

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 203**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

B01D 17/02 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2014 PCT/US2014/043392**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14209789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2014 E 14817743 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3013968**

54 Título: **Proceso de extracción de aceite a partir de vinaza diluida**

30 Prioridad:

24.06.2013 US 201361838650 P
08.08.2013 US 201361863727 P
24.02.2014 US 201461943794 P
12.05.2014 US 201461991866 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KREEL, NATHANIAL y
JUMP, JOSEPH

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 754 203 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

Proceso de extracción de aceite a partir de vinaza diluida

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 [0001] La presente invención se refiere a procesos de extracción/recuperación de aceite a partir de vinaza diluida y/o jarabe en la etapa final de un proceso de producción de productos de fermentación basado en material que contiene almidón.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 [0002] Los productos de fermentación, tal como el etanol, se producen típicamente moliendo primero material que contiene almidón en un proceso de molienda seca o de molienda húmeda, degradando luego el material en azúcares fermentables usando enzimas y finalmente convirtiendo los azúcares directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado usando un organismo fermentador. Los productos de fermentación líquidos se recuperan del mosto fermentado (a menudo conocido como "mosto de cerveza"), por ejemplo, por destilación, que separa el producto de fermentación deseado de otros líquidos y/o sólidos. La fracción restante se conoce como "vinaza entera". La vinaza entera se deshidrata y se separa en un sólido y una fase líquida, por ejemplo, por
- 15 centrifugación. La fase sólida se conoce como "torta húmeda" (o "granos húmedos") y la fase líquida (sobrenadante) se conoce como "vinaza diluida". La torta húmeda y la vinaza diluida contienen aproximadamente un 35 y un 7% de sólidos, respectivamente. La torta húmeda deshidratada se seca para proporcionar "residuo seco de destilería" (DDG) usado como nutriente en pienso para animales. La vinaza diluida se evapora típicamente para proporcionar producto de condensación y jarabe o puede alternativamente reciclarse directamente al tanque de lodo como "agua de proceso". El producto de condensación puede o enviarse a un metanizador antes de ser descargado o puede
- 20 reciclarse al tanque de lodo. El jarabe se puede mezclar con el DDG o añadirse a la torta húmeda antes del secado para producir DDGS (residuo seco de destilería con solubles). Un número en aumento de plantas de etanol extraen aceite de la vinaza diluida y/o jarabe/fase central evaporada como un subproducto para usar en la producción de biodiésel u otros productos biorrenovables.
- 25 [0003] Mucho del trabajo en la recuperación/extracción de aceite de procesos de producción de productos de fermentación se ha enfocado en la mejora de la extractibilidad del aceite de la vinaza diluida. La eliminación eficaz de aceite se realiza a menudo por extracción con hexano. Sin embargo, la utilización de extracción con hexano no ha tenido aplicación general debido a la alta inversión de capital requerida. Por lo tanto, se han explorado otros procesos que mejoran la extracción de aceite a partir de procesos de producción de productos de fermentación.
- 30 [0004] WO 2011/126897 (Novozymes) describe procesos de recuperación de aceite convirtiendo materiales que contienen almidón en dextrinas con alfa-amilasa; sacarificando con una enzima generadora de fuentes de carbohidratos para formar azúcares; fermentando los azúcares usando un organismo fermentador; donde el medio de fermentación comprende una hemicelulasa; destilando el producto de fermentación para formar vinaza entera; separando la vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda; y recuperando aceite de la vinaza diluida. El medio
- 35 de fermentación puede comprender además una proteasa.
- [0005] WO 2012/088303 (Novozymes) describe procesos para producir productos de fermentación, tal como el etanol, incluida la licuefacción de material que contiene almidón con una alfa-amilasa termoestable y opcionalmente una proteasa, por ejemplo, una derivada de *Pyrococcus furiosus*.
- 40 [0006] Es un objeto de la presente invención proporcionar procesos mejorados para aumentar la cantidad de aceite recuperable de procesos de producción de productos de fermentación.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- [0007] El objeto de la presente invención es proporcionar procesos mejorados de extracción o recuperación de aceite en la etapa final de un proceso de producción de productos de fermentación, tal como especialmente un proceso de producción de etanol.
- 45 [0008] Por lo tanto, en el primer aspecto, la invención se refiere a procesos de recuperación de aceite, que comprenden

(a) la conversión de un material que contiene almidón en dextrinas con una alfa-amilasa;

- (b) la sacarificación de las dextrinas usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos para formar un azúcar;
- (c) la fermentación del azúcar en un medio de fermentación en un producto de fermentación usando un organismo fermentador;
- (d) la recuperación del producto de fermentación para formar una vinaza entera;
- (e) la separación de la vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda;
- (e') la concentración opcional de la vinaza diluida en jarabe;
- (f) la recuperación de aceite de la vinaza diluida y/u opcionalmente el jarabe, donde una proteasa que tiene al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 4 y tiene un valor de termoestabilidad superior al 50% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C está presente y/o se añade durante las etapas (d)-(e').

[0009] En una forma de realización, la temperatura en la etapa (a) está por encima de la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 80-90°C, tal como alrededor de 85°C. Las etapas (b) y (c) se pueden realizar simultánea o secuencialmente. En una forma de realización, las etapas (a), (b) y (c) se realizan simultánea o secuencialmente. Cuando las etapas (a), (b) y (c) se realizan simultáneamente, la temperatura está por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 25-40°C, preferiblemente alrededor de 32°C en caso de la producción de productos de fermentación tales como el etanol.

[0010] En una forma de realización preferida, la proteasa está presente en o se añade a la vinaza entera en la etapa (d) y/o a la vinaza diluida después de separar la vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda en la etapa (e), y/o al jarabe en la etapa (e'). En tales ejemplos de realización, la etapa (a) se puede realizar a temperaturas a o sobre la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 80-90°C, o por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 25-40°C. En una forma de realización preferida, el aceite se recupera de la vinaza diluida y/o jarabe/fase central evaporada, por ejemplo, por extracción, tal como extracción con hexano o usando otra tecnología de recuperación de aceite bien conocida en la técnica.

[0011] La proteasa puede ser cualquier proteasa con al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 4 y con un valor de termoestabilidad, tal y como se define en la presente, de más del 50% determinado como actividad relativa. La determinación de la "actividad relativa" y la "actividad residual" se determina como se describe en el ejemplo 1. En una forma de realización, la proteasa tiene un valor de termoestabilidad de más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

[0012] En otra forma de realización preferida, la proteasa usada en un proceso de la invención es una proteasa termoestable derivada de la bacteria, por ejemplo, clasificada como EC 3.4.21.62, tal como *Pyrococcus furiosus*, como la proteasa mostrada en la SEQ ID NO: 4 o una con una identidad de secuencia con la misma de al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%.

[0013] Según la invención, la proteasa usada en un proceso de la invención tiene un valor de termoestabilidad de más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C para la recuperación de aceite a partir de vinaza diluida y/o jarabe en la etapa final de un proceso de producción de productos de fermentación basado en material que contiene almidón.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

[0014]

La figura 1 muestra esquemáticamente un proceso de producción de etanol. El aceite puede recuperarse/extraerse durante y/o después de la licuefacción (etapa (a)), de la vinaza diluida y/o el jarabe/fase central. Las cajas en la figura indican donde se puede recuperar/extraer el aceite.

La figura 2 muestra el % de aceite extraído de la vinaza entera para el control (sin proteasa), la proteasa PF, la proteasa RH, la proteasa TA y la proteasa TA 196, la proteasa TF.

La figura 3 muestra el % de aceite extraído de mosto de maíz licuado para el control y la proteasa PF.

La figura 4 muestra el % de extracción de aceite de jarabe para el control (sin proteasa), la proteasa PF, la proteasa RH, la proteasa TA y la proteasa TA 196, la proteasa TF.

La figura 5 muestra el % de aceite en el mosto de maíz licuado (licor) para el control (sin proteasa), la proteasa PF, la proteasa RH, la proteasa TA, la proteasa TA196 y la proteasa TF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0015] El objeto de la presente invención es proporcionar procesos mejorados de extracción o recuperación de aceite en la etapa final de un proceso de producción de productos de fermentación, tal como especialmente un proceso de producción de etanol.

5 [0016] Por lo tanto, en el primer aspecto, la invención se refiere a procesos de recuperación de aceite, que comprende

- (a) la conversión de un material que contiene almidón en dextrinas con una alfa-amilasa;
- (b) la sacarificación de las dextrinas usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos para formar un azúcar;
- 10 (c) la fermentación del azúcar en un medio de fermentación en un producto de fermentación usando un organismo fermentador;
- (d) la recuperación del producto de fermentación para formar una vinaza entera;
- (e) la separación de la vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda;
- (e') la concentración opcional de la vinaza diluida en jarabe;
- 15 (f) la recuperación de aceite de la vinaza diluida y/u opcionalmente el jarabe, donde una proteasa que tiene al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 4 y tiene un valor de termoestabilidad superior al 50% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C está presente y/o se añade durante las etapas (d)-(e').

[0017] En una forma de realización, la temperatura en la etapa (a) está por encima de la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 80-90°C, tal como alrededor de 85°C. En una forma de realización, la etapa (a) se realiza como una etapa de licuefacción seguida de las etapas (b) y (c) realizadas o simultánea o secuencialmente. En una forma de realización preferida, las etapas (b) y (c) se realizan como una etapa de sacarificación y fermentación simultáneas (es decir, SSF).

[0018] En una forma de realización, las etapas (a), (b), y (c) se realizan simultáneamente. Esto se hace típicamente a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, es decir, un proceso de hidrólisis de almidón crudo (RSH). Sin embargo, las etapas (a), (b), y (c) también se pueden realizar secuencialmente. En tales ejemplos de realización, la etapa (a) se puede realizar a temperaturas a o por encima de la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 80-90°C, o por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, tal como entre 25-40°C, tal como alrededor de 32°C.

[0019] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura más baja a la cual comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y la puede determinar fácilmente la persona experta en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de planta, la variedad particular de la especie de planta, así como con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón dado es la temperatura a la cual la birrefringencia se pierde en el 5% de los gránulos de almidón usando el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., Starch/Stärke, Vol. 44 (12) págs. 461-466 (1992).

[0020] Según la invención, la proteasa está presente y/o se añade en la etapa final de un proceso de producción de productos de fermentación, tal como un proceso de producción de etanol, preferiblemente a la vinaza entera y/o jarabe/fase central evaporada, incluido un proceso de producción de producto de etanol convencional, que incluía una etapa de licuefacción, por ejemplo, la etapa (a) realizada a altas temperaturas, tal como a temperaturas a o por encima de las temperaturas de gelatinización inicial, tal como a temperaturas entre 80-90°C, a un pH entre 4,5 y 6,0, seguido de una sacarificación y fermentación simultáneas (por ejemplo, las etapas (b) y (c)) realizadas a una temperatura entre 25-40°C, tal como alrededor de 32°C, si el producto de fermentación es etanol o similar.

[0021] En otra forma de realización, la proteasa está presente y/o se añade en la etapa final de un proceso de producción de productos de fermentación, tal como un proceso de producción de etanol, preferiblemente a la vinaza entera y/o jarabe, donde se sacarifica y fermenta simultáneamente almidón granulado a temperaturas inferiores a las temperaturas de gelatinización inicial, tal como a temperaturas entre 25-40°C, a un pH entre 4,5 y 6,0, es decir, las etapas (a), (b) y (c) se realizan simultáneamente.

[0022] En una forma de realización preferida, la proteasa está presente en o se añade a la vinaza entera en la etapa (d) y/o a la vinaza diluida después de la separación de la vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda en la etapa (e), y/o al jarabe en la etapa (e'). En una forma de realización preferida, el aceite se recupera de la vinaza diluida y/o el jarabe/fase central evaporada, por ejemplo, por extracción, tal como extracción con hexano o usando otra tecnología de recuperación de aceite bien conocida en la técnica.

[0023] Según la invención, la proteasa tiene un valor de termoestabilidad de más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

[0024] Según la invención, la proteasa es una proteasa termoestable derivada de la bacteria *Pyrococcus furiosus*, como la proteasa mostrada en la SEQ ID NO: 4, o una con una identidad de secuencia con la misma de al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%.

[0025] La proteasa de *Pyrococcus furiosus* mostrada en la SEQ ID NO: 4 es en la presente una proteasa bacteriana termoestable. Se ha descubierto que un producto de proteasa de *Pyrococcus furiosus* comercial (Pfu S) de Takara Bio Inc. (Japón) tiene un valor de termoestabilidad del 110% (80°C/70°C) y el 103% (90°C/70°C) a pH 4,5 determinado como se describe en el ejemplo 1 en la presente.

