. termoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. termohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

[0068] Las composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN TM SUPER, SAN TM EXTRA L, SPIRIZYME TM PLUS, SPIRIZYME TM FUEL, SPIRIZYME TM B4U y AMG TM E (de Novozymes A/S); OPTIDEX TM 300 (de Genencor Int.); AMIGASE TM y AMIGASE TM PLUS (de DSM); G-ZYME TM G900, G-ZYME TM y G990 ZR (de Genencor Int.).

[0069] La glucoamilasa se puede agregar, en una forma de realización, en una cantidad de 0,005-5 AGU/g de MS, más preferiblemente entre 0,01-1 AGU/g de MS, tal como especialmente alrededor de 0,1-0,5 AGU/g de MS.

Beta-amilasas

[0070] Al menos de acuerdo con la invención, beta-amilasa (EC 3.2.1.2) es el nombre que se le da tradicionalmente a las amilasas maltogénicas exógenas, que catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados. Las unidades de maltosa se eliminan sucesivamente de los extremos de la cadena no reductora de manera gradual hasta que la molécula se degrada o, en el caso de la amilopectina, hasta que se alcanza un punto de ramificación. La maltosa liberada tiene la configuración anomérica beta, de ahí el nombre de beta-amilasa.

[0071] Las beta-amilasas se han aislado de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty y C.T. Kelly, Progress in Industrial Microbiology, vol. 15, pp. 112-115, 1979). Estas beta-amilasas se caracterizan por tener temperaturas óptimas en el rango de 40 °C a 65 °C y un pH óptimo en el rango de 4,5 a 7. Una beta-amilasa disponible comercialmente procedente de la cebada es NOVOZYM TM WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME TM BBA 1500 de Genencor Int., EE. UU.

Amilasas maltogénicas

[0072] 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 la amilosa y la amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está disponible comercialmente en 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.

[0073] La amilasa maltogénica se puede agregar, en una forma de realización preferida, en una cantidad de 0,05-5 mg de proteína total/gramos de MS o 0,05-5 MANU/g (Novo unidades de amilasa maltogénica por gramo) de MS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas

[0074] Alfa-amilasa bacteriana A: Variante de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181 * + G182 * + N193F descrita en la patente de EE. UU. 6,187,576 y disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

[0075] Glucoamilasa T: Glucoamilasa derivada de *Talaromyces emersonii* descrita en WO1999/028448 y disponible en Novozymes A/S, Dinamarca.

Agentes antibacterianos:

[0076] Péptido A: defensina fúngica derivada del ascomiceto saprófito *Pseudopezizomyces nigrella* también descrita como los aminoácidos 1-40 de la SEQ ID Nº: 2 de WO 03/044049.

[0077] Péptido B: Péptido sintético descrito como la SEQ ID Nº: 93 de WO 2005/105831.

[0078] Lisozima de clara de huevo de gallina, nº cat. L-7651, nº lote 114K7054 comprada en Sigma.

Levadura:

[0079] RED STAR® disponible de Red Star/Lesaffre, EE. UU.

Bacterias:

[0080] Tres de las cepas de *Lactobacillus* utilizadas en este estudio (*L. plantarum* # 1, *L. paracasei* # 2, *L. paracasei* #2a) fueron amablemente donadas por el profesor Mike Ingledew (Universidad de Saskatchewan).

Medios

[0081]

CASO: Caldo de soja triptico de BD Bacto Ref 211822
 Agar MRS (EMD Science, 1.10660.0500)

5

Equipo:

[0082] Espectrofotómetro: Tecan Safire Austria, Nº de serie 12901300079

10

Métodos:

Muestras de *Lactobacillus*

15

[0083] La cepa de *Lactobacillus* (por ejemplo, *L. plantarum* # 1, *L. paracasei* # 2, *L. paracasei* # 2a) se almacena como cultivo congelado hasta su uso. Véase J. Appl. Microbiol. 2001, 90, 819-28 para más detalles. El cultivo se rehidrata en caldo MRS (Difco) a concentraciones celulares iniciales de alrededor de 4×10^7 . Las muestras se colocan en placas en agar MRS (EMD Science, 1.10660.0500) en un entorno anaeróbico durante 2 días a 37 °C para el recuento de colonias.

