



SUPERINTENDENCIA



PATENTE DE INVENCION

10-48736

54. TÍTULO UN PROCESO PARA PRODUCIR UN PRODUCTO DE
FERMENTACIÓN.

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C12P 7/08

71. SOLICITANTE NOVOZYMES A/S Y NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.

DOMICILIO Bagsvaerd, Dinamarca y Franklinton, Carolina del Norte, Estados Unidos de América.

74. **APODERADO** DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

19-05-2010



No. 10-048736- -00000-0000

Fecha: 2010-04-26 15:54:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 87

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: NOVOZYMES A/S y
NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.
Dirección: Krogshoejvej 36, DK-2880, Bagsvaerd,
Dinamarca y 77 Perry Chapel Church Road, P.O.
Box 576, Franklinton, Carolina del Norte 27525,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad o domicilio: Bagsvaerd,
Dinamarca y Franklinton, Carolina del Norte,
Estados Unidos de América.
Lugar de Constitución:
Teléfono: **Fax:**
E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN
Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6
Teléfono: 6 181088 **Fax:** 6350824
E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882
TP 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER HOJA ANEXA
Dirección:
Nacionalidad o domicilio:

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/079490 Fecha 10 de octubre de 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/049136 A3 Fecha 16 de abril de 2009

6 **TÍTULO (54)**

~~UN PROCESO PARA PRODUCIR UN PRODUCTO DE FERMENTACIÓN:~~
PROCESO PARA PRODUCIR UN PRODUCTO DE FERMENTACIÓN A PARTIR
DE MELAZAS TRATADAS CON UNA COMBINACIÓN DE AIFA-ATILASA Y

7 **Clasificación Internacional (51)**

C12P 7/08

GLUCOAMILASA.

8 **Prioridad**

SI ☒ NO ☐

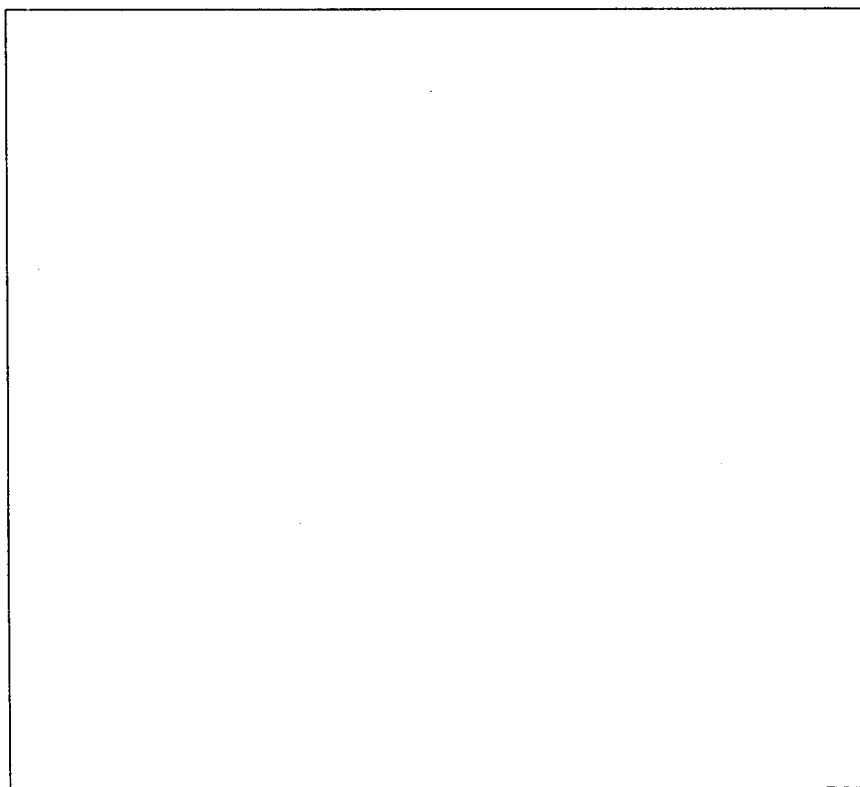
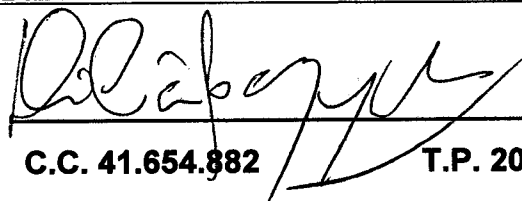
(33) País de Origen
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