[0026] En una forma de realización, la proteasa es una proteasa termoestable derivada de la bacteria *Pyrococcus furiosus*, como la proteasa mostrada en la SEQ ID NO: 4 en la presente, o una con una identidad de secuencia con la misma de al menos un 90%, y donde la proteasa tiene un valor de termoestabilidad de más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinado como actividad relativa a 80°C/70.

[0027] En una forma de realización, la proteasa es una proteasa termoestable derivada de la bacteria *Pyrococcus furiosus*, como la proteasa mostrada en la SEQ ID NO: 4 en la presente, o una con una identidad de secuencia con la misma de al menos un 95%, y donde la proteasa tiene un valor de termoestabilidad de más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinado como actividad relativa a 80°C/70.

[0028] En una forma de realización la proteasa es una proteasa termoestable derivada de la bacteria *Pyrococcus furiosus*, como la proteasa mostrada en la SEQ ID NO: 4 en la presente, o una con una identidad de secuencia con la misma de al menos un 99%, y donde la proteasa tiene un valor de termoestabilidad de más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinado como actividad relativa a 80°C/70.

[0029] Cuando la etapa (a) se realiza como una etapa de licuefacción a altas temperaturas, es decir, por encima de la temperatura de gelatinización inicial, tal como a temperaturas entre 80-90°C, tal como alrededor de 85°C, la alfa-amilasa puede ser una alfa-amilasa bacteriana. En una forma de realización, el pH en la etapa (a) es de 4-7, preferiblemente 4,5-6.

[0030] En una forma de realización, una etapa de cocción por chorro se realiza antes en la etapa (a). La cocción por chorro se puede realizar a una temperatura entre 95-140°C durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos.

[0031] En una forma de realización preferida, un proceso de la invención comprende, además, antes de la etapa (a), las etapas de:

- i) reducción del tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por molienda seca;
- ii) formación de un lodo que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0032] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa bacteriana deriva del género *Bacillus*, tal como una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular una variante de una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, tal como la mostrada en la SEQ ID NO: 3 en WO 99/019467 o la SEQ ID NO: 1 en la presente, en particular una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncada para tener de 485 a 495 aminoácidos, tal como alrededor de 491 aminoácidos.

[0033] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa bacteriana se selecciona del grupo de variantes de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que comprenden una delección doble, tal como I181*+G182*, o I181*+G182*+N193F (usando la SEQ ID NO: 1 para la numeración).

[0034] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa bacteriana se selecciona del grupo de variantes de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*:

- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E;
- 181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- I181*+G182*+N193F +V59A Q89R+ E129V+ K177L+ R179E+ Q254S+ M284V; y
- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando la SEQ ID NO: 1 para la numeración).

[0035] La alfa-amilasa de *Bacillus stearotheophilus* parental puede ser la mostrada en la SEQ ID NO: 1 o puede ser una con una identidad de secuencia con la misma de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%.

[0036] Una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearotheophilus* puede ser una variante de la mostrada en la SEQ ID NO: 1 o puede ser una con una identidad de secuencia con la misma de al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, pero menos del 100%. En una forma de realización, la variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearotheophilus* tiene de 1 a 12 mutaciones, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 mutaciones, en comparación con la alfa-amilasa parental, especialmente la alfa-amilasa parental mostrada en la SEQ ID NO: 1.

[0037] La etapa (a) es seguida de la sacarificación de dextrinas en la etapa (b). Sin embargo, un proceso de la invención puede comprender además una etapa de presacarificación, es decir, después de la etapa (a), pero antes de la etapa de sacarificación (b), realizada durante 40-90 minutos a una temperatura de entre 30-65°C.

[0038] Según la invención, la sacarificación se realiza a una temperatura de 20-75°C, preferiblemente de 40-70°C, tal como alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5.

[0039] En una forma de realización preferida, la etapa de fermentación (c) o sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) (es decir, las etapas combinadas (b) y (c)) se realiza a una temperatura de 25°C a 40°C, tal como a partir de 28°C a 35°C, tal como a partir de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 32°C. En una forma de realización, la etapa de fermentación (c) o sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) (es decir, las etapas combinadas (b) y (c)) están en curso durante 6 a 120 horas, en particular de 24 a 96 horas. En una forma de realización, la etapa de conversión de material que contiene almidón (a), la etapa de sacarificación (b) y la etapa de fermentación (c) se realizan simultánea o secuencialmente. En una forma de realización, la etapa de conversión de material que contiene almidón (a) se realiza a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, preferiblemente de 20 a 60°C, tal como 25-40°C, tal como alrededor de 30-34°C, tal como alrededor de 32°C. En una forma de realización, el material que contiene almidón se convierte a dextrinas y las dextrinas se sacarifican a un azúcar tratando el material que contiene almidón con una alfa-amilasa y una glucoamilasa por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del material que contiene almidón. En una forma de realización, la conversión del material que contiene almidón a dextrinas, la sacarificación de las dextrinas a azúcares y la fermentación de los azúcares se realizan en una única etapa (es decir, una etapa de hidrólisis de almidón crudo). Cuando el proceso de la invención se realiza como un proceso de hidrólisis de almidón crudo (es decir, un proceso de etapa única o proceso sin cocción), la glucoamilasa puede derivar preferiblemente de una cepa de *Trametes*, tal como una cepa de *Trametes cingulata*, o una cepa de *Althelia*, tal como una cepa de *Athelia rolfsii*. Las alfa-amilasas preferidas usadas en un proceso de hidrólisis de almidón crudo incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa *Rhizomucor*, tal como una cepa de *Rhizomucor pusillus*, tal como una alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un dominio de unión al almidón (SBD), tal como una alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un conector y un SBD de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Generalmente, el material que contiene almidón en los procesos de hidrólisis de almidón crudo (es decir, procesos sin cocción) es almidón granulado. Se puede reducir el tamaño de partícula de dicho almidón granulado, preferiblemente por molienda, de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm. Además, el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se puede mantener por debajo del 6 % en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente el 3 % en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente el 2 % en peso, más preferiblemente por debajo de aproximadamente el 1 % en peso, aún más preferiblemente por debajo de aproximadamente el 0,5%, o aún más preferiblemente del 0,25 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente el 0,1 % en peso. El pH puede ser de 4-7, preferiblemente 4,5-6,0, cuando la conversión del material que contiene almidón a dextrinas, la sacarificación de las dextrinas a un azúcar y la fermentación del azúcar se realizan en una etapa única.

[0040] Si el proceso de la invención se realiza como un proceso convencional (es decir, la etapa (a) se realiza como una etapa de licuefacción a una temperatura sobre la temperatura de gelatinización), la enzima generadora de fuentes de carbohidratos usada en la etapa (b) es preferiblemente una glucoamilasa derivada de *Aspergillus*, preferiblemente *A. niger*, *A. awamori* o *A. oryzae*; o una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma reesei*; o una cepa de *Talaromyces*, preferiblemente *Talaromyces emersonii*, o una cepa de *Pycnoporus*, o una cepa de *Gloephyllum*.

[0041] Ejemplos de otras glucoamilasas adecuadas se pueden encontrar debajo en la sección de "glucoamilasas" a continuación.

[0042] Generalmente, el material que contiene almidón en la etapa (a), incluido el almidón granulado, contiene un 20-55 % en peso de sólidos secos, preferiblemente un 25-40 % en peso de sólidos secos, más preferiblemente un 30-35% de sólidos secos.

[0043] En una forma de realización de la invención, la proteasa está presente en o se añade a la vinaza entera en la etapa (d) y/o la vinaza diluida, en la etapa (e) o después de la separación en la etapa (e), y/o el jarabe en la etapa (e'). La separación (es decir, la deshidratación) en la etapa (e) se puede realizar por centrifugación, preferiblemente usando un decantador centrífugo, filtración, usando preferiblemente un filtro prensa, una prensa de tornillo, una prensa de placas y marcos, un espesador o mesa de espesamiento por gravedad o cualquier otra tecnología de separación conocida en la técnica. En una forma de realización, el material que contiene almidón es un cereal. En una forma de realización, el material que contiene almidón se selecciona del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, mandioca, sorgo, centeno, patata, judías, sorgo, guisantes, arroz, sagú, boniatos, tapioca o cualquier combinación de los mismos.

[0044] El producto de fermentación (deseado) puede, en una forma de realización, seleccionarse del grupo que consiste en 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 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); y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación (deseado) es etanol.

[0045] Según la invención, el producto de fermentación deseado se puede recuperar por destilación. Según la invención, se puede recuperar aceite de la vinaza diluida y/o jarabe/fase central evaporada, por ejemplo, por extracción, tal como extracción con hexano.

[0046] En una forma de realización preferida, la proteasa deriva de una cepa de *Pyrococcus*, preferiblemente una cepa de *Pyrococcus furiosus*, tal como la mostrada en la SEQ ID NO: 1 en US 6,258,726 o la SEQ ID NO: 4 en la presente. En una forma de realización, la proteasa tiene al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 96%, tal como al menos un 97%, tal como al menos un 98%, tal como al menos un 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 en la presente.

Separación (deshidratación) de vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda en la etapa (e)

[0047] La separación de vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda en la etapa (e), para eliminar una porción significativa del líquido/agua, se puede realizar usando cualquier técnica de separación adecuada, incluidas la centrifugación, el prensado y la filtración. En una forma de realización preferida, la separación/deshidratación se realiza por centrifugación. Las centrifugadoras preferidas en la industria son las centrifugadoras de tipo decantador, preferiblemente las centrifugadoras de tipo decantador de alta velocidad. Un ejemplo de una centrifugadora adecuada es la serie de cono inclinado NX 400 de Alfa Laval que es un decantador de alto rendimiento. En otra forma de realización preferida, la separación se realiza usando otro equipo de separación convencional tal como unas prensas filtro de placas/marcos, prensas filtro de correa, prensas de tornillo, espesadores y mesas de espesamiento por gravedad, o equipos similares.

Secado de la torta húmeda

[0048] Después de que la torta húmeda, que contiene aproximadamente un 30-35 % en peso de sólidos secos, se haya separado de la vinaza diluida (por ejemplo, deshidratado) se puede secar en un secador de tambor, secador por atomización, secador de anillo, secador de lecho fluido o similar para producir "residuo seco de destilería" (DDG). El DDG es un ingrediente de pienso valioso para el ganado, las aves y los peces. Se prefiere proporcionar DDG con un contenido inferior a aproximadamente un 10-12 % en peso de humedad para evitar el moho y la descomposición microbiana y aumentar el tiempo de conservación. Además, el alto contenido de humedad también hace más costoso transportar el DDG. La torta húmeda se seca preferiblemente bajo condiciones que no desnaturalizan las proteínas en la torta húmeda. La torta húmeda se puede mezclar con jarabe separado de la vinaza diluida y secar en DDG con solubles (DDGS).

Organismos fermentadores

[0049] Los ejemplos de organismos fermentadores usados en la etapa (c) para fermentar azúcares en un medio de fermentación en un producto de fermentación deseado incluyen organismos fúngicos, tal como especialmente levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

- 5 [0050] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade al medio de fermentación, de modo que el recuento por ml de organismo fermentador viable, tal como levadura, del medio de fermentación está en el rango de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , especialmente aproximadamente 5×10^7 .

- 10 [0051] 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 (disponible de Gert Strand AB, Suecia), y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

Materiales que contienen almidón

- 15 [0052] Cualquier material que contiene almidón adecuado se puede usar según la presente invención. El material de partida se selecciona generalmente en función del producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales que contienen almidón, adecuados para usar en un proceso de la invención, incluyen granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judías, o boniatos, o mezclas de los mismos o almidones derivados de los mismos, o cereales. También se contemplan tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

20 Productos de fermentación

- 25 [0053] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye una etapa de fermentación usando un organismo fermentador. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H_2 y CO_2); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos incluyen cervezas *ale*, cervezas *stout*, cervezas *porter*, cervezas *lager*, bíteres, licores de malta, cervezas *happoushu*, cerveza con alto contenido de alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólica. El producto de fermentación, tal como el etanol, obtenido según la invención, puede preferiblemente usarse como combustible, que se mezcla típicamente con gasolina. Sin embargo, en el caso del etanol también se puede usar como etanol potable.
- 35

Recuperación

- 40 [0054] Después de la fermentación, el producto de fermentación, tal como el etanol, se puede separar del medio de fermentación, por ejemplo, por destilación. Alternativamente, el producto de fermentación deseado puede extraerse del medio de fermentación por técnicas de microfiltración o filtración con membrana. El producto de fermentación también se puede recuperar por arrastre con vapor u otro método bien conocido en la técnica.

ENZIMAS

[0055] Una o más de las siguientes actividades enzimáticas se pueden usar según la invención.

Proteasas

- 45 [0056] Según la invención, una proteasa termoestable (como se define en la presente) puede estar presente o añadirse durante las etapas (d)-(e').