20

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

25

[0084] La actividad amilolítica se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción se sigue mezclando 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 vuelve más débil y se convierte gradualmente en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

30

[0085] Una Unidad Kilo Novo de alfa amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, en condiciones estándar (es decir, a 37 °C +/- 0,05; 0,0003 M de Ca²⁺; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de materia seca de almidón Amylum de Merck soluble.

35

[0086] Un dossier EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

Determinación de la actividad de la alfa-amilasa ácida (AFAU)

40

[0087] La actividad de alfa-amilasa ácida se mide en AFAU (Unidades de alfa-amilasa ácida fúngica), que se determinan en relación con un estándar de enzima.

45

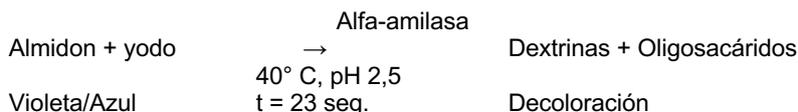
[0088] El estándar utilizado es AMG 300 L (de Novozymes A/S, Dinamarca, glucoamilasa de tipo salvaje de *Aspergillus niger* G1, también divulgada en Boel et al., 1984, EMBO J. 3 (5): 1097-1102) y WO 92/00381). La alfa-amilasa neutra en esta AMG disminuye después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 semanas de aproximadamente 1 FAU/mL hasta por debajo de 0,05 FAU/mL.

50

[0089] La actividad de la alfa-amilasa ácida en este estándar AMG se determina de acuerdo con la siguiente descripción. En este método, 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de materia seca de almidón por hora en condiciones estándar.

55

[0090] El yodo forma un complejo azul con el almidón pero no con sus productos de degradación. La intensidad del color es, por lo tanto, directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de la amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón en condiciones analíticas especificadas.



Condiciones estándar/condiciones de reacción: (por minuto)

Sustrato:	Almidón, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	Citato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/l
CaCl ₂ :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40° C

Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	lambda = 590 nm
Concentración de la enzima:	0,025 AFAU/mL
Rango de acción de la enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

[0091] Si se prefieren más detalles, estos se pueden encontrar en EB-SM-0259.02/01 disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

5 Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

[0092] La actividad de la alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (Unidades de alfa-amilasa ácida), que es un método absoluto. Una unidad de amilasa ácida (AAU) es la cantidad de enzima que convierte 1 g de almidón (100% de materia seca) por hora en condiciones estandarizadas en un producto que tiene una transmisión a 620 nm después de la reacción con una solución de yodo de concentración conocida igual a la de una referencia de color.

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g DS/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,13 M, pH = 4,2
Solución de yodo:	40,176 g de yoduro de potasio + 0,088 g de yodo/L
Agua del grifo	15° -20° dH (dureza en grado alemán)
pH:	4,2
Temperatura de incubación:	30° C
Tiempo de reacción:	11 minutos
Longitud de onda:	620 nm
Concentración de la enzima:	0,13-0,19 AAU/mL
Rango de acción de la enzima:	0,13-0,19 AAU/mL

15 [0093] El almidón debe ser almidón Lintner, que es un almidón de baja viscosidad que se usa en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene por tratamiento con ácido clorhídrico diluido de almidón nativo para que retenga la capacidad de colorear en azul con yodo. Más detalles se pueden encontrar en la EP 0140410B2.

20 Actividad de glucoamilasa (AGI)

[0094] La glucoamilasa (equivalente a la amiloglicosidasa) convierte el almidón en glucosa. La cantidad de glucosa se determina en este caso mediante el método de la glucosa oxidasa para la determinación de la actividad. El método se describe en la sección 76-11 "Starch-Glucoamylase Method with Subsequent Measurement of Glucose with Glucose Oxidase" de Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. Vol. 1-2 AACC, de la American Association of Cereal Chemists, 2000; ISBN: 1-891127-12-8.

