



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 269**

51 Int. Cl.:

C12G 3/02 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03798662 .7**

86 Fecha de presentación : **11.06.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1556475**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Métodos y composiciones de fermentación.**

30 Prioridad: **26.09.2002 US 413730 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **Novozymes North America, Inc.**
77 Perry Chapel Church Road
Franklinton, North Carolina 27515, US

72 Inventor/es: **Grichko, Varvara**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

Métodos y composiciones de fermentación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones enzimáticos para producir productos de fermentación, incluidos los métodos y composiciones para mejorar el rendimiento de la levadura durante los procesos de fermentación.

10 **Antecedentes de la invención**

Los procesos de fermentación se utilizan para hacer un gran número de productos comerciales, incluidos los alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H₂ y CO₂), y compuestos más complejos, incluidos, por ejemplo, los antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, beta-caroteno); hormonas, y otros compuestos que son difíciles de producir sintéticamente. Los procesos de fermentación se usan también comúnmente en el alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino), en la industria lechera (p. ej., en la producción de yogur y queso), en la industria del cuero, y del tabaco. La aplicación de enzimas en procesos de fermentación son bien conocidos y los usos de esterases, tales como las lipasas, o fosfolipasas, están descritos en WO 99/49011, JP62055069, JP 5789638 y US5,208,054. Hay una necesidad de mejorar adicionalmente los procesos de fermentación y de procesos mejorados que incluyan una fase de fermentación.

25 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona métodos y composiciones para producir un producto de fermentación. La presente invención también proporciona métodos y composiciones para mejorar el rendimiento de la levadura durante procesos de fermentación, incluyendo el nivel y/o el rendimiento del proceso de fermentación. La presente invención también proporciona métodos mejorados y composiciones para producir etanol.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un proceso de fermentación donde al menos una enzima esterasa es aplicada en un proceso de fermentación, donde dicha al menos una enzima esterasa comprende una cutinasa. En una forma de realización preferida, la invención comprende la puesta en contacto de un microorganismo o unos medios fermentativos usados en la fermentación con al menos una enzima esterasa, donde dicha al menos una enzima esterasa comprende una cutinasa. La esterasa puede ser aplicada durante la fermentación y/o la esterasa puede ser aplicada antes de la fermentación, como por ejemplo, durante la propagación de los microorganismos fermentativos.

Aunque no está limitada a ninguna teoría de operación, la aplicación de las enzimas esterases en los procesos de fermentación según la presente invención, en los que dicha al menos una enzima esterasa comprende una cutinasa, se cree que promueve un cambio la composición/concentración lipídica dentro y/o fuera del microorganismo de fermentación o en la membrana celular del microorganismo de fermentación para obtener una mejora en el movimiento de solutos dentro y/o fuera de los microorganismos fermentativos durante la fermentación y/o para proporcionar más fuentes de energía metabolizable, como, p. ej., convirtiendo los componentes del sustrato de fermentación o los medios de fermentación, tales como, el aceite de un sustrato de maíz, en componentes útiles para los microorganismos fermentativos, p. ej., ácidos grasos insaturados y glicerol.

En una forma de realización preferida de este aspecto de la presente invención, al menos una esterasa, dicha al menos una esterasa comprende una cutinasa, y además comprende una enzima lipolítica, más preferiblemente, una lipasa. En otra forma de realización preferida, al menos una esterasa, dicha al menos una esterasa comprende una cutinasa, y además comprende una fosfolipasa. En otra forma de realización preferida, al menos una esterasa, dicha al menos una esterasa comprende una cutinasa, y además comprende una lipasa, una fosfolipasa y/o combinaciones de las mismas.

En una forma de realización preferida, los procesos fermentativos de la presente invención se usan en combinación con un proceso de licuefacción y/o un proceso de sacarificación, en los que se usan actividades enzimáticas adicionales, tales como, la actividad alfa-amilasa y glucoamilasa para el procesamiento del sustrato, p. ej., un sustrato de almidón.

En otra forma de realización preferida, el proceso de fermentación se usa en la producción de etanol. Según esta forma de realización preferida, la aplicación del al menos una esterasa, la cual comprende una cutinasa, puede utilizarse para aumentar el límite de tolerancia al etanol del microorganismo fermentativo para mejorar de ese modo la producción de etanol y/o para aumentar el nivel de fermentación. En una forma de realización más preferida, al menos una enzima lipolítica es aplicada para aumentar la tolerancia al etanol del microorganismo fermentativo para mejorar de ese modo la producción de etanol.

En otra forma de realización preferida, se puede(n) usar actividad o actividades enzimática(s) adicional(es) en combinación con (así como antes de, durante o después de) el tratamiento de esterasa de la presente invención. Enzimas preferidas adicionales incluyen proteasas, fitasas, xilanasas y alfa-amilasas maltogénicas.

Descripción detallada de la invención

“Fermentación” o “proceso de fermentación” se refiere a cualquier proceso de fermentación o a cualquier proceso que comprende una fase de fermentación. Un proceso de fermentación incluye, sin limitación, los procesos de fermentación usados para producir alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H_2 y CO_2); antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. Los procesos de fermentación también incluyen los procesos de fermentación usados en la industria del alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino), en la industria lechera (p. ej., productos lácteos fermentados), en la industria del cuero y en la industria del tabaco. Los procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación de alcoholes, como se conocen en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbicos, como se conocen bien en la técnica.

“Medios de fermentación” o “medio de fermentación” se refiere al entorno en el que se realiza la fermentación y que incluye el sustrato de fermentación, que es, la fuente de carbohidrato que es metabolizada por el microorganismo fermentativo. Los medios de fermentación, incluso el sustrato de fermentación y otras materias primas usadas en el proceso de fermentación pueden ser procesados, p. ej., para procesos de trituración, licuefacción y sacarificación u otros procesos deseados antes del proceso de fermentación o simultáneamente con el mismo. Por consiguiente, los medios de fermentación pueden referirse a los medios antes de que sean añadidos los microorganismos fermentativos, tales como, los medios de un proceso de licuefacción o de sacarificación o resultantes del mismo, así como los medios que comprenden los microorganismos fermentativos, tales como, los medios usados en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo (SSF).

Los medios de fermentación o sustrato de fermentación pueden también comprender grano de cereal desgerminado, preferiblemente maíz desgerminado, es decir endosperma y maíz torrefactado (p. ej., maíz termotratado y palomitas) o cualquier otro cereal. El grano de cereal puede ser molido o puede ser fermentado en su totalidad.

“Microorganismo fermentativo” se refiere a cualquier microorganismo adecuado para el uso en un proceso de fermentación deseado. Los microorganismos fermentativos adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convierten los azúcares, tales como la glucosa o la maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de microorganismos fermentativos incluyen organismos fúngicos, tales como la levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Sacchromyces spp.*, y en particular, *Sacchromyces cerevisiae*. La levadura comercialmente disponible incluye, p. ej., Red Star® Lesaffre Ethanol Red (disponible por Red Star/Lesaffre, EEUU) FALI (disponible por Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EEUU), SUPERSTART (disponible por Alltech), GERT STRAND (disponible por Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible por DSM Specialties).

Una “esterasa”, también denominada Hidrolasa del Éster Carboxílico, se refiere a enzimas que actúan en enlaces estéricos, e incluye las enzimas clasificadas en hidrolasas del éster carboxílico EC 3.1.1 según la nomenclatura enzimática (disponible en <http://www.chem.gmw.ac.uk/iubmb/enzyme> o por Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, California, con Suplemento 1 (1993), Suplemento 2 (1994), Suplemento 3 (1995), Suplemento 4 (1997) y Suplemento 5, en Eur. J. Biochem. 1994: 223: 1-5; Eur. J. Biochem. 1995: 232: 1-6; Eur. J. Biochem. 1996: 237: 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250: 1-6, y Eur. J. Biochem. 1999: 264: 610-650; respectivamente). Ejemplos no limitativos de esterases incluyen arilesterasa, triacilglicerol lipasa, acetilesterasa, acetilcolinesterasa, colinesterasa, tropinesterasa, pectinesterasa, esterol-esterasa, clorofilasa, L-arabinonolactonasa, gluconolactonasa, uronolactonasa, tannasa, esterasa de retinilo-palmitato, hidrolasa del dímero de hidroxibutirato, acilglicerol lipasa, 3-oxoadipato enol-lactonasa, 1,4-lactonasa, galactolipasa, 4-piridoxolactonasa, acilcarnitina hidrolasa, aminoacil-ARNt hidrolasa, D-arabinonolactonasa, 6-fosfogluconolactonasa, fosfolipasa A1, 6-acetilglucosa desacetilasa, lipoproteína-lipasa, dihidrocoumarina lipasa, limonin-D-anillo-lactonasa, esteroide-lactonasa, triacetato-lactonasa, actinomicina lactonasa, orsellinato-dépsido hidrolasa, cefalosporina-C desacetilasa, clorogenato hidrolasa, alfa-aminoácido esterasa, 4-metiloxaloacetato esterasa, carboximetilenobutenolidasa, deoxilimonato A-anillo-lactonasa, 2-acetil-1-alkilglicerofosfocolina esterasa, fusarinina-C ornitinaesterasa, sinapina esterasa, éster de cera hidrolasa, forbol-diéster hidrolasa, fosfatidilinositol desacilasa, sialato O-acetilesterasa, acetoxibutirilbitiofeno desacetilasa, acetilsalicilato desacetilasa, metilumbelliferilacetato desacetilasa, 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonasa, N-acetilgalactosaminoglicano desacetilasa, esterasa de la hormona juvenil, bis(2-etilhexil)ftalato esterasa, proteína glutamato metilesterasa, 11-cis-retinil-palmitato hidrolasa, todo-trans-retinil-palmitato hidrolasa, L-ramnono-1,4- lactonasa, 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno desacetilasa, acilo-graso-etil-éster sintasa, xilono-1,4-lactonasa, N-acetilglucosaminilfosfatidilinositol desacetilasa, cetraxato bencilesterasa, acetilalkilglicerol acetilhidrolasa, y acetilxilano esterasa.

Las cutinasas (según están clasificadas por EC 3.1.1.74) usadas en la presente invención son las esterases. Otras esterases para el uso en la presente invención en combinación con las cutinasas son enzimas lipolíticas, tales como, las lipasas (según están clasificadas por EC 3.1.1.3, EC 3.1.1.23 y/o EC 3.1.1.26) y las fosfolipasas (según están clasificadas por EC 3.1.1.4 y/o EC 3.1.1.32, incluso las lisofosfolipasas (según están clasificadas por EC 3.1.1.5).

La presente invención proporciona métodos y composiciones para producir un producto de fermentación donde al menos una enzima esterasa se usa en el proceso de fermentación, donde dicha al menos una enzima esterasa comprende una cutinasa. El tratamiento con esterasa puede ser aplicado a cualquier fase en un proceso de fermentación. En una forma de realización preferida, la esterasa se añade en una cantidad eficaz durante la fermentación (como por

ejemplo, por contacto con el medio de fermentación), como por ejemplo, al principio del proceso de fermentación. En otra forma de realización preferida, la esterasa se añade en una cantidad eficaz antes de la fermentación, como por ejemplo, durante la propagación de los organismos fermentativos o durante la licuefacción, sacarificación o una fase de presacarificación. La adición de una esterasa en un proceso de fermentación, tal como, en un proceso de producción de etanol, por ejemplo, puede utilizarse para aumentar el límite de tolerancia al etanol del microorganismo fermentativo y para mejorar de ese modo el rendimiento del producto de fermentación (rendimiento de etanol) convirtiendo los componentes en el medio de fermentación, tales como, el aceite del sustrato de maíz, en componentes útiles para el microorganismo fermentativo, p. ej., ácidos insaturados grasos y glicerol.