(32) Fecha
12 de octubre de 2007

(31) Número de Solicitud
60/979,471

9 **Comprobante de pago No.** 10-24,818 // 10-25,070 // 10-11,106 **Fecha** 05/04/10 // 05/04/10 // 10/02/10

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros *Opinión escrita.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente****NOMBRE :** DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN**FIRMA:**

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **BORDIN, Eder, Manzini**
(Av. Dr. Eugenio Bertolli, 3192, Sta Felicidade, 82410-530 Curitiba PR, Brasil);
- 2.) **PEREIRA DE SOUZA, Viviane**
(Rue Prefeito Angelo Lopes 162, ap 605, 80050-330 Curitiba-Parana, Brasil);
- 3.) **ORMEROD, Fabiane, Bueno**
(Rua Ricardo Lemos, 304, apt 23- Ahu, 84540-030 Curitiba-PR, Brasil);
- 4.) **DE ALAMEIDA JR., Adauto**
(Rua Pasteur, 486 - ap 201, 80050-330 Curitiba-Parana, Brasil).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 24,818
FECHA : ABRIL 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-048736- -00000-0000

Fecha: 2010-04-26 15:54:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 87

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353190121	31/03/2010	84,780,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-02	PRORROGAS Y RENOVACIONES	819,000.00
		TOTAL :	\$ 819,000.00

SON: OCHOCIENTOS DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-2530 3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 25,070
FECHA : ABRIL 5 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-048736- -00000-0000

Fecha: 2010-04-26 15:54:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 87

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353190121	31/03/2010	84,780,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	20,000.00
		TOTAL :	\$ 20,000.00

SON: VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 11,106
FECHA : FEBRERO 10 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-048736-00000-0000

Fecha: 2010-04-26 15:54:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 87

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175684132	10/02/2010	68,215,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS
			1,000.00
		TOTAL :	\$ 1,000.00

SON: MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

5

RESUMEN

La invención se relaciona con un proceso para producir un
5 producto de fermentación de melaza en donde la melaza se i)
trata con una combinación de alfa-amilasa y glucoamilasa y
ii) fermenta utilizando uno o más organismos fermentadores a
un conteo celular en el rango de 10^7 - 10^{10} células/mL de medio
de fermentación.

UN PROCESO PARA PRODUCIR UN PRODUCTO DE FERMENTACIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona con procesos para producir un producto de fermentación, tal como etanol, de melaza.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

La producción comercial a gran escala de etanol combustible de melaza se conoce en la técnica. La melaza es un subproducto refinado de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera. La melaza es un jarabe dulce café oscuro
15 que contiene aproximadamente 50% de sacarosa. Cuando los jugos extraídos de la caña de azúcar o de la remolacha azucarera se evaporan la remoción del agua facilita la separación del azúcar en forma cristalina. Cuando este proceso de cristalización del azúcar ha alcanzado su límite,
20 se remueven los cristales de azúcar, y el jarabe espeso café oscuro restante se conoce como melaza.

La WO 96/13600 describe un método para producir monosacáridos fermentables de sacáridos no fermentables,
25 presentes en el almidón licuificado y/o sacarificado, melaza de la remolacha y melaza de la caña de azúcar, con el fin de mejorar la utilización en de la materia prima en los procesos

7

de fermentación tales como la producción fermentativa del etanol.

La US 4,769,324 se dirige a la producción de etanol
5 mediante la fermentación de melaza en la presencia de levadura que es capaz de hacer crecer y producir amilasa en un medio que contiene melaza.

La BR-PI-990252-8A describe un proceso para producir
10 etanol donde la levadura de fermentación se desflocula mediante la acción enzimática de proteasa o enzimas tales como glucanasas, celulasas, quitinasas, xilanasas, y laminarinasas ácidas o alcalinas.

15 Subsiste la necesidad de una mejora adicional de un proceso de elaboración de un producto de fermentación, tal como etanol.

RESUMEN DE LA INVENCION

20

La invención se relaciona con un proceso para producir productos de fermentación de melaza utilizando un organismo fermentador, en donde la melaza se

25 i) trata con una combinación de alfa-amilasa y glucoamilasa, y

- ii) fermenta utilizando uno o más organismos fermentadores a un conteo celular en el rango de 10^7 - 10^{11} células/mL de medio de fermentación.