[0095] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzima que formará 1 micromol de glucosa por minuto en las condiciones estándar del método.

30

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

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

[0096] El almidón debe ser almidón Lintner, que es un almidón de baja viscosidad que se usa en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene por tratamiento con ácido clorhídrico diluido de almidón nativo para que retenga la capacidad de colorear en azul con yodo

35

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0097] La Unidad de Novo Glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto en las condiciones estándar 37 °C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

40

[0098] Se puede utilizar un sistema autoanalizador. Se agrega mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa para que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona

específicamente con la beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH, que se determina utilizando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

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

Reacción de color:	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0,21 mM
Tampón:	fosfato 0,12 M; 0,15 M NaCl
pH:	7.60 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37° C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

5

[0099] Un dossier (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

Determinación de la actividad de la amilasa maltogénica (MANU)

10

[0100] Una MANU (Novo unidad 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 tampón de citrato 0,1 M, pH 5,0 a 37 °C durante 30 minutos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Prueba de la MIC para dos péptidos antibacterianos en cuatro cultivos de *Lactobacillus*

20

[0101] Se analizaron dos péptidos antibacterianos (péptido A y péptido B) utilizando la prueba de la MIC (concentración mínima inhibitoria).

25

[0102] Se prepararon cuatro cultivos diferentes de *Lactobacillus* en medio CASO durante 2 días a 37 °C en condiciones anaeróbicas facultativas. Los cuatro cultivos de *Lactobacillus* (*Lactobacillus paracasei* # 2a, *Lactobacillus paracasei* #2, *Lactobacillus plantarum* # 1, y *Lactobacillus fermentum* ATCC 14931) se mezclaron en igual volumen. Se llenaron 190 microlitros de cultivo bacteriano en pocillos de placa de microtitulación (placa de 96 pocillos) y se agregaron 10 microL de Péptido A y Péptido B, respectivamente (el volumen total de cada pocillo era entonces de 200 microL). Se iniciaron las mediciones. Las placas de microtitulación se incubaron con tapas durante 24 horas a 37 °C para asegurar un crecimiento óptimo de cepas facultativas de lactobacilos anaerobios. El péptido A y el péptido B se prepararon a partir de una concentración de proteína inicial de 4,27 mg de proteína/ml y 34,34 mg de proteína/ml respectivamente. Las dosis probadas fueron de 0,5 a 60 microgramos de péptido/ml para ambos péptidos. Todos los tratamientos se realizaron en 8 repeticiones y el control (células + medios) se probó en 16 repeticiones.

35

[0103] Las Figuras 1 y 2 muestran el resultado de la prueba de la MIC determinada a 600 nm utilizando un espectrofotómetro.

Ejemplo 2

40

Efecto antibacteriano del péptido A en SSF

45

[0104] Se licuó maíz molido en una suspensión acuosa (pH 5,6) utilizando 50 NU/g de MS de alfa-amilasa A bacteriana por calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 85 °C (aproximadamente 20 minutos). A continuación, la suspensión se cocinó durante otros 60 minutos.

[0105] El mosto de maíz (CM) se dividió en aproximadamente 5 g de CM y se agregó a tubos de centrifuga de plástico de 15 ml. Las fermentaciones se llevaron a cabo como SSF a 32 °C, 70 horas usando levadura RED

STAR® en una dosis de aproximadamente 1×10^7 células/ml de mosto. Antes del inicio de las fermentaciones, una mezcla 1/1/1 de tres cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus paracasei* #2, *Lactobacillus paracasei* # 2a, *Lactobacillus plantarum*) se agregó a algunos de los tubos que contenían el mosto de maíz como se indica en la Tabla 1 a continuación y dejó crecer durante 24 horas a 32 °C antes de añadir la levadura. El recuento celular total inicial deseado de *Lactobacillus* fue 1×10^7 células/ml de mosto, con un recuento de células aproximadamente igual de cada cepa. Todas las pruebas se realizaron en 9 repeticiones y los controles se incluyeron en la fermentación. La carga sólida seca fue: 32,68% en peso. Las fermentaciones se controlaron pesando los tubos individuales y registrando la hora y la fecha de la medición. Los datos de fermentación se transfirieron a SAS JMP para realizar un análisis de varianza, la prueba se llevó a cabo utilizando ($\alpha = 0,05$).