Cualquier materia prima o sustrato adecuado puede ser usado en los procesos de fermentación de la presente invención. El sustrato es generalmente seleccionado en base al producto de fermentación deseado y al proceso empleado, como es bien conocido en la técnica. Ejemplos de sustratos adecuados para el uso en los procesos de la presente invención, incluyen materias con contenido en almidón, tales como tubérculos, raíces, granos enteros, maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo o cereales, materias primas con azúcar, tales como melaza, materias de fruta, azúcar, caña o remolacha azucarera, patatas, y materias con celulosa, tales como residuos de madera o de plantas. Los sustratos adecuados también incluyen fuentes de carbohidratos, en particular, azúcares DP₁₋₃ de bajo peso molecular, que pueden ser metabolizados por el microorganismo fermentativo, y que pueden ser suministrados por adición directa a los medios de fermentación.

La esterasa será añadida en una cantidad eficaz para mejorar la fermentación, p. ej., para cambiar la composición/concentración lipídica dentro y/o fuera del microorganismo fermentativo o en la membrana celular del microorganismo fermentativo, para obtener una mejora en el movimiento de los solutos dentro y/o fuera de los microorganismos fermentativos durante la fermentación y/o para proporcionar más fuentes de energía metabolizable (como, p. ej., convirtiendo los componentes, tales como, el aceite del sustrato de maíz, en componentes útiles para el microorganismo fermentativo, p. ej., ácidos insaturados grasos y glicerol), para aumentar el rendimiento de etanol. Ejemplos de cantidades eficaces de esterasa incluyen de 0,5 a 1000 U/g DS % (dry solid percentage, porcentaje de sólido seco) en medios de fermentación, preferiblemente de 1 a 400 U/g DS %, y más preferiblemente de 1 a 20 U/g DS %, tal como, de 1 a 5 U/g DS %. Una optimización adicional de la cantidad de esterasa puede ser obtenida a partir de ahora usando los procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Las condiciones para el tratamiento de esterasa (p. ej., pH, temperatura y tiempo de tratamiento), dependerá de la aplicación (p. ej., aplicando el tratamiento de esterasa a un proceso de hidrólisis de almidón crudo en comparación con la aplicación de la esterasa en un proceso de hidrólisis de almidón tradicional donde el sustrato de almidón es gelatinizado). Los factores a tener en cuenta al seleccionar una esterasa deberían en consecuencia incluir las condiciones que se emplearán durante el tratamiento. Por ejemplo, los procesos de hidrólisis de almidón crudo son preferiblemente realizados a 32,2°C durante 64 h, con el pH inicial de aproximadamente 4.5-5.0. En algunos casos, se puede usar la separación en fases de la temperatura para reducir el impacto de la tensión en la levadura. El tiempo de fermentación puede variar dependiendo del rendimiento de etanol que se espere.

El tratamiento de esterasa también será una función de la levadura usada en la fermentación, en particular, la genética de la levadura y la fisiología de levadura. Por consiguiente, las condiciones óptimas (p. ej., pH, temperatura, tiempo de tratamiento, selección de esterasa y concentración) para el tratamiento de esterasa puede variar dependiendo de la levadura usada. Por consiguiente, el tratamiento de esterasa empleado, p. ej., condiciones de la separación en fases, concentración de esterasa, y selección de esterasa, pueden ser optimizadas a partir de ahora para la levadura usada en el proceso de fermentación. Preferiblemente, el tratamiento de esterasa se realiza bajo condiciones de alta concentración de etanol, es decir, concentración de hasta el 22% v/v.

En la presente invención, al menos una esterasa comprende una cutinasa. Las cutinasas son enzimas que son capaces de degradar la cutina. La cutinasa puede ser derivada de cualquier fuente. En una forma de realización preferida, la cutinasa está derivada de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Fusarium*, en particular de *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, *Fusarium roseum culmorum*, o *Fusarium roseum sambucium*, una cepa de *Helmintosporium*, en particular *Helmintosporium sativum*, una cepa de *Humicola*, en particular de *Humicola insolens*, una cepa de *Pseudomonas*, en particular *Pseudomonas mendocina*, o *Pseudomonas putida*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Streptomyces scabies*, en particular *Streptomyces scabies*, o una cepa de *Ulocladium*, en particular *Ulocladium consortiale*. En una forma de realización más preferida, la cutinasa es derivada de una cepa de *Humicola insolens*, en particular la cepa DSM 1800 de *Humicola insolens*. La cutinasa de *Humicola insolens* está descrita en WO 96/13580, que está incorporada en la presente por referencia. Las cutinasas preferidas incluyen JC 492 (disponibles de Novozymes A/S).

Las cutinasas son preferiblemente añadidas en cantidades de aproximadamente 0,5 a 1000 U/g DS % en medios de fermentación, preferiblemente, de 1 a 400 U/g DS %, tal como, de 40 a 400 U/g DS %, más preferiblemente, de 1 a 20 U/g DS %, tal como, de 1 a 10 U/g DS % y de 1 a 5 U/g DS %.

En una forma de realización preferida de la presente invención, al menos una esterasa comprende además una enzima lipolítica, más preferiblemente, una lipasa. Como se utiliza en este caso, "enzimas lipolíticas" se refiere a lipasas y fosfolipasas (incluidas las liso-fosfolipasas). La enzima lipolítica es preferiblemente de origen microbiano, en particular de origen bacteriano fúngico o de levadura. La enzima lipolítica usada puede ser derivada de cualquier fuente, incluso, por ejemplo, una cepa de *Absidia*, en particular *Absidia blakesleena* y *Absidia corymbifera*, una cepa

de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aeromonas*, una cepa de *Alternaria*, en particular *Alternaria brassiciola*, una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus Niger* y *Aspergillus flavus*, una cepa de *Achromobacter*, en particular *Achromobacter iophagus*, una cepa de *Aureobasidium*, en particular *Aureobasidium pullulans*, una cepa de *Bacillus*, en particular *Bacillus pumilus*, *Bacillus strearothermophilus* y *Bacillus subtilis*, una cepa de *Beauveria*, una cepa de *Brochothrix*, en particular *Brochothrix thermosohata*, una cepa de *Candida*, en particular *Candida cylindracea* (*Candida rugosa*), *Candida paralipolytica*, y *Candida antarctica*, una cepa de *Chromobacter*, en particular *Chromobacter viscosum*, una cepa de *Coprinus*, en particular *Coprinus cinerius*, una cepa de *Fusarium*, en particular *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium solani pisi*, y *Fusarium roseum culmorum*, una cepa de *Geotricum*, en particular *Geotricum penicillatum*, una cepa de *Hansenula*, en particular *Hansenula anomala*, una cepa de *Humicola*, en particular *Humicola brevispora*, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, y *Humicola insolens*, una cepa de *Hyphozyma*, una cepa de *Lactobacillus*, en particular *Lactobacillus curvatus*, una cepa de *Metarhizium*, una cepa de *Mucor*, una cepa de *Paecilomyces*, una cepa de *Penicillium*, en particular *Penicillium cyclopium*, *Penicillium crustosum* y *Penicillium expansum*, una cepa de *Pseudomonas* en particular *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia* (sin. *Burkholderia cepacia*), *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas mephitica lipolytica*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas plantad*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, y *Pseudomonas wisconsinensis*, una cepa de *Rhizoctonia*, en particular *Rhizoctonia solani*, una cepa de *Rhizomucor*, en particular de *Rhizomucor miehei*, una cepa de *Rhizopus*, en particular *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus microsporus* y *Rhizopus nodosus*, una cepa de *Rhodospiridium*, en particular *Rhodospiridium toruloides*, una cepa de *Rhodotorula*, en particular *Rhodotorula glutinis*, una cepa de *Sporobolomyces*, en particular *Sporobolomyces shibatanus*, una cepa de *Thermomyces*, en particular *Thermomyces lanuginosus* (precedentemente *Humicola lanuginosa*), una cepa de *Thiarosporella*, en particular *Thiarosporella phaseolina*, una cepa de *Trichoderma*, en particular *Trichoderma harzianum*, y *Trichoderma reesei*, y/o una cepa de *Verticillium*.

En una forma de realización preferida, la enzima lipolítica usada según la invención es derivada de una cepa de *Aspergillus*, una cepa de *Achromobacter*, una cepa de *Bacillus*, una cepa de *Candida*, una cepa de *Chromobacter*, una cepa de *Fusarium*, una cepa de *Humicola*, una cepa de *Hyphozyma*, una cepa de *Pseudomonas*, una cepa de *Rhizomucor*, una cepa de *Rhizopus*, o una cepa de *Thermomyces*.

En formas de realización más preferidas, la enzima lipolítica es una lipasa. Las lipasas pueden ser aplicadas en la presente, p. ej., por su capacidad para modificar la estructura y composición de aceites y grasas de triglicéridos en los medios de fermentación (incluso la levadura de fermentación), por ejemplo, que resultan de un sustrato de maíz. Las lipasas catalizan diferentes tipos de conversiones de triglicéridos, tales como la hidrólisis, esterificación y transesterificación. Las lipasas adecuadas incluyen las lipasas ácidas, neutras y básicas, como son bien conocidas en la técnica, aunque las lipasas ácidas (tales como, p. ej., la lipasa G AMANO 50, disponible por Amano) parecen ser más eficaces a concentraciones inferiores de lipasa en comparación con las lipasas bien neutras o básicas. Las lipasas preferidas para el uso en la presente invención incluían la lipasa de *Candida antarctica* y la lipasa de *Candida cylindracea*. Lipasas más preferidas lipasas son purificadas tales como la lipasa de *Candida antarctica* (lipasa A), la lipasa de *Candida antarctica* (lipasa B), la lipasa de *Candida cylindracea*, y la lipasa de *Penicillium camembertii*.

Las lipasas comerciales preferidas incluyen LIPOLASE y LIPEX (disponibles de Novozymes A/S) y G AMANO 50 (disponibles de Amano).

Lipasas son preferiblemente añadidas en cantidades de aproximadamente 0,5 a 1000 LU/g DS % en medios de fermentación, preferiblemente, de 1 a 400 LU/g DS, más preferiblemente de 1 a 20 LU/g DS %, tal como, de 1 a 10 LU/g DS % y de 1 a 5 LU/g DS %.

En otra forma de realización preferida, al menos una esterasa, dicha al menos una enzima de esterasa comprende una cutinasa y además comprende una fosfolipasa. Las fosfolipasas son enzimas que tienen actividad hacia los fosfolípidos. Los fosfolípidos, tales como la lecitina o la fosfatidicolina, consisten en glicerol esterificado con dos ácidos grasos en una posición externa (sn-1) y media (sn-2) y esterificados con ácido fosfórico en la tercera posición; el ácido fosfórico, sucesivamente, puede ser esterificado a un aminoalcohol. Las fosfolipasas son enzimas que participan en la hidrólisis de los fosfolípidos. Diferentes tipos de actividad fosfolipasa pueden ser distinguidos, incluidas las fosfolipasas A₁ y A₂ que hidrolizan un grupo acilo graso (en la posición sn-1 y sn-2, respectivamente) para formar lisofosfolípidos; y lisofosfolipasa (o fosfolipasa B) que pueden hidrolizar el grupo acilo graso restante en lisofosfolípido. La fosfolipasa C y fosfolipasa D (fosfodiesterasas) liberan diacil glicerol o ácido fosfatídico respectivamente.