[0057] La proteasa puede ser de cualquier origen siempre y cuando tenga un valor de termoestabilidad tal y como se define en la presente de más del 20% y el ejemplo 1. En una forma de realización, la proteasa es de origen

fúngico. En otra forma de realización, la proteasa es de origen bacteriano. Según la invención, la proteasa tiene una termoestabilidad de más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinada como actividad relativa a 80°C/70°C.

- 5 [0058] En otra forma de realización, la proteasa tiene un valor de termoestabilidad entre 50 y 115%, tal como entre 50 y 70%, tal como entre 50 y 60%, tal como entre 100 y 120%, tal como entre 105 y 115%, determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

Proteasas bacterianas

[0059] En una forma de realización, la proteasa es de origen bacteriano.

- 10 [0060] En una forma de realización preferida, la proteasa deriva de una cepa de *Pyrococcus*, preferiblemente una cepa de *Pyrococcus furiosus*.

[0061] En una forma de realización preferida, la proteasa es la mostrada en la SEQ ID NO: 1 en US 6,258,726 o la SEQ ID NO: 4 en la presente.

- 15 [0062] Según la invención, la proteasa tiene al menos un 80%, tal como al menos un 85%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 96%, tal como al menos un 97%, tal como al menos un 98%, tal como al menos un 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 en US 6,258,726 o la SEQ ID NO: 4 en la presente.

- 20 [0063] En una forma de realización, la proteasa está presente y/o se añade en una cantidad eficaz en la etapa (a) o cualquiera de las etapas (d)-(e'). En una forma de realización de la invención, la proteasa se añade en una concentración de 0,01-100, tal como 0,1-10 micro g/g DS.

Alfa-amilasas

[0064] El método de la invención, incluida la etapa (a), se puede realizar usando cualquier alfa-amilasa adecuada. En una forma de realización preferida, se puede usar una alfa-amilasa bacteriana y/o una alfa-amilasa fúngica.

- 25 [0065] En una forma de realización, la alfa-amilasa es bacteriana cuando la etapa (a) se realiza como una etapa de licuefacción a altas temperaturas, es decir, por encima de la temperatura de gelatinización inicial,

[0066] En una forma de realización, la alfa-amilasa es fúngica cuando la etapa (a) se realiza a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, tal como cuando las etapas (a), (b) y (c) se realizan como una hidrólisis de almidón crudo (proceso de etapa única o proceso sin cocción) como se ha descrito anteriormente.

Alfa-amilasas bacterianas

- 30 [0067] Ejemplos de alfa-amilasas bacterianas adecuadas incluyen las mencionadas a continuación. Las alfa-amilasas bacterianas preferidas usadas en la etapa (a) pueden derivar de una cepa el género *Bacillus* (a veces denominado *Geobacillus*), incluida una cepa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. Otras alfa-amilasas bacterianas incluyen una alfa-amilasa derivada de una cepa de las *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas las cuales se describen en
35 detalle en WO 95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31.

- [0068] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o un híbrido, 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. Se describen variantes de alfa-amilasa específicamente contempladas en las patentes de EE.UU. Nos. 6,093,562, 6,297,038 o la patente de EE.UU. n.º 6,187,576 e incluyen variantes de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con una delección de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, 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 NO: 3 descrita en WO 99/19467 o la delección de los
45 aminoácidos R179 y G180 usando la SEQ ID NO: 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 tienen una delección doble correspondiente a delta(181-182) y además comprenden una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID NO: 3 descrita en WO 99/19467.

5 [0069] En una forma de realización, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* es una descrita en WO 2011/082425, tal como una seleccionada del grupo de:

- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E;
- I181*+G182*+N 193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+Q254S+M284V; y
- 10 - I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando la SEQ ID NO: 1 en la presente para la numeración).

[0070] En una forma de realización, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* tiene las mutaciones siguientes: 181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+Q254S+M284V (SEQ ID NO: 1).

15 [0071] La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncada se trunca por lo general naturalmente para tener aproximadamente 491 aminoácidos de largo, tal como de 485 a 495 aminoácidos de largo.

[0072] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEQ ID NO: 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 NO: 5 de WO 99/19467), con la siguiente sustitución: 20 G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (usando la numeración de la SEQ ID NO: 4 en WO 99/19467). Especialmente preferidas son las variantes que tienen una o más de las mutaciones H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o una delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente la delección de E178 y G179 (usando la numeración de la SEQ ID NO: 5 de WO 99/19467).

25 [0073] Los productos de alfa-amilasa bacteriana disponibles comercialmente y los productos que contienen alfa-amilasas incluyen TERMAMYL™ SC, LIQUOZYME™ SC, BAN (Novozymes A/S, Dinamarca) DEX-LO™, SPEZYME™ XTRA, SPEZYME™ AA, SPEZYME FRED-L, SPEZYME™ ALPHA, GC358, SPEZYME RSL, SPEZYME HPA y SPEZYME™ DELTA AA (de DuPont, EE.UU.), FUELZYME™ (Verenium, EE.UU.).

30 [0074] Una alfa-amilasa bacteriana se puede añadir en la etapa (a) en cantidades bien conocidas en la técnica. Cuando se mide en unidades KNU (descritas abajo en la sección "materiales y métodos"), la actividad de alfa-amilasa está preferiblemente presente en una cantidad de 0,5-5.000 NU/g DS, en una cantidad de 1-500 NU/g DS, o más preferiblemente en una cantidad de 5-1.000 NU/g DS, tal como 10-100 NU/g DS.

Alfa-amilasas fúngicas

[0075] Las alfa-amilasas fúngicas (EC 3.2.1.1) son preferiblemente de origen de hongo filamentoso. La alfa-amilasa fúngica puede ser una alfa-amilasa fúngica ácida.

35 [0076] Las alfa-amilasas fúngicas ácidas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tal como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*.

[0077] Una alfa-amilasa fúngica preferida es una alfa-amilasa similar a Fungamyl que deriva preferiblemente de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente descripción, el término "alfa-amilasa similar a Fungamyl" indica una alfa-amilasa que presenta una alta identidad, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85% más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso el 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 en WO 96/23874. 40

[0078] Otra alfa-amilasa ácida preferida deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *A. niger* divulgada como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el n.º de acceso primario P56271 y descrita con más detalle en WO 89/01969 (ejemplo 3). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* se muestra también como la SEQ ID NO: 1 en WO 2004/080923 (Novozymes). Además, se contemplan las variantes de dicha amilasa fúngica ácida con al menos un 70% de identidad, tal como al menos un 80% o incluso al menos un 90% de identidad, tal 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 NO: 1 en WO 2004/080923. Una alfa-amilasa fúngica ácida adecuada disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca). 45 50

[0079] La alfa-amilasa fúngica ácida 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 fúngica ácida de tipo salvaje deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

- 5 [0080] Composiciones disponibles comerciales que comprenden alfa-amilasa fúngica incluyen FUNGAMYL™ y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0081] En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas fúngicas híbridas incluyen aquellas descritas en WO 2005/003311 o la publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0054071 (Novozymes) o la publicación de patente de EE.UU. n.º 2006/0148054 o la solicitud de patente de EE.UU. n.º 60/638,614 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico (CD) de alfa-amilasa y un dominio/módulo de unión a carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón, y opcionalmente un conector.

[0082] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la tabla 1 a 5 de los ejemplos en la solicitud de patente de EE.UU. también pendiente n.º 60/638,614, incluyendo la variante de Fungamyl con el dominio catalítico JA118 y el SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 2 en la presente y SEQ ID NO: 100 en US 60/638,614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con el conector y el SBD de la AMG de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 3 en la presente y SEQ ID NO: 101 en US 60/638,614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con el conector y el SBD de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (que se describe en la tabla 5 como una combinación de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 96 en la solicitud de EE.UU. n.º 11/316,535 y además como la SEQ ID NO: 13 en la presente), y la alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con el conector y el SBD de la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 4 en la presente y SEQ ID NO: 102 en US 60/638,614). Otras alfa-amilasas híbridas específicamente contempladas son cualquiera de aquellas enumeradas en las tablas 3, 4, 5 y 6 en el ejemplo 4 en la solicitud de EE.UU. n.º 11/316,535 o (WO 2006/069290). Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0054071, incluyendo aquellas descritas en la tabla 3 en la página 15, tal como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con un conector y un dominio de unión al almidón de *Aspergillus kawachii*. Se pueden añadir alfa-amilasas ácidas según la invención en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente de 0,10 a 5 AFAU/g DS, especialmente de 0,3 a 2 AFAU/g DS.

[0083] Se pueden añadir alfa-amilasas fúngicas a la etapa (a) en una cantidad eficaz bien conocida, preferiblemente en el rango de 0,001-1 mg de proteína enzimática por g de DS (en la vinaza entera), preferiblemente 0,01-0,5 mg de proteína enzimática por g de DS.

Enzima generadora de fuentes de carbohidratos

[0084] Según la invención, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa, puede estar presente y/o se puede añadir durante la etapa de sacarificación (b) o la sacarificación y fermentación simultáneas.

[0085] El término "enzima generadora de fuentes de carbohidratos" incluye cualquier enzima generadora de azúcares fermentables. Una enzima generadora de fuentes de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que puede ser usada como una fuente de energía por el organismo fermentador/los organismos fermentadores en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como el etanol. Los carbohidratos generados se pueden convertir directa o indirectamente al producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención, puede usarse una mezcla de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos. Los ejemplos específicos incluyen glucoamilasa (que son generadoras de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (que son generadoras de maltosa).

[0086] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es una glucoamilasa.

Glucoamilasas

[0087] El proceso de la invención, incluyendo la etapa (b), se puede realizar usando cualquier glucoamilasa adecuada. En una forma de realización preferida, la glucoamilasa es de origen bacteriano o fúngico.

[0088] Las glucoamilasas contempladas incluyen aquellas 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), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como las descritas en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca);

la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, la glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con una 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; y la introducción de residuos de Pro en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Eng. 10, 1199-1204).

[0089] Otras glucoamilasas contempladas incluyen la glucoamilasa derivada de una cepa de *Athelia*, preferiblemente una glucoamilasa de una cepa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (véase la patente de EE.UU. n.º 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. n.º Re. 32,153), *Talaromyces dupontii*, *Talaromyces thermophilus* (patente de EE.UU. n.º 4,587,215). También contempladas son las glucoamilasas de *Trichoderma reesei* divulgadas como la SEQ ID NO: 4 en WO 2006/060062 y glucoamilasas que son al menos un 80% o al menos un 90% idénticas a las mismas y además la glucoamilasa derivada de *Humicola grisea* divulgada como la SEQ ID NO: 3 en US 10/992,187 o secuencias que tienen al menos un 80% o al menos un 90% de identidad con la misma.

[0090] En una forma de realización preferida, la glucoamilasa deriva de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente *A. niger*, *A. awamori* o *A. oryzae*; o una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente *T. reesei*; o una cepa de *Talaromyces*, preferiblemente *T. emersonii*.

[0091] En una forma de realización, la glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación es de origen fúngico, preferiblemente de una cepa de *Pycnoporus*, o una cepa de *Gloeophyllum*.

[0092] En una forma de realización, la glucoamilasa deriva de una cepa del género *Pycnoporus*, en particular una cepa de *Pycnoporus sanguineus* descrita en WO 2011/066576 (SEQ ID NO 2, 4 o 6), tal como la mostrada como SEQ ID NO: 4 en WO 2011/066576 o SEQ ID NO: 18 en la presente.

[0093] En una forma de realización, la glucoamilasa deriva de una cepa del género *Gloeophyllum*, tal como una cepa de *Gloeophyllum sepiarium* o *Gloeophyllum trabeum*, en particular una cepa de *Gloeophyllum* como se describe en WO 2011/068803 (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16). En una forma de realización preferida, la glucoamilasa es la *Gloeophyllum sepiarium* mostrada en la SEQ ID NO: 2 en WO 2011/068803 o la SEQ ID NO: 15 en la presente.

[0094] Otras glucoamilasas contempladas incluyen la glucoamilasa derivada de una cepa de *Trametes*, preferiblemente una cepa de *Trametes cingulata* descrita en WO 2006/069289. Además, se contemplan glucoamilasas híbridas según la invención. Ejemplos son las glucoamilasas híbridas descritas en WO 2005/045018. Los ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida divulgada en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1.

[0095] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138) y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

[0096] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

[0097] Pueden añadirse glucoamilasas, en una forma de realización, en una cantidad de 0,02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,05-5 AGU/g DS (en la vinaza entera), especialmente entre 0,1-2 AGU/g DS.