Tratamiento	Glucoamilasa T AGU/g de MS	Péptido A microgramo/g de MS	Lactobacillus
Control	0,500		
PL 1	0,500	1	+
PL 5	0,500	5	+
PL 25	0,500	25	+
Control_Lb	0,500		+

[0106] Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en caldo CASO/TSB estándar y se incubaron durante dos días en condiciones anaeróbicas facultativas a 37 °C. Se usó agar MRS de *Lactobacillus* (EMD Science, 1.10660.0500) para el recuento de placas. Después de colocar en las placas 1 ml de las diluciones mencionadas en la Tabla 2 y mostradas en la Fig. 3, las placas se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 2 días a 37 °C. Los recuentos de levadura se realizaron colocando en las placas 1 ml de las diluciones mencionadas en la Tabla 5 en placas Petrifilm para hongos y levaduras (3M, 6407) y se incubaron durante 2 días a 32,5 °C.

Tabla 2. Lista de recuentos de Lactobacillus durante 3 días, recuentos finales (ufc/mL).

	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Control	10000	9,1E + 06	0,0E + 00	1,2E + 08
PL1	1,8E + 06	1,7E + 09	1,8E + 08	1,8E + 06
PL5	9,1E + 05	1,9E + 09	1,3E + 08	6,4E + 04
PL25	9,1E + 05	1,5E + 09	1,3E + 08	9,1E + 05
Control Lb	1,4E + 07	2,1E + 09	1,7E + 08	6,0E + 06

Ejemplo 3 (Ejemplo de referencia)

Efecto de la lisozima sobre *Lactobacillus* en medio de fermentación

[0107] Se licuó maíz molido en una suspensión acuosa (pH 5,6) utilizando 50 NU/g de MS de alfa-amilasa A bacteriana mediante calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 85 °C (aproximadamente 20 minutos). A continuación, la suspensión se coció durante otros 60 minutos. Se ajustó el PH de una muestra del mosto de maíz licuado (CM) a pH a 5,05 con H₂SO₄. Después del ajuste del pH, la mezcla se dividió en aproximadamente 5 g de CM y se agregó a 36 tubos de centrifuga de plástico de 15 ml. Luego se agregaron varias cantidades de *L. paracasei* para dar un recuento de células inicial de aproximadamente $1-3 \times 10^6$ / mL. También se agregaron diferentes dosis (0 - 100 - 300 - 1000 mg/L) de lisozima (Sigma) a cada tubo. Los tubos se agitaron a fondo y se colocaron en un estante en un baño de agua a 32°C. Los tubos se extrajeron después de 0, 24 y 48 horas para la colocación en placas y el recuento de bacterias. No se añadió lisozima adicional a ninguno de los tubos después del tiempo cero.

[0108] La figura 4 muestra el resultado de la prueba. Los datos sugieren que la lisozima es un inhibidor eficaz del crecimiento de *Lactobacillus paracasei*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende las etapas de:
- a) licuefacción del material que contiene almidón;
 - (b) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;
 - (c) fermentación utilizando una levadura,
- 10 en donde una o más defensinas se agregan antes y/o durante la fermentación en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento de células bacterianas de ácido láctico contaminantes.
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, en el que las etapas (b) y (c) se llevan a cabo de forma secuencial o simultánea.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, en el que la suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización del material que contiene almidón.
- 20 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el producto de fermentación es un alcohol.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el material de partida que contiene almidón son granos enteros.
- 25 6. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que las células bacterianas son células de bacterias gram-positivas del género. *Lactobacillus*.
- 30 7. Proceso según la reivindicación 6, en el que la(s) célula(s) bacteriana(s) del género *Lactobacillus* se selecciona(n) del grupo de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y/o *Lactobacillus rhamnosus*, o mezclas de una o más de las mismas.
8. Proceso según la reivindicación 4, en el que el producto de fermentación es etanol.