El término fosfolipasa incluye enzimas con actividad fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa A (A₁ o A₂), actividad fosfolipasa B, actividad fosfolipasa C o actividad fosfolipasa D. El término "fosfolipasa A" usado en la presente en relación con una enzima de la invención se destina a cubrir una enzima con actividad Fosfolipasa A₁ y/o Fosfolipasa A₂. La actividad fosfolipasa puede ser proporcionada por enzimas que tienen también otras actividades, tales como, p. ej., una lipasa con actividad fosfolipasa. La actividad fosfolipasa puede, p. ej., proceder de una lipasa con actividad fosfolipasa secundaria. En otras formas de realización de la invención la actividad enzimática de la fosfolipasa está provista por una enzima que sólo tiene esencialmente actividad fosfolipasa y donde la actividad enzimática de la fosfolipasa no es una actividad secundaria.

La fosfolipasa puede ser de cualquier origen, p. ej. de origen de animal (tal como, p. ej. mamífero), p. ej. pancreático (p. ej. páncreas bovino o porcino), o veneno de serpiente o veneno de abeja. De forma alternativa, la fosfolipasa

puede ser de origen microbiano, p. ej. de hongos filamentosos, levadura o bacterias, tales como el género o la especie *Aspergillus*, p. ej. *A. Niger*, *Dictyostelium*, p. ej. *D. discoideum*; *Mucor*, p. ej. *M. javanicus*, *M. mucedo*, *M. subtilissimus*; *Neurospora*, p. ej. *N. crassa*; *Rhizomucor*, p. ej. *R. pusillus*; *Rhizopus*, p. ej. *R. arrhizus*, *R. japonicus*, *R. stolonifer*; *Sclerotinia*, p. ej. *S. libertiana*; *Trichophyton*, p. ej. *T. rubrum*; *Whetzelinia*, p. ej. *W. sclerotiorum*; *Bacillus*, p. ej. *B. megaterium*, *B. subtilis*; *Citrobacter*, p. ej. *C. freundii*; *Enterobacter*, p. ej. *E. aerogenes*, *E. cloacae* *Edwardsiella*, *E. tarda*; *Erwinia*, p. ej. *E. herbicola*; *Escherichia*, p. ej. *E. coli*; *Klebsiella*, p. ej. *K. pneumoniae*; *Proteus*, p. ej. *P. vulgaris*; *Providencia*, p. ej. *P. stuartii*; *Salmonella*, p. ej. *S. typhimurium*; *Serratia*, p. ej. *S. liquefaciens*, *S. marcescens*; *Shigella*, p. ej. *S. flexneri*; *Streptomyces*, p. ej. *S. violeceoruber*, *Yersinia*, p. ej. *Y. enterocolitica*. Por tanto, la fosfolipasa puede ser fúngica, p. ej. de la clase *Pyrenomyces*, tal como el género *Fusarium*, tal como una cepa de *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani*, o una cepa de *F. oxysporum*. La fosfolipasa puede también ser de una cepa de hongos filamentosos dentro del género *Aspergillus*, tal como una cepa de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. Las fosfolipasas preferidas comerciales incluyen LECITASE y LECITASE ULTRA (disponible por Novozymes A/S).

Las fosfolipasas son preferiblemente añadidas en cantidades de aproximadamente 0,5 a 1000 PLA/U/g DS % en medios de fermentación, preferiblemente, de 1 a 400 PLA/U/g DS %, más preferiblemente, de 1 a 20 PLA/U/g DS %, tal como, 1-10 PLA/U/g DS %.

En otra forma de realización preferida, se usan combinaciones de esterases, tales como (1) una lipasa y una cutinasa; (2) una lipasa y una fosfolipasa y una cutinasa; y (3) una fosfolipasa y una cutinasa.

En otra forma de realización preferida, la actividad o actividades enzimática(s) adicional(es) pueden ser usadas en combinación con (así como antes de, durante o después de) el tratamiento de esterasa de la presente invención. Además de combinar la esterasa con las enzimas generalmente usadas en el tratamiento de almidón, p. ej., las alfa-amilasas y las glucoamilasas, otras enzimas preferidas adicionales también incluyen las proteasas, las fitasas, las xilanasas, las celulasas, las alfa-amilasas maltogénicas y las beta-amilasas. Más preferiblemente, las enzimas adicionales son las proteasas, las fitasas, las xilanasas, las alfa-amilasas maltogénicas y las beta-amilasas.

En una forma de realización preferida, el tratamiento de esterasa se usa en combinación con una fitasa. Conforme a esta forma de realización, una fitasa puede ser usada, p. ej., para promover la liberación del fosfato inorgánico del ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfato) o de cualquier derivado de sal (fitatos) presentes en el medio. La fitasa puede ser añadida durante la fermentación o antes de la fermentación, así como, durante la propagación o en una fase antes de la fermentación, p. ej., una fase de licuefacción y/o de sacarificación. Las fitasas pueden ser añadidas, p. ej., para mejorar la biodisponibilidad de minerales esenciales para la levadura, como se describe en la solicitud de PCT WO 01/62947, que está incorporada en la presente por referencia.

Una "fitasa" es una enzima capaz de efectuar la liberación de fosfato inorgánico del ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfato) o de cualquier derivado de sal (fitatos). Las fitasas pueden ser clasificadas según su especificidad en la fase de hidrólisis inicial, es decir, según la cual el grupo fosfato-éster es hidrolizado primero. La fitasa para ser usada en la invención puede tener cualquier especificidad, p. ej., una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), una 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 5-fitasa (ningún número E.C.).

La fitasa puede ser derivada de plantas o microorganismos, tales como bacterias u hongos, p. ej., levadura u hongos filamentosos. La fitasa de las plantas puede ser de salvado de trigo, maíz, soja o polen de lirio. Las fitasas de las plantas adecuadas están descritas en Thomlinson *et al*, *Biochemistry*, 1 (1962), 166-171 ; Barrientos *et al*, *Plant. Physiol.*, 106 (1994), 1489-1495; WO 98/05785; WO 98/20139.

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

Una fitasa de levadura o mio-inositol monofosfatasa puede derivar del género *Saccharomyces* o *Schwanniomyces*, preferiblemente de las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Schwanniomyces occidentales*. Las fitasas de levadura adecuadas están descritas en Nayini *et al*, 1984, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 17:24-26; Wodzinski *et al*, *Adv. Appl. Microbiol.*, 42, 263-303; AU-A-24840/95;

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

Las fitasas modificadas o variantes de fitasas son obtenibles por métodos conocidos en la técnica, en particular por los métodos descritos en EP 897010; EP 897985; WO 99/49022; WO 99/48330. Las fitasas comercialmente

disponibles incluyen BIO-FEED PHYTASE™, PHYTASE NOVO™ CT o L (Novozymes A/S), o NATUPHOS™ NG 5000 (DSM).

La fitasa puede preferiblemente ser añadida en una cantidad de 0,005 a 250 FYT/g DS %, preferiblemente 10 a 100 FYT/g DS %. Una dosificación adecuada preferida de la fitasa es en una cantidad de 0,005-25 FYT/g DS %, más preferiblemente 0,01-10 FYT/g, tal como 0,1-1 FYT/g DS %. Aquí, la actividad fitasa es determinada usando unidades FYT, una FYT siendo la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por min. Según las condiciones siguientes: pH 5.5. temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$) a una concentración de 0,0050 mol/L.

En otra forma de realización preferida, el tratamiento de esterasa se usa en combinación con una proteasa. La proteasa puede ser usada, p. ej., para digerir la proteína para producir amino nitrógeno libre (FAN). Tales aminoácidos libres funcionan como nutrientes para la levadura, de ese modo aumentando el crecimiento de la levadura y, consecuentemente, la producción de etanol.

Además, aunque la concentración de glicerol aumentada resultante del tratamiento de esterasa puede aumentar la tolerancia al etanol de la levadura y mejorar el rendimiento de etanol, una concentración de glicerol que sea demasiado alta puede tener un efecto perjudicial en el rendimiento de la levadura. En el caso de que esto ocurra, el tratamiento de proteasa puede por consiguiente también ser usado para reducir o mantener la concentración de glicerol dentro de los límites deseados preferibles para el microorganismo de fermentación.

Las proteasas son bien conocidas en la técnica y se refieren a enzimas que catalizan el seccionamiento de enlaces peptídicos. Las proteasas adecuadas incluyen proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo del pH 7. Las proteasas fúngicas ácidas adecuadas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Enthomophtra*, *Irpex*, *Penicillium*, *Sclerotium* y *Torulopsis*. Especialmente se contemplan las proteasas derivadas de *Aspergillus Niger* (véase, p. ej., Koaze *et al.*, (1964), Agr. Biol. Chem. Japón, 28, 216), *Aspergillus saitoi* (véase, p. ej., Yoshida, (1954) J. Agr. Chem. Soc. Japón, 28, 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida *et al.*, (1977) Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus oryzae*; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

Proteasas comerciales incluyen GC 106 y SPEZYME FAN (disponible por Genencor). Las proteasas bacterianas adecuadas, aunque no las proteasas ácidas, incluyen los productos comercialmente disponibles Alcalase® y Neutrase® (disponibles por Novozymes A/S).

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

La proteasa puede preferiblemente ser añadida en una cantidad de 10^{-7} a 10^{-5} gramos de proteína proteasa activa/g DS %, en particular de 10^{-7} a 5×10^{-6} gramos de proteína proteasa activa/g DS %.

En otra forma de realización preferida, el tratamiento de esterasa se usa en combinación con una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4- α -maltohidrolasa, E.C. 3,2,1,133) es capaz de hidrolizar la amilosa y la amilopectina a maltosa en la alfa-configuración. Ejemplos de alfa-amilasas maltogénicas incluyen la alfa-amilasa maltogénica de la cepa NCIB 11837 de *B. stearothermophilus*. Las alfa-amilasas maltogénicas están descritas en las patentes estadounidenses Nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628, que están incorporadas en la presente por referencia. Una amilasa maltogénica comercialmente disponible es MALTOGENASE™ (disponible por Novozymes A/S). Preferiblemente, la alfa-amilasa maltogénica se usa en un proceso de hidrólisis de almidón crudo para ayudar a la formación de almidón retrogradado. Preferiblemente, la esterasa es combinada con la alfa-amilasa maltogénica en un proceso de licuefacción. Preferiblemente, la alfa-amilasa maltogénica se añade en una cantidad de 0,02 a 1,0 g/DS %.

En otra forma de realización preferida, el tratamiento de esterasa se usa en combinación con una beta-amilasa. Beta-amilasa (E.C. 3,2,1,2) es el nombre generalmente dado a las exo-amilasas maltogénicas, que catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4-alfa-glucosídicos en la amilosa, amilopectina y los polímeros de glucosa relacionados. Las unidades de maltosa son sucesivamente eliminadas de los extremos no reductores de la cadena de una manera gradual hasta que se degrade la molécula o, en el caso de la amilopectina, hasta que se alcance un punto de ramificación. La maltosa liberada tiene la configuración beta anomérica, por lo tanto el nombre beta-amilasa.