[0098] La glucoamilasa se puede añadir en una cantidad eficaz, preferiblemente en el rango de 0,001-1 mg de proteína enzimática por g de DS, preferiblemente 0,01-0,5 mg de proteína enzimática por g de sustrato seco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas:

[0099] Alfa-amilasa LSCDS ("LSCDS"): alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181*+G182*+N193F truncada en 491 aminoácidos (SEQ ID NO: 1 en la presente).

[0100] Alfa-amilasa 369: (AA369): alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+Q254S+M284V truncada en 491 aminoácidos (SEQ ID NO: 1 en la presente).

[0101] Proteasa TA ("TA"): metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n.º 0670 divulgada como los aminoácidos 1-177 en la SEQ ID NO: 3 en la presente

[0102] Proteasa 196 ("TA 196"): metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n.º 0670 divulgada como los aminoácidos 1-177 en la SEQ ID NO: 3 en la presente con las mutaciones siguientes: A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L.

[0103] Proteasa PF ("PF"): proteasa derivada de la bacteria *Pyrococcus furiosus* mostrada en la SEQ ID NO: 4 en la presente.

[0104] Proteasa RH ("RH"): proteasa derivada de un hongo filamentoso *Rhizomucor miehei* mostrada en la SEQ ID NO: 9 en la presente.

[0105] Proteasa TF ("TF"): proteasa derivada de un hongo filamentoso *Thermobifida fusca* mostrada en la SEQ ID NO: 10 en la presente.

[0106] La glucoamilasa SF es una glucoamilasa derivada de una cepa de *Talaromyces emersonii* y se divulga en WO9928448 y está disponible de Novozymes A/S.

[0107] La glucoamilasa TC es una glucoamilasa derivada de *Trametes cingulata* divulgada en la SEQ ID NO: 2 de WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S.

[0108] La alfa-amilasa JA es una alfa-amilasa derivada de *Rhizomucor pusillus* y divulgada como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290.

Determinación de la actividad de alfa-amilasa

1. Ensayo de Phadebas™

[0109] La actividad de la alfa-amilasa se determina por un método utilizando comprimidos de Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas (prueba de amilasa de Phadebas®, suministrada por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero reticulado de almidón de color azul insoluble, que se ha mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia tamponadora y en comprimidos.

[0110] Para cada medición se suspende un comprimido en un tubo que contiene 5 ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson (50 mM de ácido acético, 50 mM de ácido fosfórico, 50 mM de ácido bórico, 0,1 mM de CaCl₂, pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza en un baño maría a la temperatura de interés. La alfa-amilasa que se va a evaluar se diluye en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. Se añade 1 ml de esta solución de alfa-amilasa a 5 ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. El almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad de alfa-amilasa.

[0111] Es importante que la absorbancia medida a 620 nm después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de prueba) esté en el rango de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia. En este rango de absorbancia hay linealidad entre la actividad y la absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe por lo tanto ajustarse para cumplir este criterio. Bajo un conjunto específico de condiciones (temperatura, pH, tiempo de reacción, condiciones de tampón), 1 mg de una alfa-amilasa dada hidrolizará una cierta cantidad de sustrato y se producirá un color azul. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de alfa-amilasa pura) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto dado de condiciones.

2. Método alternativo

[0112] La actividad de alfa-amilasa se determina alternativamente por un método que utiliza el sustrato PNP-G7. El PNP-G7, que es una abreviatura para p-nitrofenil-alfa,D-maltoheptaósido, es un oligosacárido bloqueado que puede ser escindido por una endoamilasa. Después de la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit digiere el sustrato para liberar una molécula de PNP libre que tiene un color amarillo y así se puede medir por espectrofotometría

visible a longitud de onda $\lambda = 405 \text{ nm}$ (400-420 nm). Los kits que contienen el sustrato PNP-G7 y alfa-glucosidasa son fabricados por Boehringer-Mannheim (n.º cat. 1054635).

5 [0113] Para preparar el sustrato, se añade una botella de sustrato (BM 1442309) a 5 ml de tampón (BM1442309). Para preparar la alfa-glucosidasa, se añade una botella de alfa-glucosidasa (BM 1462309) a 45 ml de tampón (BM1442309). La solución de trabajo se hace mezclando 5 ml de solución de alfa-glucosidasa con 0,5 ml de sustrato.

[0114] El ensayo se realiza transformando 20 microL de solución enzimática en una placa de microtitulación de 96 pocillos e incubando a 25°C. Se añaden 200 microL de solución de trabajo, 25°C. La solución se mezcla y se preincuba 1 minuto y se mide la absorción cada 15 segundos a lo largo de 3 minutos a DO 405 nm.

10 [0115] La pendiente de la curva de absorción dependiente del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto dado de condiciones.

Determinación de la actividad amilolítica ácida (FAU)

15 [0116] Una unidad de alfa-amilasa fúngica (1 FAU) se define como la cantidad de enzima que descompone 5,26 g de almidón (Merck Amylum solubile Erg. B.6, lote 9947275) por hora con el método estándar de Novozymes para la determinación de alfa-amilasa en base a las condiciones estándar siguientes:

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

[0117] Una descripción detallada del método de Novozymes para la determinación de KNU y FAU está disponible previa solicitud como método estándar EB-SM-0009.02/01.

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

20 [0118] La actividad de alfa-amilasa ácida se mide en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con respecto a un patrón de enzima.

[0119] El patrón usado es AMG 300 L (AMG G1 de *A. niger* de tipo salvaje vendida por Novozymes A/S). La alfa-amilasa neutra en esta AMG disminuye después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 semanas de aprox. 1 FAU/ml a por debajo de 0,05 FAU/ml.

25 [0120] La actividad de alfa-amilasa ácida en este patrón de AMG se determina de acuerdo al AF 9 1/3 (método Novo para la determinación de alfa-amilasa fúngica). En este método, 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de materia seca de almidón por hora bajo condiciones estándar.

30 [0121] El yodo forma un complejo azul con el almidón, pero no con sus productos de degradación. La intensidad de color es por lo tanto directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa se determina usando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo condiciones analíticas específicas.

	Alfa-amilasa	
Almidón + Yodo	→	Dextrinas + Oligosacáridos
	40°C, pH 2,5	
Azul/violeta		t = 23 s. Decoloración

Condiciones estándar/condiciones de reacción: (por minuto)

Sustrato:	almidón, aprox. 0,17 g/l
Tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/l
CaCl ₂ :	1,85 mM

pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	Lambda = 590 nm
Concentración de enzima:	0,025 AFAU/ml
Rango de trabajo de la enzima:	0,01-0,04 AFAU/ml

[0122] Se pueden encontrar detalles adicionales en el documento del método estándar EB-SM-0259.02/01 disponible previa solicitud de Novozymes A/S.

Determinación de FAU-F

5 [0123] Las unidades de alfa-amilasa fúngica FAU-F (Eungamyl) se miden con respecto a un patrón de enzima 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

[0124] Una carpeta (EB-SM-0216.02) que describe este método estándar con más detalle está disponible previa solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

10 [0125] La actividad de alfa-amilasa puede determinarse usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de la mezcla de las 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 debilita y se vuelve gradualmente de un marrón rojizo, que se compara con un patrón de vidrio coloreado.

15 [0126] 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) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

[0127] Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de glucoamilasa y alfa-glucosidasa (AGU)

20 [0128] 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 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

25 [0129] Se puede usar un sistema autoanizador. Se añade mutarrotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con la beta-D-glucosa en la reacción mencionada antes, formando NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

Incubación de AMG:

Sustrato:	maltosa 23,2 mM
Tampón:	acetato 0,1 M

pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Rango de trabajo de la enzima:	0,5-4,0 AGU/ml

Reacción de color:

GlucDH:	430 U/l
Mutarrotasa:	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

[0130] Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca.

Determinación de la actividad de proteasa (AU)

- 5 [0131] La dimetilcaseína (DMC) es hidrolizada por la enzima proteolítica en pequeños péptidos. Los grupos amino primarios formados en este proceso reaccionan con el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) formando un complejo coloreado. Este desarrollo de color se monitorea *in situ* para poder calcular el cambio en la absorción por unidad de tiempo. Esta figura es una medida de la velocidad de reacción y, por tanto, de la actividad enzimática.

Condiciones de reacción para la reacción DMC	
Temperatura:	50°C
pH:	8,3
Longitud de onda:	405 nm
Tiempo de reacción:	8 min.
Tiempo de medición:	2 min.
Rango de concentración de enzima:	0,072 - 0,216 mAU/ml.

La actividad se determina con respecto a un patrón de enzima.

- 10 [0132] El ensayo se describe posteriormente en el documento del método estándar EB-SM-0218.02/02 disponible previa solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad relativa y actividad residual

[0133] La "actividad relativa" y la "actividad residual" se determinan como se describe en el ejemplo 1.

Termoestabilidad

- 15 [0134] La termoestabilidad en el ejemplo 2 se determina usando el ensayo de zeína-BCA.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de variantes de proteasa y prueba de termoestabilidad

[0135] Los productos químicos usados fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

5 Cepas y plásmidos:

[0136] Se usó *E. coli* DH12S (disponible de Gibco BRL) para el rescate de plásmido de levadura. pJTP000 es un vector transportador de *S. cerevisiae* y *E. coli* bajo control del promotor TPI, construido a partir de pJC039 descrito en WO 01/92502, donde se ha insertado el gen de la proteasa M35 de *Thermoascus aurantiacus* (WO 03/048353).

10 [0137] Se usaron células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 para la expresión de variantes de proteasa. Se describe en J. Biol. Chem. 272(15): 9720-9727 (1997).

Medios y sustratos

[0138] 10X solución basal: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (DIFCO) 66,8 g/L, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.

15 [0139] SC-glucosa: 100 ml/l de glucosa al 20% (es decir, una concentración final del 2% = 2 g/100 ml), 4 ml/l de treonina al 5%, 10 ml/l triptófano al 1%, 25 ml/l de casaminoácidos al 20%, 100 ml/l de solución basal 10 X. La solución se esteriliza usando un filtro de un tamaño de poro de 0,20 micrómetros. Agar (al 2%) y H₂O (aprox. 761 ml) se autoclavan juntos, y la solución de SC-glucosa esterilizada por separado se añade a la solución de agar.

[0140] YPD: 20 g/l de peptona Bacto, 10 g/l de extracto de levadura, 100 ml/l de glucosa al 20 %.

[0141] YPD+Zn: YPD + 0,25 mM de ZnSO₄

20 [0142] Solución de PEG/LiAc: 50 ml de PEG4000 al 40 %, 1 ml de 5 M de acetato de litio.

Placa de microtitulación de 96 pocillos de zeína:

[0143] Cada pocillo contiene 200 microL de 0,05-0,1 % de zeína (Sigma), 0,25 mM de ZnSO₄ y 1 % de agar en 20 mM de tampón de acetato sódico, pH 4,5.

Manipulaciones de ADN

25 [0144] A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron usando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (eds.).

Transformación de levadura

30 [0145] La transformación de levadura se realizó usando el método del acetato de litio. Se mezclan 0,5 microL de vector (digerido por endonucleasas de restricción) y 1 microL de fragmentos de la PCR. La mezcla de ADN, 100 microL de células competentes YNG318 y 10 microL de ADN portador YEAST MAKER (Clontech) se añaden a un tubo de polipropileno de 12 ml (Falcon 2059). Añadir 0,6 ml de solución de PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 min a 30°C y 200 r.p.m. seguido de 30 min a 42°C (choque térmico). Transferir a un tubo de Eppendorf y centrifugar durante 5 s. Eliminar el sobrenadante y redissolver en 3 ml de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45 min a 200 r.p.m. a 30°C. Echar la suspensión a placas de SC-glucosa e incubar a 30°C durante 3 días para que crezcan colonias. El ADN total de levadura se extrae con el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (ZYMO research).

35

Secuenciación del ADN

- 5 [0146] La transformación de *E. coli* para la secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Los plásmidos de ADN se prepararon por el método alcalino (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el kit Qiagen® Plasmid. Los fragmentos de ADN se recuperaron del gel de agarosa por el kit de extracción de gel Qiagen. La PCR se realizó usando un PTC-200 DNA Engine. El analizador genético ABI PRISMTM 310 se usó para la determinación de todas las secuencias de ADN.

Construcción del vector de expresión de proteasa

- 10 [0147] El gen de la proteasa M35 de *Thermoascus* se amplificó con el par de cebadores Prot F (SEQ ID NO: 5) y Prot R (SEQ ID NO: 6). Los fragmentos de la PCR resultantes se introdujeron en *S. cerevisiae* YNG318 junto con el vector pJC039 (descritos en WO 2001/92502) digeridos con enzimas de restricción para eliminar el gen de la cutinasa de *Humicola insolens*.

[0148] El plásmido en los clones de levadura en placas de SC-glucosa se recuperó para confirmar la secuencia interna y se denominó pJTP001.