De acuerdo con la invención la materia prima es melaza la cual es un subproducto de, por ejemplo, azúcar refinado de caña o de remolacha.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra el desarrollo de los °Bx durante la fermentación durante la fermentación de la melaza.

La Fig. 2 muestra el desarrollo del pH durante la fermentación de la melaza para dos mezclas de enzimas que contienen alfa-amilasa, glucoamilasa y proteasa agregadas durante la sacarificación y la fermentación simultánea.

La Fig. 3 muestra la línea de tendencia lineal de los °Bx para una mezcla de enzima que contiene alfa-amilasa, glucoamilasa y proteasa agregada durante la sacarificación y la fermentación simultánea.

La Fig. 4 muestra el desarrollo del pH durante la fermentación de la melaza para dos mezclas de enzima que contienen alfa-amilasa y glucoamilasa agregadas durante la sacarificación y la fermentación simultánea.

La Fig. 5 muestra el desarrollo de los °Bx durante la fermentación de la melaza para dos mezclas de enzima que contienen alfa-amilasa y glucoamilasa agregadas durante la sacarificación y la fermentación simultánea.

5

La Fig. 6 muestra la línea de tendencia lineal de los °Bx para dos mezclas de enzimas que contiene alfa-amilasa y glucoamilasa agregadas durante la sacarificación y la fermentación simultánea.

10

La Fig. 7 muestra la producción de etanol después de 30 horas de pre-tratamiento enzimático de melaza seguido por 6 horas de fermentación.

15

La Fig. 8 muestra la producción de etanol después de 30 horas de pre-tratamiento enzimático de melaza seguido por 10 horas de fermentación.

20

La Fig. 9 muestra la ganancia de productividad como el decaimiento en la reducción total de azúcar (TRS) después del pre-tratamiento enzimático seguido por 6 horas de fermentación.

25

La Fig. 10 muestra la ganancia de productividad como el decaimiento en la reducción total de azúcar (TRS) después del pre-tratamiento enzimático seguido por 10 horas de fermentación.

La Fig. 11 muestra la viscosidad durante la sacarificación y la fermentación simultánea con las mezclas de enzimas.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención suministra procesos para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, de melaza que utiliza un organismo de fermentación.

10

Los inventores han encontrado que cuando la melaza se somete a una combinación de alfa-amilasa y glucoamilasa se incrementa la productividad. Esto es ventajoso en razón a que el tiempo de fermentación se puede acortar. Sin estar limitados por ninguna teoría se cree que el tratamiento con la alfa-amilasa y la glucoamilasa da como resultado una reducción de la viscosidad y/o la densidad en el medio de fermentación. Esta vía de influjo de azúcares fermentables en el medio de fermentación sobre la membrana celular de los organismos de fermentación se facilita. Esto puede dar como resultado un incremento en la tasa de conversión del producto de azúcares a fermentación que conduce a un tiempo de fermentación acortado y así a una productividad mayor. Una alternativa o teoría adicional es que la concentración de la célula y/o la viabilidad de la célula se incrementan. Los inventores también encontraron que cuando se pre-trata melaza antes de llevar a cabo la fermentación se puede obtener una mejora en el rendimiento.

1/)

La invención se relaciona con procesos para producir productos de fermentación de melaza utilizando un organismo de fermentación, en donde la melaza se

5

i) trata con una combinación de alfa-amilasa y glucoamilasa, y

ii) fermenta utilizando uno o más organismos de fermentación en un conteo celular en el rango de

10

10^7 - 10^{11} células/mL de medio de fermentación.

En una realización preferida el conteo celular está en el rango de 10^8 - 10^{10} células/mL de medio de fermentación, especialmente alrededor de 10^9 células/mL de medio de fermentación.

15

La melaza concentrada tiene unos °Bx de alrededor de 80%. En el medio de fermentación la melaza se diluye en agua de tal manera que la melaza durante un proceso de la invención tiene unos °Bx en el rango de alrededor 1-35%, preferiblemente 16-25%, preferiblemente alrededor de 18-22%. En procesos de alta gravedad los °Bx están en el rango de 25-35, preferiblemente 27-32 °Br.

20

25

Brix (°Bx) es una medición de la proporción en masa de los sólidos disueltos (por ejemplo, sacarosa) en agua en un líquido (por ejemplo, agua). Se puede medir con equipo (por ejemplo, un sacarímetro) que mide la gravedad específica de

un líquido. Por ejemplo, una solución de 25 °Bx es 25% (p/p), con 25 gramos de sacarosa por 100 gramos de líquido, es decir, hay 25 gramos de sacarosa del azúcar y 75 gramos de agua en 100 gramos de solución.