Las beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty y C.T. Kelly, Progress in Industrial Microbiology, vol. 15, pp. 112-115, 1979). Estas beta-amilasas se caracterizan porque tienen temperaturas óptimas en la gama de 40°C a 65°C y pH óptimo en la gama de 4.5 a 7. Otros ejemplos de beta-amilasa incluyen las beta-amilasas descritas en la patente U.S. No. 5,688,684. Las beta-amilasas comercialmente disponibles incluyen NOVOZYME WBA (de Novozymes A/S) y SPEZYME™ BBA 1500 y OPTIMALT (de Genencor Int., EEUU).

En otra forma de realización preferida, el tratamiento de esterasa se usa en combinación con una xilanasa. La actividad xilanasa (E.C. 3.2.1.8) puede ser derivada de cualquier fuente adecuada, incluso de organismos fúngicos y bacterianos, tales como *Aspergillus*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Fusarium* y *Trichoderma*. Las preparaciones preferidas comercialmente disponibles comprendiendo xilanasa incluyen SHEARZYME[®], BIOFEED WHEAT[®], CELLUCLAST[®], ULTRAFLO[®], VIS- COZYME[®] (Novozymes A/S) y SPEZYME[®] CP (Genencor Int.).

En otra forma preferida, el tratamiento de esterasa se usa en combinación con una celulasa. La actividad celulasa usada según la invención puede ser derivada de cualquier origen adecuado, preferiblemente, la celulasa es de origen microbiano, así como derivable de una cepa de un hongo filamentoso (p. ej., *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*). Las preparaciones comercialmente disponibles comprendiendo celulasa que pueden ser usadas incluyen CELLUCLAST[®], CEL-LUZYME[®], CEREFLO[®] y ULTRAFLO[®] (Novozymes A/S), LAMINEXTM y SPEZYME[®] CP (Genencor Int.) y ROHAMENT[®] 7069 W (de Röhm GmbH).

Los procesos de fermentación descritos en la presente se usan preferiblemente en combinación con procesos de licuefacción o de sacarificación. Cualquier proceso de licuefacción o sacarificación puede ser usado en combinación con el proceso de fermentación de la presente invención. Según la presente invención, la sacarificación y licuefacción puede ser realizada simultáneamente o separadamente con el proceso de fermentación. En una forma de realización preferida de la presente invención, los procesos de licuefacción, sacarificación y fermentación son realizados simultáneamente.

“Licuefacción” es un proceso en el que la materia prima del grano molido (entero) se descompone (hidroliza) en maltodextrinas (dextrinas). La licuefacción se realiza frecuentemente como un proceso de pasta caliente en tres fases. La pasta se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y las enzimas son agregadas para iniciar la licuefacción (disolución). La pasta es luego cocida a chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C para completar la gelatinización de la pasta. Luego la pasta es enfriada a 60-95°C y más enzima(s) es (son) añadida(s) para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a pH 4.5-6.5, en particular a un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados son conocidos como una trituration.

Los procesos de licuefacción se realizan normalmente usando una alfa-amilasa. Las alfa-amilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano. Más preferiblemente, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Bacillus*, como por ejemplo, derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. Otras alfa-amilasas incluyen la alfa-amilasa derivada de una cepa de *Bacillus sp.* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas ellas están descritas con detalle en WO 95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31. Otras variantes e híbridos de la alfa-amilasa están descritos en WO 96/23874, WO 97/41213, y WO 99/19467. Otras alfa-amilasas incluyen las alfa-amilasas derivadas de una cepa de *Aspergillus*, tales como, las alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger*.

En una forma de realización preferida, la alfa amilasa es una alfa-amilasa ácida. El término “alfa-amilasa ácida” significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que cuando se añade en una cantidad eficaz tiene actividad a un pH en la gama de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 3.5 a 6.0, o más preferiblemente de 4.0-5.0. Cualquier alfa-amilasa ácida adecuada puede ser usada en la presente invención.

En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida es una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana. La alfa-amilasa ácida preferido para el uso en la presente invención puede ser derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. Más preferiblemente, la alfa-amilasa ácida es una alfa amilasa ácida fúngica, tal como, SP 288 (disponible por Novozymes).

Las composiciones comerciales preferidas comprendiendo alfa-amilasa incluyen MYCOLASE (Gist Brocades), BAN[™], TERMAMYL[™] SC, FUNGAMYL[™], LIQUOZYME[™] X y SAN[™] SUPER, SAN[™] EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE L-40,000, DEX-LO[™], SPEYME FRED, SPEZYME[™] AA, y SPEZYME[™] DELTA AA (Genencor Int.).

La alfa-amilasa puede ser añadida en cantidades como aquellas que son bien conocidas en la técnica. Cuando se miden en unidades AAU la actividad alfa-amilasa ácida está preferiblemente presente en una cantidad de 5-500000 AAU/kg de DS, en una cantidad de 500-50000 AAU/kg de DS, o más preferiblemente en una cantidad de 100-10000 AAU/kg de DS, tal como 500-1000 AAU/kg DS. La alfa-amilasa ácida fúngica se añade preferiblemente en una cantidad de 10-10000 AFAU/kg de DS, en una cantidad de 500-2500 AFAU/kg de DS, o más preferiblemente en una cantidad de 100-1000 AFAU/kg de DS, tal como aproximadamente 500 AFAU/kg DS.

“Sacarificación” es un proceso en el que la maltodextrina (tal como se produce en el proceso de licuefacción) se convierte en azúcares DP₁₋₃ de bajo peso molecular (es decir, fuente de carbohidratos) que pueden ser metabolizados por el organismo de fermentación, tal como, la levadura. Los procesos de sacarificación son bien conocidos en la técnica y son normalmente realizados enzimáticamente usando una glucoamilasa. De forma alternativa o adicional, se pueden usar las alfa-glucosidasas o las alfa-amilasas ácidas. Un proceso de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, y es frecuentemente realizado a temperaturas de aproximadamente 30 a 65 grados Celsius, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4.5. No obstante, es frecuentemente más preferido hacer una fase de presacarificación, que dure aproximadamente 40 a 90 minutos, a temperatura de entre 65°C 30, normalmente aproximadamente 60°C, seguida de una sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y de fermentación simultáneo (SSF).

La glucoamilasa usada en el proceso de sacarificación puede ser derivada de cualquier fuente adecuada, p. ej., derivada de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa G1 o G2 de *A. Niger* (Boel *et al.* (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tales como aquellas descritas en WO 92/00381 y WO 00/04136; la glucoamilasa de *A. awamori* (WO 84/02921), *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas.

Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes para aumentar la termoestabilidad, tales como, G137A y G139A (Chen *et al.* (1996), Prot. Engng. 9,499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al.* (1995), Prot. Engng. 8, 575-582); N182 (Chen *et al.* (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe *et al.* (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li *et al.* (1997), Protein Engng. 10, 1199-1204. Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular, derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente US no. Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente US no. 4,587,215). Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. termohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

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

Las glucoamilasas pueden en una forma de realización ser añadidas en una cantidad de 0,02-2 AGU/g DS, preferiblemente 0,1-1 AGU/g DS, tal como 0,2 AGU/g DS.

El proceso usado más extensamente en la producción de etanol es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneo (SSF), donde no hay ninguna fase de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentativo, tal como la levadura, y la(s) enzima(s) se añaden juntos. En procesos SSF, es común introducir una fase de presacarificación a una temperatura por encima de 50°C, justo antes de la fermentación.

Más preferiblemente, el proceso de licuefacción, sacarificación o fermentación es un proceso de licuefacción-sacarificación-fermentación simultáneo (LSF) también denominado proceso único enzimático, en el que el proceso de licuefacción, sacarificación y fermentación se realiza en un proceso, es decir, todas las enzimas (o agentes no enzimáticos sustituibles o adicionales) y la levadura usada para licuefacción, sacarificación y fermentación, por consiguiente, son agregados en la misma fase del proceso, más preferiblemente, simultáneamente en la misma fase del proceso.

Las condiciones del proceso preferidas para el proceso LSF incluyen temperaturas de aproximadamente 26°C a 40°C, preferiblemente de aproximadamente 32°C, pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente pH 5, y duraciones del proceso de aproximadamente 48 a 72 horas, preferiblemente de aproximadamente 72 horas.

Preferiblemente, el proceso LSF o proceso enzimático único es un proceso de hidrólisis de almidón crudo (raw starch hydrolysis, RSH), más preferiblemente, usado en la producción de alcohol, tal como, p. ej., etanol. Un proceso de “hidrólisis del almidón crudo” (RSH) difiere de los procesos de tratamiento de almidón crudo convencionales en los que el almidón crudo no cocido, también denominado almidón granuloso, se usa en el proceso de fermentación del etanol. Como se utiliza en este caso, el término “almidón granuloso” significa el almidón crudo no cocido, es decir el almidón que se encuentra en su forma natural, p. ej., en cereal, tubérculos o granos. El almidón está formado dentro de células vegetales como gránulos minúsculos insolubles en agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas hasta 50°C a 75°C la hinchazón puede ser reversible. Sin embargo, con temperaturas más altas empieza una hinchazón irreversible llamada gelatinización.

El término “temperatura de gelatinización inicial” significa la temperatura mínima en la que comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua comienza a gelatinizarse entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y puede ser determinado rápidamente por un experto. Por ejemplo, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según las especies de plantas, la variedad particular de las especies de plantas así como con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención la temperatura de gelatinización inicial de un almidón dado es la temperatura en la que se pierde la birrefringencia en un 5% de los gránulos de almidón usando el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., Starch/Stärke, Vol. 44 (12) pp. 461-466 (1992).

Conforme a una forma de realización preferida, las esterasas pueden ser usadas, preferiblemente en combinación con una amilasa y/o una glucoamilasa, para aumentar el rendimiento de etanol en procesos de hidrólisis de almidón crudo. Aunque no esté limitado a una teoría de operación, se cree que el tratamiento de esterasa mejora los procesos de hidrólisis del almidón crudo por uno o más de los siguientes mecanismos:

a) suplementación de levadura con ácidos grasos insaturados exógenos generados por esterasa. Por ejemplo, en la fermentación del maíz, las esterasas tales como las lipasas pueden estimular tanto el crecimiento de levadura como el rendimiento mediante la conversión del aceite de maíz en ácidos grasos insaturados que son útiles para la levadura.

b) Inhibición de la síntesis de ésteres por ácidos grasos insaturados exógenos generados por esterasa. Hay una ventaja adicional de suministrar levadura con ácidos exógenos insaturados en la que los ácidos grasos insaturados pueden aumentar el rendimiento del etanol suprimiendo la síntesis del éster etílico debido a la inhibición de acetiltransferasa de alcohol de levadura por ácidos grasos insaturados exógenos. Además, los ácidos grasos, tales como ácidos grasos derivados de maíz producidos en un proceso de hidrólisis de almidón crudo pueden ser subproductos muy valiosos. El ácido linoleico, por ejemplo, es un componente de vitamina F y está en una categoría de ácidos grasos esenciales, y el ácido alfa-linoleico es convertido por cuerpo humano en ácidos grasos omega-3, que desempeñan varias funciones reguladoras importantes.

c) promoción de la liberación de almidón. En la hidrólisis del almidón crudo, las esterasas, tales como, lipasas y fosfolipasas, pueden utilizarse para facilitar la liberación de almidón mediante la actuación en las membranas de los amiloplastos y complejos almidón-lípidos.

d) Formación/concentración de glicerol. La producción de etanol a partir de glucosa es un proceso neutro redox mientras que la formación de glicerol mantiene el equilibrio redox de la levadura a expensas de la conversión del carbohidrato en etanol. La mayor parte del glicerol se produce durante los estadios tempranos de fermentación como resultado del crecimiento de la levadura cuando casi toda la NADH se forma nuevamente en la síntesis de aminoácidos procedentes del amonio y de la glucosa. El tratamiento de esterasa puede utilizarse para aumentar la concentración de glicerol, lo que tiene un efecto provechoso en la tolerancia del etanol de la levadura. No obstante, si la concentración de glicerol se vuelve demasiado elevada, una proteasa u otro agente reductor de glicerol adecuado puede ser añadido para reducir la concentración de glicerol.

e) Los ácidos grasos libres pueden funcionar como interruptores de espuma. La presencia de ácidos grasos libres se refiere a la inestabilidad de la espuma, y el tratamiento de esterasa puede también reducir la formación de espuma durante el proceso de fermentación.