Construcción de genoteca de levadura y variantes dirigidas al sitio

- 15 [0149] Se construyeron una genoteca en levadura y variantes dirigidas al sitio por el método de PCR SOE (*Splicing by Overlap Extension*, véase "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University Press, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido por la recombinación *in vivo* de levadura.

Cebadores generales para la amplificación y la secuenciación

- 20 [0150] Los cebadores AM34 (SEQ ID NO: 7) y AM35 (SEQ ID NO: 8) se usaron para hacer fragmentos de ADN que contienen cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador inverso y AM35 + cebador directo) o solo para amplificar un gen de proteasa entero (AM34 + AM35).

Sistema de reacción de PCR:	Condiciones:
48,5 microL de H ₂ O	1 94°C 2 min
2 microesferas puRe Taq Ready-To-Go PCR (Amersham Biosciences)	2 94°C 30 s
0,5 microL X 2 100 pmol/microL de cebadores	3 55°C 30 s
0,5 microL de ADN molde	4 72°C 90 s
	2-4 25 ciclos
	5 72°C 10 min

- 25 [0151] Se recuperaron fragmentos de ADN de un gel de agarosa mediante el kit de extracción de gel Qiagen. Los fragmentos purificados resultantes se mezclaron con los productos de la digestión del vector. La solución mezclada se introdujo en *Saccharomyces cerevisiae* para construir genotecas o variantes dirigidas al sitio por recombinación *in vivo*.

Ensayo de la actividad relativa

- 30 [0152] Se inocularon clones de levadura en SC-glucosa en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía medio YPD+Zn y se cultivaron a 28°C durante 3 días. Los sobrenadantes de los cultivos se aplicaron a una placa de microtitulación de zeína de 96 pocillos y se incubaron a al menos 2 temperaturas (p. ej., 70°C y 80°C) durante más de 4 horas o durante toda la noche. La turbidez de la zeína en la placa se midió como A630 y la actividad relativa (temperaturas superiores/inferiores) se determinó como un indicador de una mejora de la termoactividad. Se seleccionaron los clones con una actividad relativa más alta que la variante parental y se determinó la secuencia.

Ensayo de la actividad residual

- 35 [0153] Se inocularon clones de levadura en SC-glucosa en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron a 28°C durante 3 días. Se midió la actividad de proteasa a 65°C usando azocaseína (Megazyme) después de incubar el sobrenadante de los cultivos en 20 mM de tampón de acetato sódico, pH 4,5, durante 10 min

a una cierta temperatura (80°C o 84°C con 4°C como una referencia) para determinar la actividad residual. Se seleccionaron los clones con una actividad residual más alta que la variante parental y se determinó la secuencia.

Ensayo de azocaseína

- 5 [0154] Se mezclaron 20 microL de muestras con 150 microL de solución de sustrato (4 ml de azocaseína al 12,5% en etanol en 96 ml de 20 mM de acetato sódico, pH 4,5, que contenía 0,01 % de Triton-100 y 0,25 mM de ZnSO₄) y se incubaron durante 4 horas o más.

[0155] Después de añadir 20 microL/pocillo de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 100 %, la placa se centrifugó y se extrajeron con pipeta 100 microL de los sobrenadantes para medir la A440.

Expresión de variantes de proteasa en *Aspergillus oryzae*

- 10 [0156] Las construcciones que comprendían los genes de las variantes de proteasa se usaron para construir vectores de expresión para *Aspergillus*. Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor de la amilasa neutra II de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También estaba presente en el plásmido el marcador selectivo de *Aspergillus amdS*
- 15 de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en acetamida como única fuente de nitrógeno. Los plásmidos de expresión para variantes de proteasa se transformaron en *Aspergillus* como se describe en Lassen et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 4701-4707. Para cada una de las construcciones, se aislaron, purificaron y cultivaron 10-20 cepas en matraces de agitación.

Purificación de las variantes expresadas

- 20 [0157]
1. Ajustar a 4,0 el pH de la muestra de fermentación filtrada con filtro de 0,22 µm.
 2. Poner la muestra en un baño de hielo con agitación magnética. Añadir (NH₄)₂SO₄ en partes alícuotas pequeñas (correspondientes a aprox. 2,0-2,2 M de (NH₄)₂SO₄ sin tener en cuenta el aumento de volumen al añadir el compuesto).
 - 25 3. Después de la adición final de (NH₄)₂SO₄, incubar la muestra en el baño de hielo con agitación magnética suave durante mín. 45 min.
 4. Centrifugación: centrifugadora refrigerada de alta velocidad Hitachi Himac CR20G equipada con una cabeza de rotor R20A2, 5°C, 20.000 r.p.m., 30 min.
 5. Disolver el precipitado formado en 200 ml de 50 mM de Na-acetato pH 4,0.
 - 30 6. Filtrar la muestra por succión a vacío usando una membrana de 0,22 micro m PES PLUS (IWAKI).
 7. Desalar/cambiar el tampón de la muestra a 50 mM de Na-acetato pH 4,0 usando ultrafiltración (Vivacell 250 de Vivascience equipada con una membrana de 5 kDa MWCO PES) durante toda la noche en una cámara fría. Diluir la muestra de fracción retenida a 200 ml usando 50 mM de Na-acetato pH 4,0. La conductividad de la muestra es preferiblemente menor de 5 mS/cm.
 - 35 8. Cargar la muestra en una columna de intercambio de cationes equilibrada con 50 mM de Na-acetato pH 4,0. Lavar la muestra no unida fuera de la columna usando 3 volúmenes de columna de tampón de unión (50 mM de Na-acetato pH 4,0) y eluir la muestra usando un gradiente lineal, tampón de elución (50 mM de Na-acetato + 1 M de NaCl pH 4,0) al 0-100% en 10 volúmenes de columna.
 - 40 9. Las fracciones recogidas se evaluaron mediante un ensayo de endoproteasa (cf. a continuación) seguido de una SDS-PAGE estándar (condiciones reductoras) en fracciones seleccionadas. Las fracciones se agrupan en función del ensayo de endoproteasa y la SDS-PAGE.

Ensayo de endoproteasa

[0158]

- 45 1. Un comprimido Protazyme OL/5 ml de 250 mM de Na-acetato pH 5,0 se disuelve por agitación magnética (sustrato: comprimido de endoproteasa Protazyme AK de Megazyme - n.º cat. PRAK 11/08).
2. Con agitación, se transfieren 250 microL de solución de sustrato a un tubo de Eppendorf de 1,5 ml.
3. Se añaden 25 microL de muestra a cada tubo (el blanco es tampón de muestra).

4. Los tubos se incuban en un termomezclador con agitación (1000 r.p.m.) a 50°C durante 15 minutos.
5. Se añaden 250 microL de 1 M de NaOH a cada tubo, seguido de agitación en vórtex.
6. Centrifugación durante 3 min. a 16.100 × G y 25°C.
7. Se transfieren 200 microL del sobrenadante a una PMT, y se registra la absorbancia a 590 nm.

Tabla 1. Actividad relativa de las variantes de proteasa. La numeración de sustitución/sustituciones comienza desde el extremo N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEQ ID NO: 3.

Variante	Sustitución/sustituciones y/o delección/delecciones	Actividad residual	
		80°C	84°C
JTP082	ΔS5/D79L/S87P/A112P/D142L		53%
JTP091	D79L/S87P/A112P/T124V/D142L	43%	
JTP092	ΔS5/N26R/D79L/S87P/A112P/D142L		60%
JTP095	N26R/T46R/D79L/S87P/A112P/D142L		62%
JTP096	T46R/D79L/S87P/T116V/D142L		67%
JTP099	D79L/P81R/S87P/A112P/D142L		80%
JTP101	A27K/D79L/S87P/A112P/T124V/D142L	81%	
JTP116	D79L/Y82F/S87P/A112P/T24V/D142L	59%	
JTP117	D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L	94%	
JTP127	D79L/S87P/A112P/T124V/A126V/D142L	53%	

Tabla 2 actividad relativa de las variantes de proteasa. La numeración de sustitución/sustituciones comienza desde el extremo N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEQ ID NO: 3.

Variante	Sustituciones	Actividad relativa	
		80°C/70°C	85°C/70°C
JTP050	D79L S87P A112P D142L	23%	9%
JTP134	D79L Y82F S87P A112P D142L	40%	
JTP135	S38T D79L S87P A112P A126V D142L	62%	
JTP136	D79L Y82F S87P A112P A126V D142L	59%	
JTP137	A27K D79L S87P A112P A126V D142L	54%	
JTP145	S49P D79L S87P A112P D142L	59%	
JTP146	S50P D79L S87P A112P D142L	63%	
JTP148	D79L S87P D104P A112P D142L	64%	
JTP161	D79L Y82F S87G A112P D142L	30%	12%
JTP180	S70V D79L Y82F S87G Y97W A112P D142L	52%	
JTP181	D79L Y82F S87G Y97W D104P A112P D142L	45%	
JTP187	S70V D79L Y82F S87G A112P D142L	45%	
JTP188	D79L Y82F S87G D104P A112P D142L	43%	
JTP189	D79L Y82F S87G A112P A126V D142L	46%	
JTP193	Y82F S87G S70V D79L D104P A112P D142L		15%

JTP194	Y82F S87G D79L D104P A112P A126V D142L		22%
JTP196	A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L		18%
Tabla 3. Actividad relativa de las variantes de proteasa. La numeración de sustitución/sustituciones comienza desde el extremo N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEQ ID NO: 3.			
Variante	Sustituciones	Actividad relativa	
		80°C/70°C	
JTP196	A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L	55%	
JTP210	A27K Y82F S87G D104P A112P A126V D142L	36%	
JTP211	A27K D79L Y82F D104P A112P A126V D142L	44%	
JTP213	A27KY82F D104P A112P A126V D142L	37%	

Ejemplo 2

Perfil de temperatura de las variantes de proteasa seleccionadas usando enzimas purificadas

- 5 [0159] Se purificaron las variantes de proteasa seleccionadas que mostraron una buena termoestabilidad y las enzimas purificadas se usaron en un ensayo de zeína-BCA como se describe abajo. La actividad de proteasa residual se determinó a 60°C después de la incubación de la enzima a temperaturas elevadas como se indica durante 60 min.

Ensayo de zeína-BCA:

[0160] Se realizó un ensayo de zeína-BCA para detectar una cuantificación de proteína soluble liberada de zeína por proteasas variantes a varias temperaturas.

- 10 Protocolo:

[0161]

- 15 1) Mezclar 10 microL de 10 micro g/ml de soluciones de enzima y 100 microL de solución de zeína al 0,025% en una placa de microtitulación (PMT).
 2) Incubar a varias temperaturas durante 60 min.
 3) Añadir 10 microL de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 100%.
 4) Centrifugar la PMT a 3500 r.p.m. durante 5 min.
 5) Transferir 15 microL a una nueva PMT que contenga 100 microL de solución de ensayo BCA (n.º cat. de Pierce: 23225, BCA Protein Assay Kit).
 20 6) Incubar durante 30 min. a 60°C.
 7) Medir la A562.

[0162] Los resultados se muestran en la tabla 4. Todas las variantes de proteasa evaluadas mostraron una termoestabilidad mejorada en comparación con la proteasa de tipo salvaje (WT).

Tabla 4. Ensayo de zeína-BCA

WT/Variante	Muestra incubada 60 min a las temperaturas indicadas (°C) (micro g/ml de péptido liberado equivalente a albúmina de suero bovino)						
	60°C	70°C	75°C	80°C	85°C	90°C	95°C
WT (tipo salvaje)	94	103	107	93	58	38	
JTP050 (D79L +S87P+A112P+D142L)	86	101	107	107	104	63	36
JTP077 (A27K+D79L+S87P+A112P+D142L)	82	94	104	105	99	56	31
JTP188 (D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+D142L)	71	83	86	93	100	75	53
JTP196 (A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L)	87	99	103	106	117	90	38

Ejemplo 3Determinación de la actividad relativa para proteasas usando el ensayo de azocaseína

5 [0163] Se mezclaron 20 microL de muestras que contenían aprox. 0,01 mg/ml con 150 microL de solución de sustrato (4 ml de azocaseína al 12,5% en etanol en 96 ml de 20 mM de acetato sódico, pH 4,5, con Triton-100 al 0,01 % y 0,25 mM de ZnSO₄) y se incubó durante 5 horas a 70°C y 80 °C.

[0164] Después de añadir 20 microL/pocillo de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 100 %, la placa se centrifugó y se extrajeron con pipeta 80 microL de sobrenadantes para medir la A440.