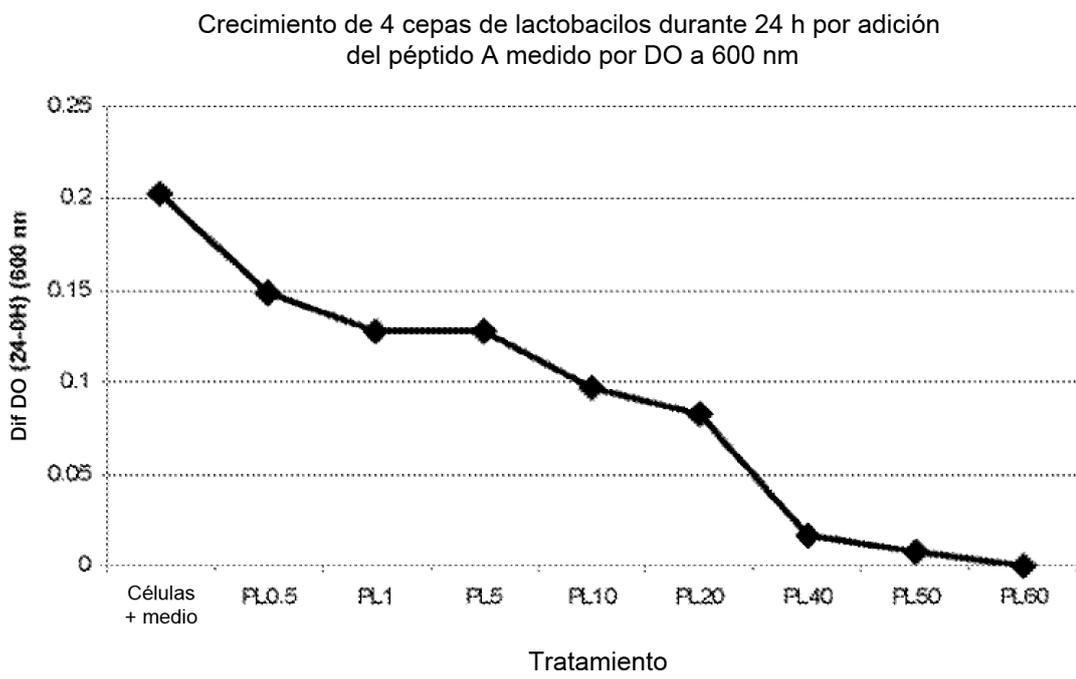


Fig. 1