En una forma de realización preferida, la presente invención implica tratar la pasta de almidón granuloso con una glucoamilasa y/o alfa-amilasa, una levadura y al menos una esterasa a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del almidón granuloso. Preferiblemente, la levadura es levadura roja de etanol. La amilasa es preferiblemente una alfa amilasa ácida, más preferiblemente una alfa-amilasa fúngica ácida, tal como, SP 288 (de Novozymes).

En una forma de realización más preferida, el proceso de hidrólisis de almidón crudo, implica tratar la pasta de almidón granuloso con una glucoamilasa y/o alfa-amilasa a una temperatura entre 0°C y 20°C por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del almidón granuloso, seguido del tratamiento de la pasta con una glucoamilasa y/o alfa-amilasa, levadura y al menos una esterasa a una temperatura de entre 10°C y 35°C.

En otra forma de realización preferida, el proceso implica las fases secuenciales de: (a) tratar una pasta de almidón granuloso con una alfa-amilasa ácida y una glucoamilasa a una temperatura de 0°C a 20°C por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del almidón granuloso, preferiblemente durante un periodo de 5 minutos a 12 horas, (b) tratar la pasta en presencia de una alfa-amilasa ácida, una glucoamilasa, una levadura y al menos una esterasa a una temperatura de entre 10°C y 35°C, preferiblemente durante un periodo de 20 a 250 horas para producir etanol.

Otras enzimas y estimuladores de la fermentación pueden ser usados en combinación con el tratamiento de esterasa en el proceso de RSH. Preferiblemente, la otra enzima es seleccionada del grupo que consiste en una fitasa, proteasa, xilanasas, celulasa, una alfa-amilasa maltogénica y combinaciones de las mismas. En procesos de RSH, el ácido fítico está presente en cantidades significantes. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, las fitasas pueden utilizarse para promover la liberación de fosfato inorgánico de ácido fítico (mio-inositol hexakisfosfato) o de cualquier derivado de sal (fitatos), tal y como se ha descrito anteriormente.

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

Una aplicación preferida de los procesos y composiciones de fermentación descritos en la presente es en un proceso de producción de alcohol (tal como, p. ej., etanol para el uso como un combustible o aditivo de combustible), más preferiblemente usando un proceso de hidrólisis de almidón crudo. Los procesos descritos aquí pueden ser usados, p. ej., para aumentar el nivel y/o el rendimiento de producción de etanol. La adición de una cantidad eficaz de al menos una esterasa, dicha al menos una esterasa comprende una cutinasa, opcionalmente en combinación con una lipasa y/o una fosfolipasa, puede utilizarse para aumentar el límite de tolerancia al etanol del microorganismo fermentativo y de ese modo mejorar el rendimiento de etanol del producto de fermentación convirtiendo los componentes, tales como, el aceite del sustrato de maíz, en componentes útiles para el microorganismo fermentativo, p. ej., ácidos insaturados grasos y glicerol. Como está ilustrado en los ejemplos, el tratamiento de esterasa según la presente invención resultó en un aumento del rendimiento de etanol.

Los procesos de producción de etanol generalmente implican las fases de trituración, licuefacción, sacarificación, fermentación y destilación. En la producción de etanol y otros productos a base de almidón, la materia prima, tal como el grano entero, preferiblemente maíz, es molido para descubrir la estructura y permiten el tratamiento adicional. Dos procesos son preferidos según la invención: molienda húmeda y molienda en seco. Para la producción de etanol se

prefiere la molienda en seco en la que el grano entero es molido y usado en la parte restante del proceso. La molienda húmeda también puede ser usada y da una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica con algunas excepciones a lugares en los que hay una producción paralela de jarabes. Tanto los procesos de molienda húmeda y en seco son bien conocidos en la técnica.

En la producción de etanol, el organismo de fermentación es preferiblemente la levadura, que se aplica a la trituration. Una levadura preferida es derivada de *Saccharomyces spp.*, más preferiblemente, de *Saccharomyces cerevisiae*. En las formas de realización preferidas, la levadura se aplica a la trituration y la fermentación está progresando durante 24-96 horas, así como normalmente 35-60 horas. En las formas de realización preferidas, la temperatura está generalmente entre 26-34°C, en particular aproximadamente a 32°C, y el pH es generalmente pH 3-6, preferiblemente alrededor de pH 4-5. Las células de levadura son preferiblemente aplicadas en cantidades de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} cuentas de levadura viables, especialmente 5×10^7 por ml de caldo de fermentación. Durante la fase de producción de etanol el recuento de células de levadura debería preferiblemente estar en la gama de 10^7 a 10^{10} cuentas de levadura viables especialmente alrededor de 2×10^8 . Se puede encontrar una guía adicional sobre el uso de la levadura para la fermentación en, p. ej., "Te alcohol Textbook" (Editores K. Jacques, T.P. Lyons y D.R. Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido 1999), que se incorpora en la presente por referencia.

Después de la fermentación, la trituration puede ser destilada para extraer el producto de alcohol (etanol). En el caso de que el producto final sea etanol, obtenido según los procesos de la invención, se puede usar como, p. ej., etanol para combustible; etanol para bebida, es decir, licores neutros potables; o etanol industrial.

Las esterasas y otras enzimas a las que se hace referencia en la presente pueden ser derivadas u obtenidas de cualquier origen adecuado, incluso de cualquier origen bacteriano, fúngico, de levadura o de mamífero. El término "derivado" o significa en este contexto que la enzima puede haber sido aislada de un organismo cuando está presente de forma nativa, es decir, la identidad de la secuencia de aminoácidos de la enzima es idéntica a una enzima nativa. El término "derivado" también significa que las enzimas pueden haber sido producidas de forma recombinante en un organismo huésped, la enzima recombinante producida tiene sea una identidad idéntica a una enzima nativa o sea una secuencia de aminoácidos modificada, p. ej. con uno o más aminoácidos, que son deletados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida de forma recombinante que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácidos nucleicos conocidos en la técnica. Dentro del significado de una enzima nativa se incluyen variantes naturales. Además, el término "derivado" incluye enzimas producidas sintéticamente por, p. ej., síntesis peptídica. El término "derivado" también incluye enzimas que han sido modificadas p. ej. por glicosilación, fosforilación, o por otra modificación química, sea *in vivo* o *in vitro*. El término "obtenido" en este contexto significa que la enzima tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una enzima nativa. El término incluye una enzima que ha sido aislada de un organismo en el que está presente de forma nativa, o que se ha expresado de forma recombinante en el mismo tipo de organismo o en otro, o enzimas producidas sintéticamente por, p. ej., síntesis peptídica. Respecto a las enzimas de recombinación producidas los términos "obtenido" y "derivado" se refieren a la identidad de la enzima y no a la identidad del organismo huésped en el que se ha producido de forma recombinante.

Las enzimas pueden también ser purificadas. El término "purificado" como se utiliza en este caso cubre las enzimas libres de otros componentes del organismo del cual derivan. El término "purificado" también cubre las enzimas libres de componentes del organismo nativo del cual se obtienen. Las enzimas pueden ser purificadas, sólo con cantidades menores de otras proteínas que están presentes. La expresión "otras proteínas" se refieren en particular a otras enzimas. El término "purificado" como se utiliza en este caso también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente de otras proteínas y más particularmente de otras enzimas presentes en la célula de origen de la enzima de la invención. La enzima puede ser "sustancialmente pura", es decir, libre de otros componentes del organismo en el que se ha producido, es decir, por ejemplo, un organismo huésped para las enzimas producidas de forma recombinante. En la forma de realización preferida, las enzimas tienen al menos un 75% (p/p) de pureza, más preferiblemente al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99% de pureza. En otra forma de realización preferida, la enzima tiene un 100% de pureza.

Las enzimas usadas en la presente invención pueden ser de cualquier forma (composición) adecuada para el uso en los procesos descritos aquí, tal como p. ej. en forma de un polvo seco o granulado, un granulado no pulverulento, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Los granulados pueden ser producidos, p. ej., como se describe en las patentes estadounidenses Nos. 4,106,991 y US 4,661,452, y pueden opcionalmente ser revestidos por métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, ácido láctico u otro ácido orgánico conforme a los métodos establecidos. Las enzimas protegidas pueden ser preparadas conforme al método descrito en EP 238,216.

Cuando se usa en combinación con procesos o tratamientos que emplean otras enzimas, tales como, amilasas y glucoamilasas usadas en procesos de licuefacción y/o de sacarificación, se prefieren las composiciones de esterasa que no inhiben estas otras enzimas, p. ej., se prefieren las composiciones de esterasa que no contienen o que sólo contienen cantidades menores de compuestos de unión al calcio. De forma similar, se prefieren las composiciones de esterasa que no inhiben los procesos de fermentación, p. ej., se prefieren las composiciones de esterasa que no contienen o que sólo contienen cantidades menores de glicerol.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, se puede usar un estimulador de la fermentación en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos en la presente para mejorar adicionalmente el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentativo, tal como, el incremento del índice y el rendimiento de etanol. Un “estimulador de la fermentación” se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentativos, en particular, la levadura. Los estimuladores de la fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido paraaminobenzoico, ácido fólico, riboflavina, y vitaminas A, B, C, D, y E. Véase, p. ej., Alfenore *et al.*, “Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisia* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process”, Springer-Verlag (2002), que se incorpora en la presente por referencia. Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden alimentar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, y Cu.

Ejemplos

Las formas de realización mostradas en los ejemplos 1, 4, 5, 7 y 9-14 no entran dentro del campo de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

La adición de una esterasa, en particular, una lipasa, fue evaluada bajo condiciones de fermentación anaeróbica análogas durante un proceso de fermentación de etanol. El experimento fue realizado en maíz amarillo seco molido según un protocolo de licuefacción-sacarificación-fermentación (LSF) simultáneo. El experimento se efectuó usando glucoamilasa (Spirizyme Plus, disponible por Novozymes A/S) en una cantidad de 0,0 (control); 0,8, 1,0, y 1,2 GAU/g DS y una alfa amilasa fúngica (SP288, disponible por Novozymes A/S) en una cantidad de 1,6 AFAU/g DS. Las fermentaciones fueron comparadas con una fermentación con lipasa (lipasa de *Candida antarctica*, añadida en una cantidad de 277 L/U g DS) en combinación con 1,0 GAU de glucoamilasa (Spirizyme Plus) y 1,6 AFAU/g DS de una alfa amilasa fúngica (SP288). Todas las fermentaciones fueron realizadas a pH=5.0: 32°C durante 72 horas. El proceso fue vigilado con tiempo y analizado por la pérdida de peso del CO₂, el porcentaje del etanol producido y la conversión teórica del almidón.