Nombre de la muestra	Actividad relativa 80°C/70°C
Proteasa RH	34%
Proteasa TF	106%
Proteasa TA	19%
Proteasa PF	154%

Ejemplo 4Extracción de aceite después del tratamiento con proteasa de vinaza entera

10 [0165] La vinaza entera producida industrialmente recogida de una planta de etanol de maíz de molienda seca de primera generación (12-13% DS) se calentó a 85°C, pH 4, al baño maría (Fisher Scientific IsoTemp 220) durante dos horas. Aproximadamente 25 gramos de vinaza entera se dividieron luego en partes alícuotas en tubos cónicos de 50 ml (VWR 89039-660) pesados previamente y se incubaron dos horas adicionales al baño maría. Las enzimas se dosificaron según las especificaciones de la tabla 5 y el volumen de solución madre para añadir a la fermentación
15 se halló usando la ecuación:

$$\text{Dosis enz. (ml)} = \frac{\text{Dosis final enz. (mg EP/g DS)} \times \text{Peso de mosto (g)} \times \text{Contenido sólido (\% DS)}}{\text{Conc. enzima (mg EP/ml)}}$$

Tabla 5. Dosis de enzima

	Enzima	Dosis	Unidades
1	Control	0,00	µg ep/g DS
2	PF	20,00	µg ep/g DS
3	RH	20,00	µg ep/g DS
4	TA	20,00	µg ep/g DS
5	TA 196	20,00	µg ep/g DS
6	TF	20,00	µg ep/g DS

20 [0166] Se dosificó el agua en cada muestra de modo que el volumen añadido total de enzima y agua fuera -80 µl/25 g de muestra. Los tubos se taparon y se colocaron en un horno de hibridación con espetones (modelo #230402 de Boekel Big Shot III) ajustado a 85°C con rotación (ajuste #14) durante 2 horas. Tras la incubación, se enfriaron los tubos a temperatura ambiente y luego se pesaron antes de la extracción de aceite. Se añadió hexano a cada muestra a una dosis de 0,125 ml de hexano/1 g de material de vinaza entera. Cada tubo se cubrió con Dura-seal para evitar la fuga de las muestras y se mezcló minuciosamente. Los tubos se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos en una centrifugadora Avanti JE Series con un rotor JS-5.3 (Beckmann Coulter). Después de la
25 centrifugación, la capa de aceite/hexano (sobrenadante) se eliminó usando una pipeta de desplazamiento positivo (Ranin MR-250 y MR-1000), se transfirió a un tubo de 5 ml pesado previamente de tapa abatible (Fisherbrand 03-338-1C) y se volvió a pesar. La densidad de la muestra se midió usando un medidor de densidad Rudolph Research Analytical (DDM 2911). La densidad del sobrenadante se insertó entonces en la ecuación de la curva estándar derivada de varios porcentajes de aceite en mezclas de hexano medidas en el densitómetro para determinar el
30 porcentaje de aceite en el sobrenadante.

$$(\rho_o + \gamma - \rho_h) / (2 * \gamma) - \text{sqrt}((\rho_o + \gamma - \rho_h)^2 + 4 * \gamma * \rho_h - 4 * \gamma * \rho) / (2 * \gamma) = \% \text{aceite}$$

ρ_o = densidad del aceite

ρ_h = densidad del hexano

γ = coeficiente de volumen molar en exceso

[0167] A partir de este valor se derivó el porcentaje total de aceite en el material de partida (vinaza entera). Los resultados se visualizan en la figura 2 (control = sin enzima; proteasa PF; proteasa RH; proteasa TA; proteasa TA196; proteasa TF).

5 Conclusiones

[0168] Se descubrió que la adición de proteasas tiene un impacto significativo positivo en la extracción de aceite de maíz a partir de vinaza entera. Los resultados muestran una extracción estadísticamente más alta de aceite de maíz para la proteasa PF, la proteasa TA 196 y la proteasa TF, un 25%, un 17% y un 16%, respectivamente, superior al control.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0169]

<110> Novozymes

Kreel, Nathaniel

Jump, Joseph

15 <120> Proceso de extracción de aceite a partir de vinaza diluida

<130> 12659-WO-PCT

<160> 10

<170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1

20 <211> 515

<212> PRT

<213> Bacillus stearothermophilus

<220>

<221> mat_peptide

25 <222> (1)..(515)

<400> 1

ES 2 754 203 T3

Ala	Ala	Pro	Phe	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Leu	1	5	10	15
Pro	Asp	Asp	Gly	Thr	Leu	Trp	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Glu	Ala	Asn	Asn	20	25	30	
Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	35	40	45	
Gly	Thr	Ser	Arg	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	50	55	60	
Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	65	70	75	80
Lys	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Met	85	90	95	
Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Asp	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly	100	105	110	
Thr	Glu	Trp	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln	115	120	125	
Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe	130	135	140	
Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	His				

ES 2 754 203 T3

145		150		155		160									
Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr
				165					170					175	
Lys	Phe	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu
			180					185					190		
Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His
		195					200					205			
Pro	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Leu	Lys	Asn	Trp	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Asn
	210					215					220				
Thr	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys
225					230					235					240
Phe	Ser	Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Gly
				245					250					255	
Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys
			260					265					270		
Leu	His	Asn	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Ser	Leu	Phe	Asp
		275					280					285			
Ala	Pro	Leu	His	Asn	Lys	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala
	290					295					300				
Phe	Asp	Met	Arg	Thr	Leu	Met	Thr	Asn	Thr	Leu	Met	Lys	Asp	Gln	Pro
305					310					315					320
Thr	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Glu	Pro	Gly	Gln
				325					330					335	
Ala	Leu	Gln	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala
			340					345					350		
Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	Gln	Glu	Gly	Tyr	Pro	Cys	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp
		355					360					365			
Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Gln	Tyr	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile
	370					375					380				
Asp	Pro	Leu	Leu	Ile	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	His
385					390					395					400

ES 2 754 203 T3

Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val
405 410 415

Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
420 425 430

Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
435 440 445

Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser
450 455 460

Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
465 470 475 480

Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr
485 490 495

Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
500 505 510

Ala Trp Pro
515

<210> 2
<211> 1068
<212> DNA
5 <213> Thermoascus aurantiacus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1065)

10 <220>
<221> misc_signal
<222> (1)..(57)

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(534)

15 <220>
<221> mat_peptide
<222> (535)..(1068)

<400> 2

atg cgg ctc gtt gct tcc cta acg gcc ttg gtg gcc ttg tcc gta 45
Met Arg Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Leu Val Ala Leu Ser Val
-175 -170 -165

cct gtc ttt ccc gct gct gtc aac gtg aag cgt gct tcc tcc tac 90
Pro Val Phe Pro Ala Ala Val Asn Val Lys Arg Ala Ser Ser Tyr
-160 -155 -150

ES 2 754 203 T3

ctg gag atc act	ctg agc cag gtc agc	aac act ctg atc aag gcc	135
Leu Glu Ile Thr	Leu Ser Gln Val Ser	Asn Thr Leu Ile Lys Ala	
-145	-140	-135	
gtg gtc cag aac	act ggt agc gac gag	ttg tcc ttc gtt cac ctg	180
Val Val Gln Asn	Thr Gly Ser Asp Glu	Leu Ser Phe Val His Leu	
-130	-125	-120	
aac ttc ttc aag	gac ccc gct cct gtc	aaa aag gta tcg gtc tat	225
Asn Phe Phe Lys	Asp Pro Ala Pro Val	Lys Lys Val Ser Val Tyr	
-115	-110	-105	
cgc gat ggg tct	gaa gtg cag ttc gag	ggc att ttg agc cgc tac aaa	273
Arg Asp Gly Ser	Glu Val Gln Phe Glu	Gly Ile Leu Ser Arg Tyr Lys	
-100	-95	-90	
tcg act ggc ctc tct	cgt gac gcc ttt act	tat ctg gct ccc gga gag	321
Ser Thr Gly Leu	Ser Arg Asp Ala Phe	Thr Tyr Leu Ala Pro Gly Glu	
-85	-80	-75	
tcc gtc gag gac	gtt ttt gat att gct	tcg act tac gat ctg acc agc	369
Ser Val Glu Asp	Val Phe Asp Ile Ala	Ser Thr Tyr Asp Leu Thr Ser	
-70	-65	-60	
ggc ggc cct gta act	atc cgt act gag gga	gtt gtt ccc tac gcc acg	417
Gly Gly Pro Val	Thr Ile Arg Thr Glu	Gly Val Val Pro Tyr Ala Thr	
-55	-50	-45	-40
gct aac agc act gat	att gcc ggc tac atc	tca tac tcg tct aat gtg	465
Ala Asn Ser Thr	Asp Ile Ala Gly Tyr	Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Val	
-35	-30	-25	
ttg acc att gat gtc	gat ggc gcc gct gct	gcc act gtc tcc aag gca	513
Leu Thr Ile Asp	Val Asp Gly Ala Ala	Ala Thr Val Ser Lys Ala	
-20	-15	-10	
atc act cct ttg gac	cgc cgc act agg atc	agt tcc tgc tcc ggc agc	561
Ile Thr Pro Leu	Asp Arg Arg Thr Arg	Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser	
-5	-1 1	5	
aga cag agc gct ctt	act acg gct ctc aga	aac gct gct tct ctt gcc	609
Arg Gln Ser Ala	Leu Thr Thr Ala Leu	Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ala	
10	15	20	25
aac gca gct gcc gac	gcg gct cag tct gga	tca gct tca aag ttc agc	657
Asn Ala Ala Ala	Asp Ala Ala Gln Ser	Gly Ser Ala Ser Lys Phe Ser	
30	35	40	
gag tac ttc aag act	act tct agc tct acc	cgc cag acc gtg gct gcg	705
Glu Tyr Phe Lys	Thr Thr Ser Ser Thr	Arg Gln Thr Val Ala Ala	
45	50	55	
cgt ctt cgg gct gtt	gcg cgg gag gca tct	tcg tct tct tcg gga gcc	753
Arg Leu Arg Ala	Val Ala Arg Glu Ala	Ser Ser Ser Ser Gly Ala	
60	65	70	
acc acg tac tac tgc	gac gat ccc tac ggc	tac tgt tcc tcc aac gtc	801
Thr Thr Tyr Tyr	Cys Asp Asp Pro Tyr	Gly Tyr Cys Ser Ser Asn Val	
75	80	85	
ctg gct tac acc ctg	cct tca tac aac ata	atc gcc aac tgt gac att	849
Leu Ala Tyr Thr	Leu Pro Ser Tyr Asn	Ile Ile Ala Asn Cys Asp Ile	
90	95	100	105

ES 2 754 203 T3

ttc tat act tac ctg ccg gct ctg acc agt acc tgt cac gct cag gat	897
Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp	
110 115 120	
caa gcg acc act gcc ctt cac gag ttc acc cat gcg cct ggc gtc tac	945
Gln Ala Thr Thr Ala Leu His Glu Phe Thr His Ala Pro Gly Val Tyr	
125 130 135	
agc cct ggc acg gac gac ctg gcg tat ggc tac cag gct gcg atg ggt	993
Ser Pro Gly Thr Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Tyr Gln Ala Ala Met Gly	
140 145 150	
ctc agc agc agc cag gct gtc atg aac gct gac acc tac gct ctc tat	1041
Leu Ser Ser Ser Gln Ala Val Met Asn Ala Asp Thr Tyr Ala Leu Tyr	
155 160 165	
gcg aat gcc ata tac ctt ggt tgc taa	1068
Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys	
170 175	

<210> 3

<211> 355

<212> PRT

5 <213> Thermoascus aurantiacus

<400> 3

ES 2 754 203 T3

Met	Arg	Leu	Val	Ala	Ser	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Val
			-175					-170					-165	
Pro	Val	Phe	Pro	Ala	Ala	Val	Asn	Val	Lys	Arg	Ala	Ser	Ser	Tyr
			-160					-155					-150	
Leu	Glu	Ile	Thr	Leu	Ser	Gln	Val	Ser	Asn	Thr	Leu	Ile	Lys	Ala
			-145					-140					-135	
Val	Val	Gln	Asn	Thr	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu	Ser	Phe	Val	His	Leu
			-130					-125					-120	
Asn	Phe	Phe	Lys	Asp	Pro	Ala	Pro	Val	Lys	Lys	Val	Ser	Val	Tyr
			-115					-110					-105	
Arg	Asp	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Phe	Glu	Gly	Ile	Leu	Ser	Arg	Tyr
			-100					-95					-90	Lys
Ser	Thr	Gly	Leu	Ser	Arg	Asp	Ala	Phe	Thr	Tyr	Leu	Ala	Pro	Gly
			-85				-80					-75		Glu
Ser	Val	Glu	Asp	Val	Phe	Asp	Ile	Ala	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Thr
			-70				-65				-60			Ser
Gly	Gly	Pro	Val	Thr	Ile	Arg	Thr	Glu	Gly	Val	Val	Pro	Tyr	Ala
-55					-50					-45				Thr
														-40