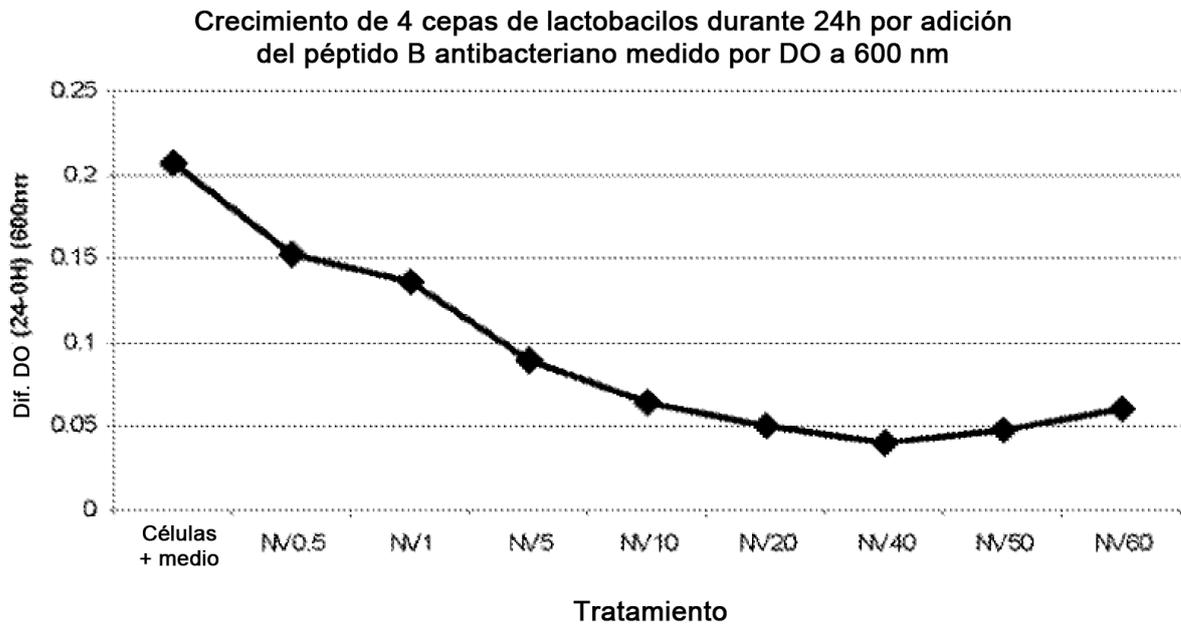


Fig. 2

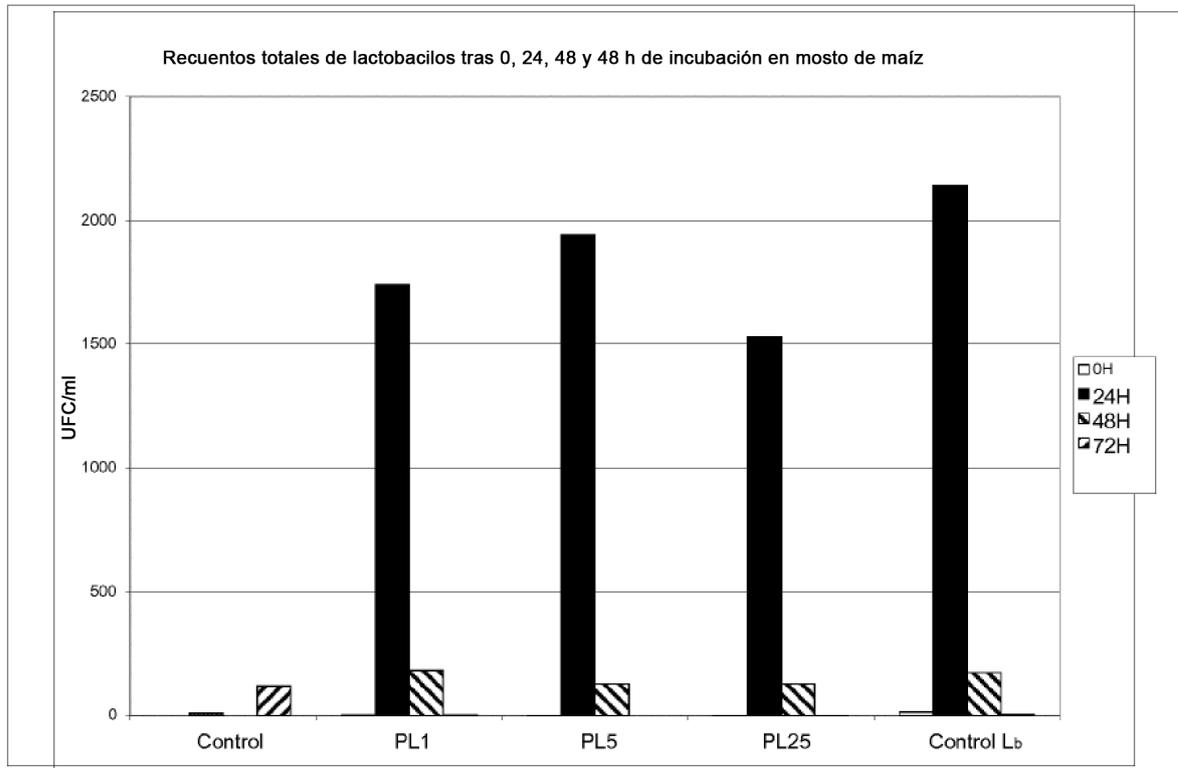