La Tabla 1 ilustra la diferencia entre la fermentación con y sin lipasa. La adición de lipasa resultó en el 20% de rendimiento de etanol en 72 hrs a 32°C con un aumento del índice, que fue mejor que el tratamiento sin lipasa a cualquiera de las concentraciones de glucoamilasa empleadas.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1

GAU	Tiempo de fermentación, h									
	6	24	30	48			54	72		
	CO ₂ , g	CO ₂ , g	CO ₂ , g	CO ₂ , g	Etanol calculado, % v/v	Eficiencia, %	CO ₂ , g	Etanol calculado, % v/v	Etanol HPLC, % v/v	Eficiencia, %
0,0	0,30	2,65	2,95	3,48	2,2	12,7	3,60	2,5	3,8	14,32
0,8	0,69	16,49	20,33	27,30	17,3	100,0	28,58	19,6	20,0	92,75
1,0	0,74	17,04	20,99	27,78	17,5	101,7	28,98	19,7	19,9	92,71
1,0 & lipasa	0,94	18,94	22,38	28,75	17,8	105,3	29,93	20,0	20,2	96,50
1,2	0,74	17,80	21,52	28,04	17,7	102,7	29,15	19,7	19,9	92,35

ES 2 297 269 T3

Ejemplo 2

El Ejemplo 2 fue realizado en maíz amarillo seco molido conforme a un protocolo de licuefacción-sacarificación-fermentación (LSF) simultáneo. El experimento se efectuó usando una glucoamilasa (Spirizyme Plus, disponible por Novozymes A/S) en una cantidad de 0,8 GAU/g DS y una alfa amilasa fúngica (SP288, disponible por Novozymes A/S) en una cantidad de 2,6 AFAU/g DS para fermentar etanol junto con la adición de:

(A) lipasa (LIPOLASE, disponible por Novozymes A/S)

(B) lipasa de *Candida antarctica*

(C) cutinasa (JC 492, disponible por Novozymes A/S)

(D) fosfolipasa (LECITASE disponible por Novozymes A/S)

(E) lipasa inactivada de *Candida antarctica* (inactivada por ebullición durante tres horas), y

(F) un control (glucoamilasa y amilasa sin adición de esterasa).

Las esterasas fueron añadidas en una cantidad correspondiente a 200 U/g DS. Las fermentaciones fueron realizadas a pH=5.0; 32°C durante varias horas. El proceso fue vigilado con tiempo y analizado por la pérdida de peso del CO₂, porcentaje de etanol producido y conversión teórica del almidón.

Como se muestra en la Tabla 2, un aumento en el índice y rendimiento de etanol fue observado (junto con un aumento correspondiente en ácidos grasos) para todas las esterasas activas evaluadas. La eficiencia fue definida como una cantidad de etanol producida por unidad de sólidos. Los mejores resultados fueron observados para la lipasa de *Candida antarctica*.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 2

Lipasa	Tiempo de fermentación, h					
	24			48		72
	Etanol calculado, % v/v	Eficiencia, %	Etanol calculado, % v/v	Eficiencia, %	Etanol HPLC, % v/v	Eficiencia, %
Control	11,47 ± 0,05	52,19 ± 0,27	16,89 ± 0,12	81,91 ± 0,70	19,48 ± 0,04	89,37 ± 0,22
Lipolasa	11,64 ± 0,21	53,07 ± 1,09	17,29 ± 0,31	84,26 ± 1,83	19,77 ± 0,12	91,04 ± 0,69
Cutinasa	11,96 ± 0,09	55,20 ± 0,49	17,31 ± 0,07	85,19 ± 0,38	19,62 ± 0,08	91,18 ± 0,16
Lecitasa	11,59 ± 0,04	53,50 ± 0,19	17,12 ± 0,08	84,35 ± 0,50	19,59 ± 0,08	91,19 ± 0,47
Lipasa inactiva de <i>Candida antarctica</i>	11,43 ± 0,08	52,88 ± 0,40	16,88 ± 0,15	83,18 ± 0,89	19,49 ± 0,04	90,89 ± 0,25
Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	12,25 ± 0,17	57,56 ± 1,14	17,97 ± 0,18	89,75 ± 1,08	20,34 ± 0,05	95,87 ± 0,30

Ejemplo 3

El Ejemplo 3 se efectuó de la misma manera que el Ejemplo 2 excepto que la lipasa de *Candida antarctica* fue sólo parcialmente inactivada (por ebullición durante 10 minutos). Como se muestra en Tabla 3, a pesar de la inactivación sólo parcial, la lipasa de *Candida antarctica* siguió obteniendo una mejora significativa.

Tabla 3

Lipasa	Tiempo de fermentación, h					
	24			48		72
	Etanol calculado, % v/v	Eficiencia, %	Etanol calculado, % v/v	Eficiencia, %	Etanol HPLC, % v/v	Eficiencia, %
Control	11,88 ± 0,10	53,46 ± 1,57	17,21 ± 0,12	83,63 ± 0,71	19,38 ± 0,13	88,62 ± 0,75
Lipolasa	12,11 ± 0,07	55,44 ± 0,34	17,65 ± 0,11	86,20 ± 0,58	19,86 ± 0,12	91,04 ± 0,59
Cutinasa	12,39 ± 0,07	57,39 ± 0,35	17,77 ± 0,18	87,59 ± 0,59	19,94 ± 0,10	92,54 ± 0,70
Lecitasa	12,02 ± 0,15	55,65 ± 0,79	17,32 ± 0,13	85,58 ± 0,70	19,63 ± 0,08	91,32 ± 0,42
Lipasa de <i>Candida antarctica</i> hervida brevemente	12,01 ± 0,06	55,83 ± 0,34	17,68 ± 0,17	87,83 ± 1,01	20,10 ± 0,07	94,43 ± 0,37
Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	12,26 ± 0,11	57,48 ± 0,85	17,77 ± 0,16	88,74 ± 0,67	20,25 ± 0,07	95,10 ± 0,40

Ejemplo 4

El Ejemplo 4 fue realizado en maíz seco molido conforme a un protocolo de licuefacción-sacarificación-fermentación (LSF) simultáneo. El experimento se efectuó en maíz amarillo molido usando una glucoamilasa y alfa amilasa para fermentar etanol con y sin lipasa, como se describe en los Ejemplos 2 y 3. Las fermentaciones fueron realizadas a pH=5.0: 32°C durante varias horas. Además de la lipasa de *Candida antarctica* y la lipasa de *Candida antarctica* inactivada, sulfato férrico y las lipasas purificadas de lipasa de *Candida cylindracea* y lipasa A de *Candida antarctica*, fueron también comparadas. Se utilizó cuatro veces menos de lipasa purificada.

Como se muestra en la Tabla 4, se observaron mejoras significantes en el rendimiento de etanol a 48 horas para todas las lipasas, y en particular, las dos lipasas purificadas (lipasa de *Candida cylindracea* y lipasa A de *Candida antarctica*). La lipasa A de *Candida antarctica* dio el mejor resultado, mostrando una eficiencia del 94,9% y un rendimiento del 18% a 48 horas. La lipasa de *Candida cylindracea* mostró una eficiencia del 89,2% y un rendimiento del 17,8% a 48 horas. La lipasa de *Candida antarctica* mostró una eficiencia del 89% y un rendimiento del 17,6% a 48 horas. Las lipasas purificadas tuvieron el mejor rendimiento aunque se utilizó cuatro veces menos de enzimas purificadas.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 4

Aditivo	Tiempo de fermentación, h					
	24			48		72
	Etanol calculado, % v/v	Eficiencia, %	Etanol calculado, % v/v	Etanol calculado, % v/v	Eficiencia, %	Etanol calculado, % v/v
Control	11,49 ± 0,15	52,33 ± 0,78	16,92 ± 0,23	16,92 ± 0,23	82,05 ± 1,35	18,20 ± 0,26
Lipasa inactiva de <i>Candida antarctica</i>	10,59 ± 0,16	49,33 ± 0,85	16,91 ± 0,30	16,91 ± 0,30	84,73 ± 1,77	18,65 ± 0,40
Lipasa de <i>Candida antarctica</i> 400 LU/g DS	11,29 ± 0,24	51,87 ± 1,87	17,73 ± 0,37	17,73 ± 0,37	89,03 ± 2,45	19,36 ± 0,59
Fe ₂ (SO ₄) ₃	11,58 ± 0,13	52,79 ± 0,67	16,87 ± 0,43	16,87 ± 0,43	81,84 ± 2,57	18,82 ± 0,91
Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> , 100 LU/g DS	11,46 ± 0,10	53,54 ± 0,10	17,75 ± 0,24	17,75 ± 0,24	89,24 ± 3,19	19,06 ± 0,32
Lipasa A de <i>Candida antarctica</i> , 100 LU/g DS	11,58 ± 0,15	56,69 ± 0,15	17,98 ± 0,34	17,98 ± 0,34	94,88 ± 2,16	19,83 ± 0,51

Ejemplo 5

El Ejemplo 5 fue realizado en maíz seco molido según un protocolo de licuefacción-sacarificación-fermentación (LSF) simultáneo. El experimento se efectuó en maíz amarillo molido usando una glucoamilasa y alfa amilasa para fermentar etanol con y sin estimuladores del crecimiento. Las fermentaciones fueron realizadas a pH=5.0: 32°C durante varias horas. Vitaminas y minerales fueron añadidos como sigue:

A: Centrum (una multivitamina);

B: vitamina E, Mg, Zn y Cr;

C: vitaminas A, C, D, E, y tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido fólico, B-12, ácido panténico;

D: glucosamina y vitamina C;

E: control, ninguna adición.

La Tabla 5 ilustra que a 48 horas, una mejora adicional puede ser obtenida con vitamina y adiciones minerales.

TABLA 5

Vitamina	Tiempo de fermentación, h	
	48	72
	Etanol calculado, % v/v	Etanol HPLC, % v/v
Control	16,54 ± 0,23	19,63 ± 0,06
A	16,65 ± 0,18	19,34 ± 0,19
B	16,77 ± 0,07	19,28 ± 0,04
C	16,94 ± 0,11	19,33 ± 0,05
D	16,81 ± 0,14	19,29 ± 0,02

Ejemplo 6

En los Ejemplos 6-13, un fermentador desechable de 25 ml fue diseñado para el experimento. El fermentador estaba compuesto de un tubo de polipropileno de 50 ml disponible por Becton Dickinson Labware, EEUU. El cierre de la fermentación estaba compuesto de una pipeta de transferencia de polietileno desechable disponible por Fisher Scientific EEUU fijada a una jeringa de 5-ml. La jeringa estaba equipada con un filtro de jeringa Whatman PVDF de 0,45 µm disponible por Fisher Scientific, EEUU.

Con el fermentador desechable de 25 ml fue posible ejecutar muchas muestras en el mismo baño maría para eliminar el error experimental común provocado por la fluctuación de la temperatura del agua. No se requirió ninguna transferencia de muestra después de la finalización de la fermentación. Las muestras para ser analizadas fueron también pudieron ser centrifugadas en los mismos tubos lo que redujo sustancialmente el tiempo de análisis.