5

El tratamiento de la enzima en la etapa i) y la fermentación en la etapa ii) se pueden llevar a cabo secuencial o simultáneamente. En una realización preferida, donde las etapas se llevan a cabo de manera secuencial, la etapa de tratamiento de enzima i) se lleva a cabo como una etapa de pre-tratamiento, preferiblemente en condiciones adecuadas para las enzimas. En una etapa de realización i) se lleva a cabo a una temperatura en el rango de 20-70°C, preferiblemente 40-60°C, preferiblemente 45-55°C. El pH durante el tratamiento está preferiblemente en el rango de 4-6. El pre-tratamiento en la etapa i) se puede llevar a cabo entre 1-10 días, seguido por la fermentación durante 1-80 horas, preferiblemente 1-70 horas o 1-15 horas, tal como 1-10 horas.

20

En una realización la melaza (°Br alrededor de 80%) se pretratan en un tanque para compensación a 40-60°C durante 1-10 días a un pH en el rango de 4-6. La melaza pre-tratada se fermenta posteriormente a unos °Br en el rango de 16-24%, pH 3-6 a una temperatura entre 30-36°C durante 1-18 horas o 1-15 horas.

25

Cuando el proceso de la invención se lleva a cabo como un proceso simultáneo de etapa i) y etapa ii) el rango de temperatura utilizado es adecuado, preferiblemente óptimo, para él o los organismos de fermentación. La temperatura depende de los organismos de fermentación en cuestión. En una realización preferida la temperatura descansa en el rango de 25-60°C. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la temperatura adecuada u óptima. El tiempo de proceso está en una realización en el rango de aproximadamente 1 a 96 horas, preferiblemente entre 5 y 72 horas.

En una realización la melaza (°Br 16-24%) se fermentan a una temperatura en el rango de 30-36°C, pH 3-6, durante 6-96 horas.

15

Si el proceso de la invención es un proceso de producción de etanol utilizando levadura, tal como una cepa de *Saccharomyces*, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, como el organismo de fermentación el proceso se puede llevar a cabo preferiblemente a una temperatura de 25-40°C, preferiblemente de 28-36°C, especialmente en el rango de 30-34°C, tal como alrededor de 32°C.

En una realización adicional una proteasa también está presente durante el proceso de la invención. En una realización la proteasa se agrega durante el tratamiento de la enzima en la etapa i) o durante el tratamiento y la fermentación simultánea de la enzima. La proteasa se puede

agregar con el fin de desflocular el organismo de fermentación, especialmente la levadura, durante la fermentación.

5 Fermentación

El término "organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo adecuado para uso en un proceso de fermentación deseado. Los organismos de fermentación adecuados son de acuerdo con la invención capaces de fermentar, es decir, convertir, preferiblemente azúcares DP₁₋₃, tales como especialmente glucosa, fructosa y maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, tal como etano. El organismo de fermentación se agrega típicamente a la masa.

Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fungosos, tales como levadura u hongos filamentosos. Preferiblemente la levadura incluye cepas de *Saccharomyces* spp., y en particular *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, RED STAR®/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, USA), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, USA) SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialities).

La levadura preferida para la producción de etanol incluye, por ejemplo, *Pichia* y *Saccharomyces*. La levadura preferida de acuerdo con la invención es de la especie *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o
5 levadura de panaderos.

Recuperación

El proceso de la invención puede comprender opcionalmente
10 recuperar el producto de fermentación, tal como etanol; de esta manera el producto de fermentación, por ejemplo, etanol, se puede separar del material fermentado y purificado. Luego de la fermentación, la masa se puede destilar para extraer, por ejemplo, etanol. El etanol con una pureza de hasta, por
15 ejemplo, aproximadamente 96 % en volumen de etanol se puede obtener mediante el proceso de la invención.

Así, en una realización, la fermentación en la etapa ii) y la etapa de destilación se pueden llevar a cabo de manera
20 simultánea y/o separadamente/secuencialmente; opcionalmente seguida por una o más etapas de proceso para un refinamiento adicional del producto de fermentación, por ejemplo, etanol.