Fig. 3

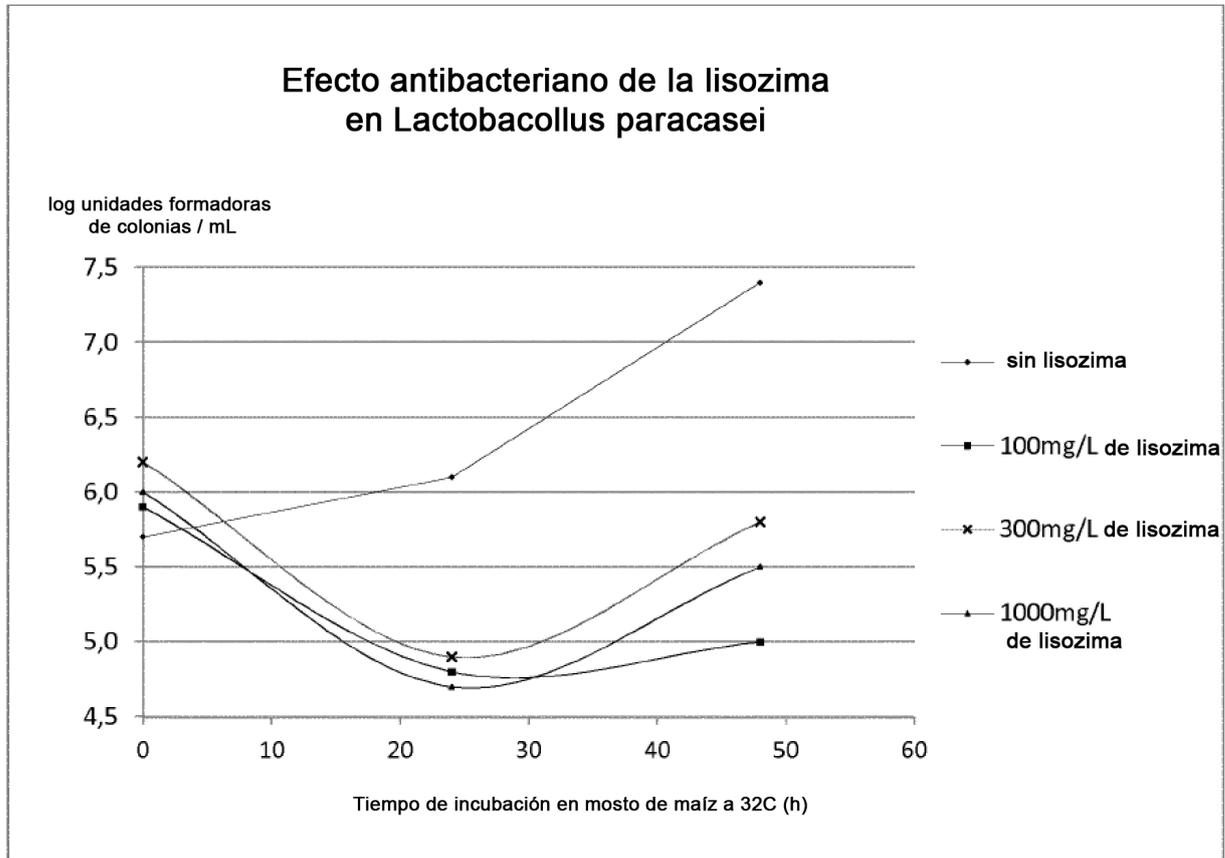


Fig. 4