Levadura (levadura roja de etanol, 36% DS) fue propagada con maltodextrina aeróbicamente a 500 rpm y 32,2°C durante 16 h. Una pasta de maíz fue preparada mediante la mezcla maíz molido (pantalla de 2-mm) y agua seguido del ajuste de pH con ácido inorgánico.

Amilasa (1,1 AFAU/g DS sp 288), glucoamilasa (1,5 GAU/g DS Spirizyme Plus), y levadura fueron introducidas en la pasta inmediatamente antes de rellenar los fermentadores con el medio resultante.

Las enzimas esterasa siguientes fueron añadidas en una cantidad correspondiente a 200 U/g DS antes de rellenar los fermentadores:

A) lipolasa 100T (lipasa disponible por Novozymes),

B) Lipasa B de *Candida antarctica* (CALB),

ES 2 297 269 T3

C) Lecitasa 10 L (fosfolipasa, disponible por Novozymes)

D) JC 492 (cutinasa, disponible por Novozymes A/S)

5 La fermentación fue realizada en fermentadores de 25 ml a 32,2°C sin mezclar durante 72 h. La pérdida de peso del CO₂ fue tomada en 24, 48, y 72 h. Cuando la fermentación fue completada, las muestras fueron centrifugadas a 3,000 rpm a 20°C durante 15 min, forzadas a través del filtro de 0,45 µm y aproximadamente una fracción de cerveza de 2 ml fue retirada y analizada por HPLC.

10 Un control fue realizado según el modo descrito anteriormente, sin adición de una esterasa.

Como se muestra en la Tabla 6, todas las esterases evaluadas incrementaron de forma significativa el rendimiento de etanol. Los datos a las 24 h y 48 h fueron calculados en base a la pérdida de peso del CO₂ y los datos a las 72 h fueron obtenidos por HPLC.

15 La eficiencia del proceso fue también significativamente aumentado por el tratamiento de la esterasa purificada y, en particular, alcanzó el 95,1% en el caso de la lipasa B de *Candida antarctica*, como se muestra en la Tabla 7, abajo.

TABLA 6

Esterasa	Tiempo de fermentación, h		
	24	48	72
	Etanol calculado, % v/v	Etanol calculado, % v/v	Etanol HPLC, % v/v
Control	11,88 ± 0,10	17,21 ± 0,12	19,38 ± 0,13
Lecitasa 10L	12,02 ± 0,15	17,32 ± 0,13	19,63 ± 0,08
Lipolasa 100T	12,11 ± 0,07	17,65 ± 0,11	19,86 ± 0,12
Cutinasa JC 492	12,39 ± 0,07	17,77 ± 0,18	19,94 ± 0,10
CALB	12,26 ± 0,11	17,77 ± 0,16	20,25 ± 0,07

TABLA 7

Esterasa	Eficiencia, %	CL, %
Control	88,62	0,75
Cutinasa	92,54	0,70
Fosfolipasa	91,32	0,42
Lipolasa	91,64	0,59
CALB	95,10	0,40

Ejemplo 7

60 El Ejemplo 7 se efectuó usando levadura Alltech SuperStart, 36% DS, 1 GAU/g DS Spirizyme Fuel, 0,8 AFAU/g DS SP 288. La levadura se propagó con maltodextrina. Se hizo una comparación entre la lipasa A de *Candida antarctica*, añadida a 0,8 LU/g DS, 4 LU/g DS y 20 LU/g DS y la proteasa (GC 106, disponible por Genencor) añadida a 0,007% y 0,014%. Se realizó la fermentación en fermentadores de 25 ml a 32,2°C sin mezcla durante 72 h.

65 Como se muestra en la Tabla 8, tanto la lipasa como la proteasa tienen un efecto en el rendimiento de etanol. No obstante, el efecto de la lipasa usada a 0,8 LU/g DS, 4 LU/g DS y 20 LU/g DS fue significativamente superior al efecto de la proteasa sola usada a 0,007% DS y 0,014% DS.

TABLA 8

Tratamiento	Etanol HPLC, % v/v
Control	12,66 ± 0,27
Lipasa, 0,8 LU/g DS	14,64 ± 0,21
Lipasa, 4 LU/g DS	14,66 ± 0,07
Lipasa, 20 LU/g DS	13,81 ± 0,21
Lipasa, 100 LU/g DS	11,00 ± 0,18
Proteasa, 0,007% DS	12,61 ± 0,12
Proteasa, 0,014% DS	13,50 ± 0,17

Ejemplo 8

Este experimento se efectuó usando las mismas condiciones experimentales y concentraciones enzimáticas descritas en el Ejemplo 6, con la excepción de que la proteasa (Novozyme 50006, 0,007% DS) fue también añadida al medio de fermentación con un volumen de muestra aumentado.

Para eliminar la posibilidad de que una sustancia en la formulación de CALB estuviera contribuyendo al efecto obtenido, se usó también CALB inactivada. Un control fue preparado inactivando CALB por ebullición durante 3 horas. Al terminar la ebullición, el volumen fue ajustado al valor inicial con agua DI, y la muestra fue centrifugada a 3,000 rpm durante 20 min. La capa de líquido fue forzada a través del filtro de 0,45 µm. La enzima fue de ese modo completamente inactivada.

Los datos experimentales están mostrados en la Tabla 9, abajo. El valor para la eficiencia estaba comprendido entre el 91,04% y el 95,87%, con la lipasa CALB mostrando los mejores resultados. No hubo una diferencia significativa entre el rendimiento de etanol de las muestras de control y el rendimiento de etanol de las muestras tratadas con CALB inactivada (los resultados no están mostrados).

Ejemplo 9

El Ejemplo 9 se efectuó usando las mismas condiciones experimentales descritas en el Ejemplo 7, excepto la proteasa (Novozyme 50006, 0,007% DS) fue añadida en el producto propagado.

En este experimento, la lipasa purificada de *Candida cylindracea* y la lipasa A purificada de *Candida antarctica* (CALA) fueron añadidas en cantidades de 100 LU/g DS y la lipasa B purificada de *Candida antarctica* (CALB) fue añadida en una cantidad de 400 LU/g DS. Como se muestra en tabla 9, estas lipasas también tienen un efecto sustancial tanto en el rendimiento de etanol como en la eficiencia.

Ejemplo 10

En este ejemplo, lipolasa 100 T y lipolasa purificada (ambas disponibles de Novozymes A/S) fueron comparadas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: Levadura roja de etanol, 36% DS, 1,5 GAU/g DS Spirizyme Fuel, 0,8 AFAU/g DS SP 288. La levadura se propagó con maltodextrina y proteasa. La fermentación se efectuó en fermentadores de 25 ml a 32,2°C sin mezclar durante 72 h. Se ejecutó un control como se describe, sin la adición de lipasa.

Como se muestra en tabla 9, esta esterasa también tuvo un efecto sustancial en la producción de etanol.

Ejemplo 11

Una lipasa ácida (Amano G, disponible por Amano Enzyme, EEUU) y la lipasa purificada de *C. cylindracea* fueron comparadas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: Levadura roja de etanol, 36% DS, 2,0 GAU/g DS Spirizyme Fuel 0,8 AFAU/g DS SP 288. La levadura se propagó con maltodextrina y proteasa (Novozym 50006). La fermentación se efectuó en fermentadores de 25 ml a 32,2°C sin mezclar durante 72 h. En el medio de fermentación había un 0,08% de proteasa DS (Novozym 50006).

Como se muestra en la Tabla 9, la lipasa ácida y la lipasa purificada de *C. cylindracea* mostró una mejora sobre el control.

ES 2 297 269 T3

Ejemplo 12

En este experimento, una lipasa ácida (Amano G, disponible por Amano Enzyme, EEUU), una fosfolipasa purificada (Lecitase Ultra, disponible por Novozymes) y una lipasa purificada (Lipex, disponible por Novozymes) fueron comparadas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: Levadura roja de etanol, 36% DS, 2,0 GAU/g DS Spirizyme Fuel, 0,8 AFAU/g DS SP 288. La levadura se propagó con maltodextrina y proteasa Novozym 50006. La fermentación se efectuó en fermentadores de 25 ml a 32,2°C sin mezclar durante 72 h. Se añadió 0,02% DS Novozym 50006 al medio de fermentación.

Como se muestra en la Tabla 9, estas esterasas también resultaron en una mejora sobre el control.

Ejemplo 13

Una fermentación de 64 horas con Amano G ácido (disponible por Amano Enzyme, EEUU), la fosfolipasa purificada (Lecitase Ultra, disponible por Novozymes) y la lipasa purificada (Lipex disponible por Novozymes) y la lipasa (Lipolase 100T, disponible por Novozymes) fueron comparadas. La condición del experimento, fueron las siguientes: Levadura roja de etanol, 36% DS, 2,0 GAU/g DS Spirizyme Fuel 0,8 AFAU/g DS SP 288. La levadura se propagó con maltodextrina y Novozym 50006.

La fermentación se efectuó en fermentadores de 25 ml a 32,2°C sin mezclar durante 72 h. Se añadió el 0,02% DS Novozym 50006 al medio de fermentación. Como se muestra en la Tabla 9, estas esterasas también tienen un impacto significativo en el rendimiento de etanol.

TABLA 9

Efecto de las esterasas en el rendimiento y eficiencia de etanol

Enzima	Actividad, LU/g DS	Etanol, % v/v en cerveza	Cambio, % v/v vs. control	Eficiencia, %	Cambio, % v/v vs. control	n	Ejemplo
Lipasa ácida	1	21,12	+0,68	98,92	+3,85	11	Ejemplo 11
Lipasa ácida	1	20,92	+0,14	98,00	+0,83	12	Ejemplo 12
Lipasa ácida	5	21,00	+0,56	98,25	+3,18	11	Ejemplo 11
Lipasa ácida	10	21,16	+0,72	99,15	+4,08	12	Ejemplo 11
Lipasa ácida	10	20,98	+0,20	98,31	+1,14	11	Ejemplo 12
Lipasa ácida	10	19,99	+0,18	92,53	+0,90	11	Ejemplo 13

ES 2 297 269 T3

5	Lipasa acídica	100	21,34	+0,90	100,53	+5,46	9	Ejemplo 11
	Lipasa acídica	100	20,99	+0,21	98,42	+1,25	12	Ejemplo 12
10	CALA (purificada)	100	19,83	+1,63	98,16	+8,49	11	Ejemplo 9
15	C. <i>cylindracea</i> (purificada)	1	20,85	+0,41	97,36	+2,29	12	Ejemplo 11
20	C. <i>cylindracea</i> (purificada)	10	20,60	+0,16	95,96	+0,89	12	Ejemplo 11
25	C. <i>cylindracea</i> (purificada)	100	19,06	+0,86	98,17	+8,50	11	Ejemplo 9
30	Cutinasa JC 492	200	19,94	+0,56	92,54	+3,92	12	Ejemplo 6
35	Cutinasa JC 492	200	19,62	+0,14	91,18	+1,81	14	Ejemplo 8
40	Lecitasa 10 L	200	19,63	+0,25	91,32	+2,70	12	Ejemplo 6
45	Lecitasa 10 L	200	19,59	+0,11	91,19	+1,82	12	Ejemplo 8
50	Lecitase Ultra (purificada)	1	21,05	+0,27	98,74	+1,57	12	Ejemplo 12
55	Lecitase Ultra (purificada)	1	20,33	+0,52	94,50	+2,87	11	Ejemplo 13
60	Lecitase Ultra (purificada)	10	21,28	+0,50	100,14	+2,97	11	Ejemplo 12
65	Lecitase	10	19,89	+0,08	91,98	+0,35	12	Ejemplo