ES 2 754 203 T3

Ala Asn Ser Thr Asp Ile Ala Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Val
-35 -30 -25

Leu Thr Ile Asp Val Asp Gly Ala Ala Ala Ala Thr Val Ser Lys Ala
-20 -15 -10

Ile Thr Pro Leu Asp Arg Arg Thr Arg Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser
-5 -1 1 5

Arg Gln Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ala
10 15 20 25

Asn Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gln Ser Gly Ser Ala Ser Lys Phe Ser
30 35 40

Glu Tyr Phe Lys Thr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Gln Thr Val Ala Ala
45 50 55

Arg Leu Arg Ala Val Ala Arg Glu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala
60 65 70

Thr Thr Tyr Tyr Cys Asp Asp Pro Tyr Gly Tyr Cys Ser Ser Asn Val
75 80 85

Leu Ala Tyr Thr Leu Pro Ser Tyr Asn Ile Ile Ala Asn Cys Asp Ile
90 95 100 105

Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp
110 115 120

Gln Ala Thr Thr Ala Leu His Glu Phe Thr His Ala Pro Gly Val Tyr
125 130 135

Ser Pro Gly Thr Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Tyr Gln Ala Ala Met Gly
140 145 150

Leu Ser Ser Ser Gln Ala Val Met Asn Ala Asp Thr Tyr Ala Leu Tyr
155 160 165

Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys
170 175

<210> 4

<211> 412

<212> PRT

5 <213> Pyrococcus furiosus

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(412)
<223> Proteasa de Pyrococcus furiosus (Pfu)

5 <400> 4

ES 2 754 203 T3

Ala	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Gln	Val	Met	Ala	Thr	1	5	10	15
Tyr	Val	Trp	Asn	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Ile	Thr	Ile	Gly	Ile	20	25	30	
Ile	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Ala	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Gln	Gly	Lys	Val	35	40	45	
Ile	Gly	Trp	Val	Asp	Phe	Val	Asn	Gly	Arg	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Asp	50	55	60	
His	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	65	70	75	80
Ala	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Lys	Gly	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Leu	Ala	85	90	95	
Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Ile	Ser	Thr	Ile	100	105	110	
Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Asp	Asn	Lys	Asp	Lys	Tyr	Gly	Ile	115	120	125	
Lys	Val	Ile	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	130	135	140	
Asp	Ala	Leu	Ser	Gln	Ala	Val	Asn	Ala	Ala	Trp	Asp	Ala	Gly	Leu	Val	145	150	155	160
Val	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	Ser	Gly	Pro	Asn	Lys	Tyr	Thr	Ile	Gly	165	170	175	
Ser	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Lys	180	185	190	
Tyr	Asp	Val	Ile	Thr	Ser	Phe	Ser	Ser	Arg	Gly	Pro	Thr	Ala	Asp	Gly	195	200	205	
Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Gly	Asn	Trp	Ile	Ile	Ala	Ala	210	215	220	

ES 2 754 203 T3

Arg Ala Ser Gly Thr Ser Met Gly Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr
225 230 235 240

Ala Ala Pro Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile Ala
245 250 255

Ala Leu Leu Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys Val Lys
260 265 270

Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala
275 280 285

Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile Asn
290 295 300

Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala Asn Lys
305 310 315 320

Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser Gly Ala Ser Phe Val Thr
325 330 335

Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu
340 345 350

Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Tyr Tyr
355 360 365

Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr
370 375 380

Ile Lys Val Val Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Gln Val Asp Val
385 390 395 400

Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ser
405 410

<210> 5

<211> 49

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

aacgacggta cccggggatc ggatccatgc ggctcgttgc ttcctaac 49

10 <210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 6
 ctaattacat gatgcggccc ttaattaatt agcaaccaag gtatatgg 48

5 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 7
 taggagtta gtgaactgc 20

15 <210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

20 <400> 8
 ttcgagcgtc ccaaaacc 18

<210> 9
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Rhizomucor miehei

25 <220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(22)

30 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (33)..(430)

<400> 9

ES 2 754 203 T3

Met Leu Phe Ser Gln Ile Thr Ser Ala Ile Leu Leu Thr Ala Ala Ser
 -30 -25 -20

Leu Ser Leu Thr Thr Ala Arg Pro Val Ser Lys Gln Ser Glu Ser Lys
 -15 -10 -5 -1

Asp Lys Leu Leu Ala Leu Pro Leu Thr Ser Val Ser Arg Lys Phe Ser
 1 5 10 15

Gln Thr Lys Phe Gly Gln Gln Gln Leu Ala Glu Lys Leu Ala Gly Leu

ES 2 754 203 T3

20					25					30					
Lys	Pro	Phe	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Asp	Thr	Pro	Gly
		35					40					45			
Tyr	Tyr	Asp	Phe	Asp	Leu	Glu	Glu	Tyr	Ala	Ile	Pro	Val	Ser	Ile	Gly
	50					55					60				
Thr	Pro	Gly	Gln	Asp	Phe	Leu	Leu	Leu	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Ser	Asp
65					70					75					80
Thr	Trp	Val	Pro	His	Lys	Gly	Cys	Thr	Lys	Ser	Glu	Gly	Cys	Val	Gly
				85					90					95	
Ser	Arg	Phe	Phe	Asp	Pro	Ser	Ala	Ser	Ser	Thr	Phe	Lys	Ala	Thr	Asn
			100					105					110		
Tyr	Asn	Leu	Asn	Ile	Thr	Tyr	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	Tyr
	115						120					125			
Phe	Glu	Asp	Ser	Ile	Ala	Ile	Gly	Asp	Ile	Thr	Val	Thr	Lys	Gln	Ile
	130					135					140				
Leu	Ala	Tyr	Val	Asp	Asn	Val	Arg	Gly	Pro	Thr	Ala	Glu	Gln	Ser	Pro
145					150					155					160
Asn	Ala	Asp	Ile	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ala	Tyr	Pro	Asp
				165				170						175	
Asn	Thr	Ala	Met	Glu	Ala	Glu	Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Asn	Thr	Val	His
			180					185					190		
Val	Asn	Leu	Tyr	Lys	Gln	Gly	Leu	Ile	Ser	Ser	Pro	Leu	Phe	Ser	Val
	195						200					205			
Tyr	Met	Asn	Thr	Asn	Ser	Gly	Thr	Gly	Glu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Val
	210					215					220				
Asn	Asn	Thr	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	Ala	Tyr	Thr	Asp	Val	Met	Ser
225					230					235				240	
Arg	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Trp	Asp	Ala	Pro	Val	Thr	Gly	Ile	Thr
				245					250					255	
Val	Asp	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Arg	Phe	Ser	Arg	Pro	Gln	Ala	Phe	Thr
			260					265					270		

ES 2 754 203 T3

Ile Asp Thr Gly Thr Asn Phe Phe Ile Met Pro Ser Ser Ala Ala Ser
275 280 285

Lys Ile Val Lys Ala Ala Leu Pro Asp Ala Thr Glu Thr Gln Gln Gly
290 295 300

Trp Val Val Pro Cys Ala Ser Tyr Gln Asn Ser Lys Ser Thr Ile Ser
305 310 315 320

Ile Val Met Gln Lys Ser Gly Ser Ser Ser Asp Thr Ile Glu Ile Ser
325 330 335

Val Pro Val Ser Lys Met Leu Leu Pro Val Asp Gln Ser Asn Glu Thr
340 345 350

Cys Met Phe Ile Ile Leu Pro Asp Gly Gly Asn Gln Tyr Ile Val Gly
355 360 365

Asn Leu Phe Leu Arg Phe Phe Val Asn Val Tyr Asp Phe Gly Asn Asn
370 375 380

Arg Ile Gly Phe Ala Pro Leu Ala Ser Ala Tyr Glu Asn Glu
385 390 395

<210> 10

<211> 368

<212> PRT

5 <213> Thermobifida fusca

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(32)

<220>

10 <221> mat_peptide

<222> (33) .. (368)

<400> 10

Met Asn His Ser Ser Arg Arg Thr Thr Ser Leu Leu Phe Thr Ala Ala
-30 -25 -20

Leu Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Ala Thr Thr Pro Ala Ser Ala Gln
-15 -10 -5 -1

Glu Leu Ala Leu Lys Arg Asp Leu Gly Leu Ser Asp Ala Glu Val Ala
1 5 10 15

Glu Leu Arg Ala Ala Glu Ala Glu Ala Val Glu Leu Glu Glu Glu Leu
20 25 30

ES 2 754 203 T3

Arg Asp Ser Leu Gly Ser Asp Phe Gly Gly Val Tyr Leu Asp Ala Asp
 35 40 45
 Thr Thr Glu Ile Thr Val Ala Val Thr Asp Pro Ala Ala Val Ser Arg
 50 55 60
 Val Asp Ala Asp Asp Val Thr Val Asp Val Val Asp Phe Gly Glu Thr
 65 70 75 80
 Ala Leu Asn Asp Phe Val Ala Ser Leu Asn Ala Ile Ala Asp Thr Ala
 85 90 95
 Asp Pro Lys Val Thr Gly Trp Tyr Thr Asp Leu Glu Ser Asp Ala Val
 100 105 110
 Val Ile Thr Thr Leu Arg Gly Gly Thr Pro Ala Ala Glu Glu Leu Ala
 115 120 125
 Glu Arg Ala Gly Leu Asp Glu Arg Ala Val Arg Ile Val Glu Glu Asp
 130 135 140
 Glu Glu Pro Gln Ser Leu Ala Ala Ile Ile Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr
 145 150 155 160
 Phe Gly Asn Tyr Arg Cys Ser Ile Gly Phe Ser Val Arg Gln Gly Ser
 165 170 175
 Gln Thr Gly Phe Ala Thr Ala Gly His Cys Gly Ser Thr Gly Thr Arg
 180 185 190
 Val Ser Ser Pro Ser Gly Thr Val Ala Gly Ser Tyr Phe Pro Gly Arg
 195 200 205
 Asp Met Gly Trp Val Arg Ile Thr Ser Ala Asp Thr Val Thr Pro Leu
 210 215 220
 Val Asn Arg Tyr Asn Gly Gly Thr Val Thr Val Thr Gly Ser Gln Glu
 225 230 235 240
 Ala Ala Thr Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ala Thr Thr Gly Trp
 245 250 255
 Arg Cys Gly Thr Ile Gln Ser Lys Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu
 260 265 270
 Gly Thr Val Thr Gly Leu Thr Arg Thr Thr Ala Cys Ala Glu Gly Gly
 275 280 285

ES 2 754 203 T3

Asp Ser Gly Gly Pro Trp Leu Thr Gly Ser Gln Ala Gln Gly Val Thr
 290 295 300

Ser Gly Gly Thr Gly Asp Cys Arg Ser Gly Gly Ile Thr Phe Phe Gln
 305 310 315 320

Pro Ile Asn Pro Leu Leu Ser Tyr Phe Gly Leu Gln Leu Val Thr Gly
 325 330 335

REIVINDICACIONES

1. Proceso de recuperación de aceite, que comprende

- 5 (a) la conversión de un material que contiene almidón en dextrinas con una alfa-amilasa
(b) la sacarificación de las dextrinas usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos para formar un azúcar;
(c) la fermentación del azúcar en un medio de fermentación en un producto de fermentación usando un organismo fermentador;
(d) la recuperación del producto de fermentación para formar una vinaza entera;
10 (e) la separación de la vinaza entera en vinaza diluida y torta húmeda;
(e') la concentración opcional de la vinaza diluida en jarabe;
(f) la recuperación de aceite de la vinaza diluida y/o el jarabe, donde una proteasa que tiene al menos un 80% de identidad con la SEQ ID NO: 4 y tiene un valor de termoestabilidad de más del 50% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C está presente y/o se añade durante las etapas (d)-(e').
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, donde la temperatura en la etapa (a) está por encima de la temperatura de gelatinización inicial, tal como a una temperatura entre 80-90°C, tal como alrededor de 85°C.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde la proteasa tiene una termoestabilidad de más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinada como actividad relativa a 80°C/70°C.
- 20 4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la proteasa deriva de una cepa de *Pyrococcus*, preferiblemente una cepa de *Pyrococcus furiosus*.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la proteasa es la mostrada en la SEQ ID NO: 4 en la presente, o donde la proteasa tiene al menos un 85%, tal como al menos un 90%, tal como al menos un 95%, tal como al menos un 96%, tal como al menos un 97%, tal como al menos un 98%, tal como al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 4 en la presente.
- 25 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la alfa-amilasa deriva del género *Bacillus*, tal como una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular una variante de una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, tal como la mostrada en la SEQ ID N.º: 1 en la presente, en particular la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* está truncada, preferiblemente para tener de 485 a 495 aminoácidos, tal como alrededor de 491 aminoácidos.