ENZIMAS

25

Alfa-Amilasa

De acuerdo con la invención cualquier alfa-amilasa se puede utilizar en un proceso de la invención. Las alfa-amilasas preferidas son microbianas, tales como de origen bacteriano o fungoso. En una realización la alfa-amilasa preferida es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que cuando se utiliza en un proceso de la invención tiene una actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-Amilaza Bacteriana

En una realización la alfa-amilasa es de origen de *Bacillus*. Una alfa-amilasa de *Bacillus* se puede derivar preferiblemente de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otras cepas de *Bacillus* sp. Ejemplos específicos de las alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEQ ID NO:4 en la WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* SEQ ID NO:5 en la WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID NO:3 en la WO 99/19467 (todas las secuencias incorporadas aquí como referencia). En una realización de la invención la alfa-amilasa puede ser una enzima que tiene un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al

menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de cualquiera de las secuencias mostradas en las SEQ ID NOS:1, 2 o 3, respectivamente, en la WO 99/19467.

5

La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente aquella descrita en la WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355 (todos los documentos incorporados aquí mediante referencia). Las variantes de alfa-amilasa específicamente contempladas en las patentes US nos. 6,093,562, 6,297,038 o la patente US no. 6,187,576 (incorporadas aquí mediante referencia) e incluye variantes de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) que tienen una supresión de uno o dos amino ácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una supresión doble descrita en la WO 1996/023873 - ver por ejemplo, página 20, líneas 1-10 (incorporada aquí mediante referencia), corresponde preferiblemente a delta (181-182) comparado con la secuencia de amino ácido de alfa-amilasa BSG tipo silvestre establecida en la SEQ ID NO:3 descrita en la WO 99/19467 o la supresión de los amino ácidos R179 y G180 que utilizan la SEQ ID NO:3 en la WO 99/19467 para numeración (cuya referencia se incorpora aquí mediante referencia). Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una doble supresión que corresponde a delta (181-182) y comprende además una sustitución N193F (también

denominada I181* + G182* + N193F) comparada con la secuencia de amino ácido alfa-amilasa BSG tipo silvestre establecida en la SEQ ID NO:3 descrita en la WO 99/19467.

5 Alfa-Amilasa Híbrida Bacteriana

Las alfa-amilasas híbridas específicamente contempladas comprenden 445 residuos de amino ácido C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en la SEQ ID NO: 4 de la WO 99/19467) y los 37 residuos de amino ácido N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrado en la SEQ ID NO:5 de la WO 99/19467), con uno o más, especialmente todas, las siguientes sustituciones:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S

(utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en la SEQ ID NO:4 de la WO 99/19467). También se prefieren variantes que tienen uno o más de las siguientes mutaciones (o que les corresponden mutaciones en otras estructuras de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y+A181T+N190F+A209V y Q264S y/o la supresión de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente la supresión de E178 y G179 (utilizando la numeración de la SEQ ID NO:5 de la WO 99/19467).

La alfa-amilasa bacteriana se puede agregar en concentraciones bien conocidas en la técnica. Cuando se mide en unidades KNU (descritas adelante en la sección de

Materiales & Métodos) la actividad de la alfa-amilasa esta presente preferiblemente en el rango de 0.5-50 KNU/L de medio de fermentación, tal como 1-25 KNU/L de medio de fermentación, o más preferiblemente en una cantidad de 2-10
5 KNU/L de medio de fermentación.

Alfa-Amilasa Fúngica

Las alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas
10 derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tal como, de una cepa de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus kawachii*.

Las alfa-amilasas fúngicas ácidas preferidas incluyen
15 alfa-amilasas similares a fungamil que se derivan de la cepa de *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus oryzae*. De acuerdo con la presente invención, el término "alfa-amilasa similar a fungamil" indica una alfa-amilasa que exhibe una alta identidad, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al
20 menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, aún al menos 99% o aún 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de amino ácido mostrada en la SEQ ID NO:10 en la WO 96/23874.

25 Otras alfa-amilasas ácidas preferidas se derivan de la cepa de *Aspergillus niger*. En una realización preferida la alfa-amilasa fúngica ácida es una del *Aspergillus niger* descritas como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-

prot/TeEMBL bajo el número de acceso primario P56271 y se describió en la WO 89/01969 (Ejemplo 3). Una alfa-amilasa fúngica ácida comercialmente disponible derivada de *Aspergillus niger*, es la SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca). Otras alfa-amilasas tipo silvestre contempladas incluyen aquellas derivadas de las cepas de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178 incorporada mediante referencia) o *Meripilus giganteus*.