ES 2 297 269 T3

	Ultra (purificada)						13
5	Lipex (purificada)	1	21,30	+0,52	100,22	+3,03	12 Ejemplo 12
10	Lipex (purificada)	10	21,08	+0,30	98,95	+1,78	12 Ejemplo 12
15	Lipex (purificada)	10	20,07	+0,26	92,99	+1,36	10 Ejemplo 13
20	Lipolasa (purificada)	1	18,41	+0,31	84,00	+1,00	12 Ejemplo 10
25	Lipolasa (purificada)	10	18,62	+0,52	83,49	+0,49	8 Ejemplo 10
30	Lipolasa (purificada)	100	18,24	+0,14	83,57	+0,57	10 Ejemplo 10
35	Lipolasa 100 T	1	18,33	+0,23	84,87	+1,87	9 Ejemplo 10
40	Lipolasa 100 T	5	18,41	+0,31	83,84	+1,63	9 Ejemplo 10
45	Lipolasa 100 T	10	17,99	-0,11	81,35	-1,65	11 Ejemplo 10
50	Lipolasa 100 T	10	19,89	+0,08	91,93	+0,30	11 Ejemplo 13
55	Lipolasa 100 T	100	18,50	+0,40	84,02	+1,02	9 Ejemplo 10
60	Lipolasa 100 T	200	19,86	+0,48	91,64	+3,02	12 Ejemplo 6
65	Lipolasa 100 T	200	19,77	+0,29	91,04	+1,67	10 Ejemplo 8
	CALB	200	20,25	+0,87	95,10	+6,48	12 Ejemplo 6
	CALB	200	20,34	+0,86	95,87	+6,50	11 Ejemplo 8
	CALB	400	19,36	+1,16	99,19	+9,52	9 Ejemplo

							9
5	CALA	0,8	14,64	+1,98	64,00	+8,34	12 Ejemplo 7
10	CALA	4	14,66	+2,00	64,04	+8,40	12 Ejemplo 7
15	CALA	20	13,81	+1,15	59,80	+4,14	12 Ejemplo 7

Ejemplo 14

La adición de una lacasa fue evaluada bajo condiciones de fermentación anaeróbica análogas a los experimentos fermentativos del etanol. El experimento fue conducido en maíz amarillo seco molido según un protocolo de licuefacción-sacarificación-fermentación (LSF) simultáneo. El experimento se efectuó usando una glucoamilasa (Spirizyme Plus, disponible por Novozymes A1S) para fermentar etanol, con y sin lacasa. Se realizaron fermentaciones a pH=5.0: 32°C durante varias horas. El proceso fue vigilado con tiempo y analizado por la pérdida de peso del CO₂, el porcentaje de etanol producido y la conversión teórica del almidón. Como se muestra en Tabla 10, la adición de lacasa también mejoró el rendimiento de etanol.

TABLA 10

Tratamiento	Etanol HPLC, % v/v					
	7 h	23 h	29 h	47 h	55 h	119 h
0,7 GAU/g DS	2,36	9,29	10,55	12,38	13,13	16,73
0,7 GAU/g DS & 0,1 M NaCl	1,88	7,91	8,78	10,30	10,94	14,61
0,9 GAU/g DS	2,24	9,63	10,92	12,92	13,66	18,05
0,9 GAU/g DS & NZ 525, 0,5% DS	2,42	9,44	10,58	12,63	13,39	18,28
1,0 GAU/g DS	2,07	9,29	10,21	12,27	13,06	17,83
1,0 GAU/g DS & laccase, 0,2% DS	2,89	10,87	11,99	13,82	14,41	18,86

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido elaborada únicamente para la conveniencia lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido bastante cuidado al redactar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP renuncia a toda responsabilidad en este sentido.

Patentes citadas en la descripción

- WO 9949011 A [0002]
- JP 62055069 B [0002]
- JP 5789638 B [0002]
- US 5208054 A [0002]

ES 2 297 269 T3

- WO 9613580 A [0020]
- WO 0162947 A [0033]
- 5 • WO 9805785 A [0035]
- WO 9820139 A [0035]
- WO 9806856 A [0035]
- 10 • WO 9733976 A [0035]
- WO 9748812 A [0035]
- 15 • AU 2484095 A [0036]
- EP 684313 A [0037]
- EP 0420358 A [0037]
- 20 • EP 0684313 A [0037]
- WO 9828408 A [0037]
- 25 • WO 9828409 A [0037]
- JP 7067635 A [0037]
- WO 9844125 A [0037]
- 30 • WO 9738096 A [0037]
- WO 9813480 A [0037]
- 35 • EP 897010 A [0038]
- EP 897985 A [0038]
- WO 9949022 A [0038]
- 40 • WO 9948330 A [0038]
- WO 9502044 A [0042]
- 45 • US 4598048 A [0046]
- US 4604355 A [0046]
- US 6162628 A [0046]
- 50 • US 5688684 A [0048]
- WO 9526397 A [0053]
- 55 • WO 9623874 A [0053]
- WO 9741213 A [0053]
- WO 9919467 A [0053]
- 60 • WO 9200381 A [0059]
- WO 0004136 A [0059]
- 65 • WO 8402921 A [0059]
- WO 9928448 A [0060]

• US RE32153 E [0060]

• US 4587215 A [0060]

5 • EP 135138 A [0060]

• WO 8601831 A [0060]

• US 4106991 A [0080]

10

• US 4661452 A [0080]

• EP 238216 A [0080]

15 **Documentos distintos de las patentes citados en la descripción**

• Enzyme Nomenclature Academic Press 1992. [0014]

• *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 223, 1-5 [0014]

20

• *Eur. J. Biochem.*, 1995, vol. 232, 1-6 [0014]

• *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 237, 1-5 [0014]

25

• *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 250, 1-6 [0014]

• *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 264, 610-650 [0014]

• THOMLINSON *et al. Biochemistry*, 1962, vol. 1, 166-171 [0035]

30

• BARRIENTOS *et al. Plant. Physiol.*, 1994, vol. 106, 1489-1495 [0035]

• PAVER JAGANNATHAN *Journal of Bacteriology*, 1982, vol. 151, 1102-1108 [0035]

35

• COSGROVE *Australian Journal of Biological Sciences*, 1970, vol. 23, 1207-1220 [0035]

• GREINER *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1993, vol. 303, 107-113 [0035]

• NAYINI *et al. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1984, vol. 17, 24-26 [0036]

40

• WODZINSKI *et al. Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 42, 263-303 [0036]

• YAMADA *et al. Agric. Biol. Chem.*, 1986, vol. 322, 1275-1282 [0037]

45

• PIDDINGTON *et al. Gene*, 1993, vol. 133, 55-62 [0037]

• KOAZE *et al. Agr. Biol. Chem. Japan*, 1964, vol. 28, 216- [0042]

• YOSHIDA *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1954, vol. 28, 66- [0042]

50

• HAYASHIDA *et al. Agric. Biol. Chem.*, 1977, vol. 42, no. 5. 927-933 [0042]

• Handbook of Proteolytic Enzymes Academic Press 1998. [0044]

55

• R.M. BERKA *et al. Gene*, 1990, vol. 96, 313- [0044]

• R.M. BERKA *et al. Gene*, 1993, vol. 125, 195-198 [0044]

• GOMI *et al. Biosci. Biotech. Biochem.*, 1993, vol. 57, 1095-1100 [0044]

60

• W.M. FOGARTY C.T. KELLY *Progress in Industrial Microbiology*, 1979, vol. 15, 112-115 [0048]

• TSUKAMOTO *et al. Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, vol. 151, 25-31 [0053]

65

• BOEL *et al. EMBO J.*, 1984, vol. 3, no. 5. 1097-1102 [0059]

• *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol. 55, no. 4. 941-949 [0059]

ES 2 297 269 T3

• **CHEN** *et al.* *Prot. Engng*, 1996, vol. 9, 499-505 [0060]

• **CHEN** *et al.* *Prot. Engng*, 1995, vol. 8, 575-582 [0060]

5 • **CHEN** *et al.* *Biochem. J.*, 1994, vol. 301, 275-281 [0060]

• **FIEROBE** *et al.* *Biochemistry*, 1996, vol. 35, 8698-8704 [0060]

• **LI** *et al.* *Protein Engng*, 1997, vol. 10, 1199-1204 [0060]

10 • **GORINSTEIN**. S LII. C Starch/Stärke, 1992, vol. 44, no. 12. 461-466 [0067]

• The alcohol Textbook Nottingham University Press 1999. [0076]

15 • **ALFENORE** *et al.* Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisia* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process *Springer-Verlag* 2002. [0082]

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de un producto de fermentación, dicho método comprendiendo una fase de fermentación, comprendiendo la puesta en contacto de un microorganismo fermentativo o medios fermentativos usados en la fase de fermentación con al menos una enzima esterasa, donde dicha al menos una esterasa comprende una cutinasa.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, comprendiendo además una lipasa, una fosfolipasa o combinaciones de las mismas.
3. Método según cualquiera de reivindicaciones 1 o 2, donde dicho microorganismo es una levadura.
4. Método según cualquiera de reivindicaciones 1 a 3, donde dicho producto de fermentación es el etanol.
- 15 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicha fase de fermentación es parte de un proceso de sacarificación y de fermentación simultáneo.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha fase de fermentación es parte de un proceso de hidrólisis de almidón crudo.
- 20 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la fase de fermentación se realiza en presencia de una glucoamilasa y de una amilasa.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la fase de fermentación es parte de un proceso de molienda en seco o un proceso de molienda húmeda.
- 25 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la materia prima para el proceso de trituración es una materia prima que contiene almidón.
- 30 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la materia prima para el proceso de molienda es seleccionada del grupo que consiste en maíz, trigo, cebada, o milo.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los medios de fermentación comprenden grano de cereal desgerminado.
- 35 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde los medios de fermentación comprenden maíz desgerminado.
- 40 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo además la puesta en contacto de un microorganismo fermentativo o medios fermentativos con unas enzimas seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, fitasas, y celulasas.
14. Método para la producción de etanol, comprendiendo
- 45 (a) molienda de granos enteros;
- (b) liquefacción del producto de fase (a);
- (c) sacarificación de la materia licuada;
- 50 (d) fermentación de la materia sacarificada usando un microorganismo, donde el proceso de fermentación además comprende la puesta en contacto del microorganismo fermentativo o medios conteniendo el microorganismo fermentativo con al menos una enzima esterasa, donde dicha al menos una esterasa comprende una cutinasa.
- 55 15. Método según la reivindicación 14, comprendiendo además la destilación de la materia fermentada.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, donde dicho método es un proceso de licuefacción y de sacarificación simultánea o un proceso de licuefacción, de sacarificación y de fermentación simultáneo.
- 60 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde dicho método comprende la adición de una alfa-amilasa, una glucoamilasa a unos medios de fermentación que comprenden un microorganismo fermentativo.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, comprendiendo además una lipasa, una fosfolipasa o combinaciones de las mismas.
- 65 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde dicho microorganismo es una levadura.