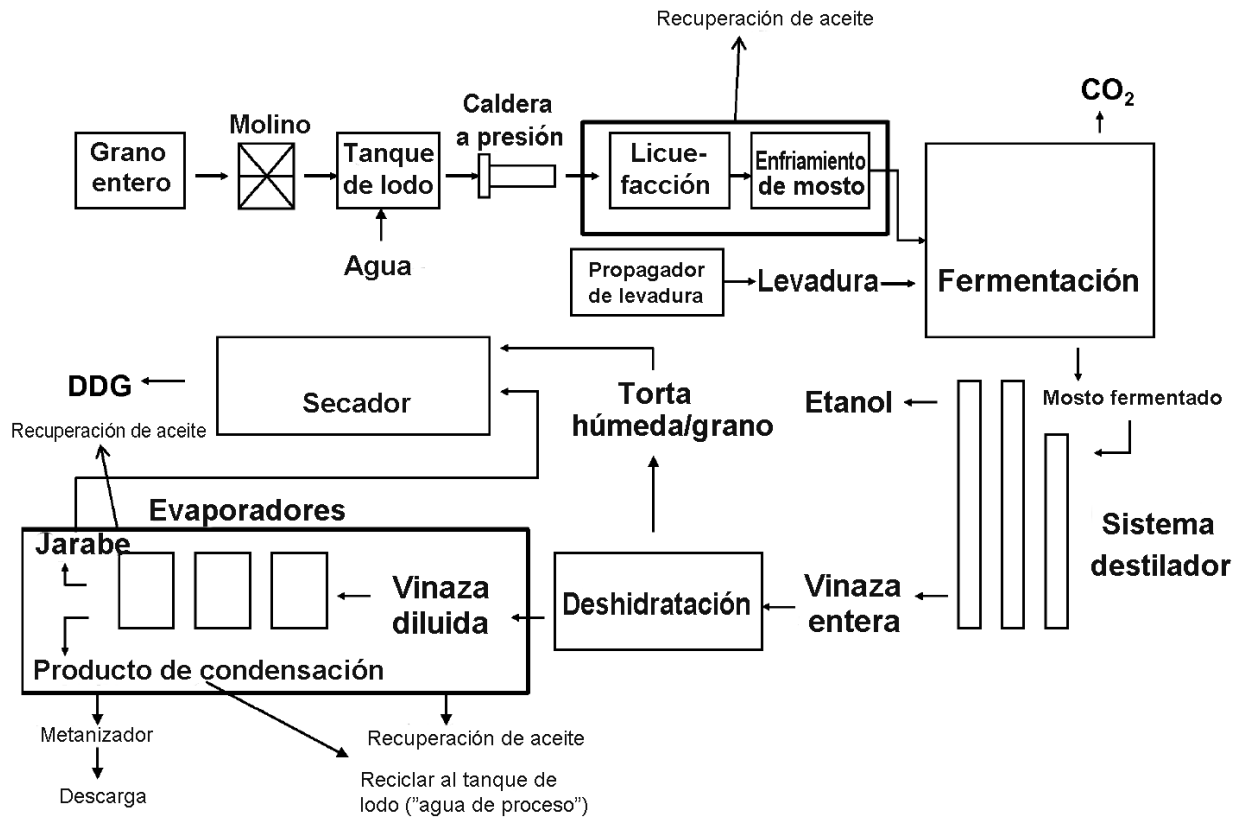


Fig. 1

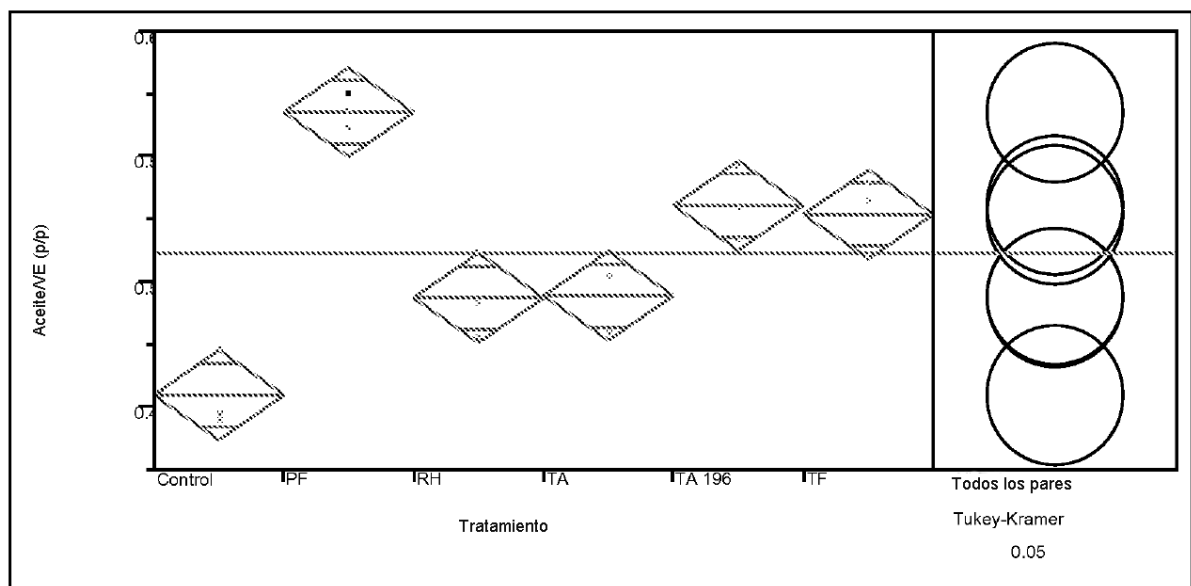


Fig. 2

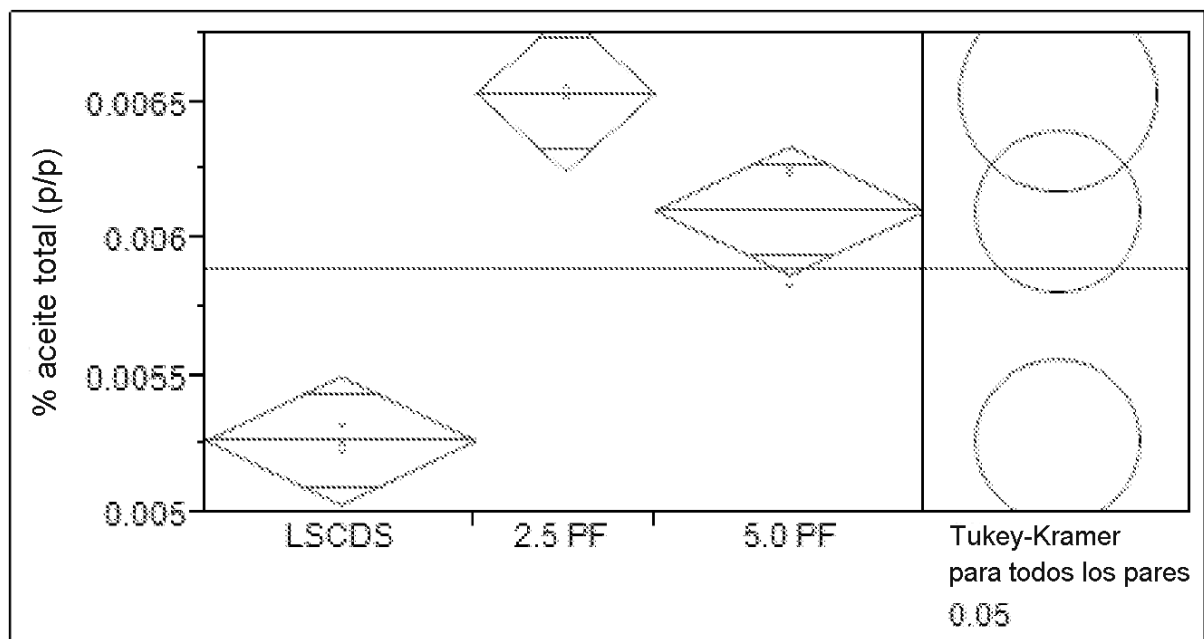


Fig. 3

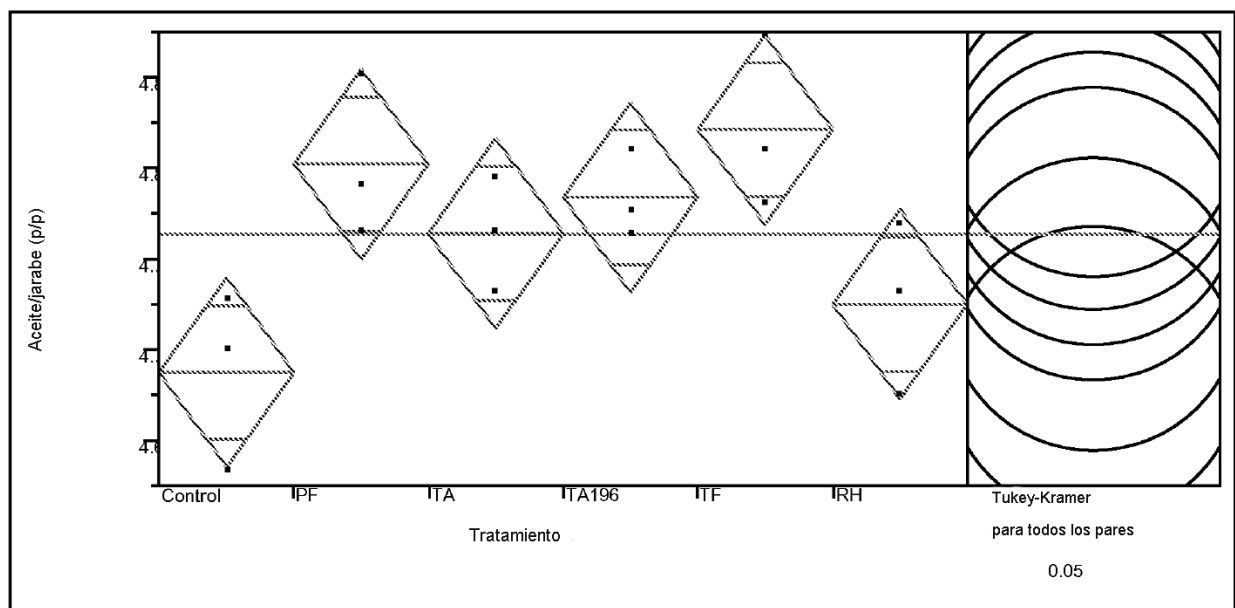


Fig. 4

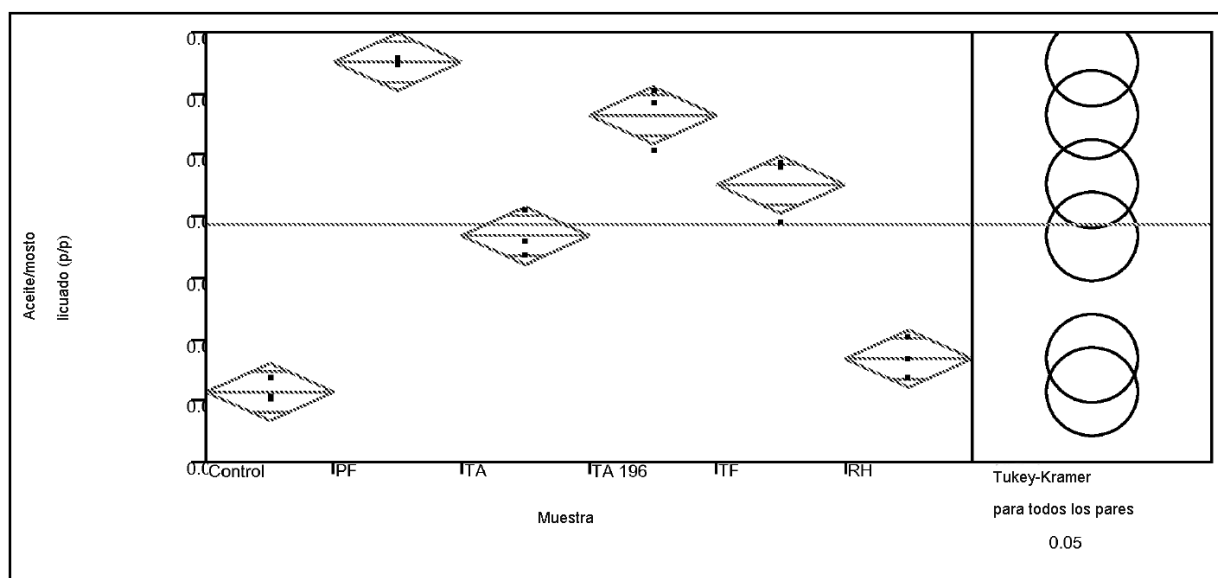


Fig. 5