En una realización preferida la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y se describe por Kaneko et al. J. Fermet. Bioeng. 81:292-598(1996) "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como la EMBL:#AB008370.

La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima tipo Silvestre que comprende un dominio de unión de almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, ninguno-híbrido), o una variantes de éstos. En una realización la alfa-amilasa tipo silvestre se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-Amilasa Híbrida Fúngica

En una realización preferida la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de

21

alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen aquellas descritas en la WO 2005/003311 o en la Publicación de Patente U.S. no. 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente US no. 60/638,614 (Novozymes) que se incorpora aquí como referencia.

5 Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de unión de carbohidrato (CBM), tal como un dominio de unión de almidón, y opcional un ligador.

10 Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la Tabla 1 a 5 de los ejemplos en la solicitud de patente US no. 60/638,614, que incluye la variante Fungamilo con un dominio catalítico JA118 y *Athelia folfsii* SBD (SEQ ID NO:100 en la US
15 60/638,614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con ligador AMG de *Athelia folfsii* y *Rhizomucor pusillus* SBD (SEQ ID NO:101 en la US 60/638,614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un ligador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y la SBD (que se describió en la Tabla 5 como una combinación
20 de las secuencias de amino ácido SEQ ID NO:20 SEQ ID NO:72 y SEQ ID NO:96 en la solicitud US no. 11/316,535 y además como la SEQ ID NO:13 aquí) o como la V039 en la Tabla 5 en la WO 2006/069290, y la alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con un ligador de glucoamilasa de *Athelia folfsii* y SBD (SEQ ID
25 NO:102 en la US 60/638,614). Otras alfa-amilasas híbridas específicamente contempladas son cualquiera de aquellas listadas en las Tablas 3, 4, 5, y 6 en el Ejemplo 4 en la

solicitud US no. 11/316,535 y la WO 2006/069290 (incorporadas aquí mediante referencia).

Otros ejemplos específicos de las alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la Publicación de Patente U.S. no. 2005/0054071, que incluye aquellas descritas en la Tabla 3 en la página 15, tal como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con el ligador de *Aspergillus kawachii* y el dominio de unión de almidón.

10

También se contemplan las alfa-amilasas que exhiben una alta identidad con cualquiera de las alfa-amilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o aún 100% de identidad con las secuencias de enzima maduras.

Unas alfa-amilasas ácidas se pueden agregar en una cantidad de 0.1 a 250 FAU(F)/L de medio de fermentación, preferiblemente 1 a 100 FAU(F)/ L de medio de fermentación.

Productos de Alfa-Amilasa Comercial

Las composiciones comerciales preferidas que comprenden la alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ de DSM, BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, y SPEZYME™ DELTA AA (Genecor Int.), y la alfa-

amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

Glucoamilasa

5

La glucoamilasa utilizada de acuerdo con el proceso de la invención se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada de un microorganismo o de una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fungoso o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste de las glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular la glucoamilasa G1 o G2 de *Aspergillus niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3(5), p. 1097-1102), o variantes de éstas, tales como aquellas descritas en la WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en la WO 84/02921, la glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55(4), p. 941-949), o las variantes o fragmentos de éstas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con estabilidad térmica mejorada: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Eng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Eng. 8, 575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; and introduction of Pro residues in position A435 and S436 (Li et al. (1997), Protein Eng. 10, 1199-1204).

Otras glucoamilasas incluyen la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (ver la

patente US no. 4,727,026 y (Nagasaka, Y. et al. (1998)
"Purification and properties of the raw-starch-degrading
glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol
Biotechnol 50:323-330), las glucoamilasas de *Talaromyces*, en
5 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) o *Trametes cingulata* descrita en la WO 2006/069289
(la cual se incorpora aquí mediante referencia).

10

Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen
glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C.*
thermoamylolyticum (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum*
(WO 86/01831) (que se incorpora aquí mediante referencia).

15

También se contemplan glucoamilasas híbridas de acuerdo
con la invención. Ejemplos de glucoamilasas híbridas se
describen en la WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen
la glucoamilasa híbrida descrita en la Tabla 1 y 4 del
20 Ejemplo 1 (cuyos híbridos se incorporan aquí mediante
referencia).

Se contemplan también las glucoamilasas que exhiben una
alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas
25 anteriormente mencionadas, es decir, al menos 70%, al menos
75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%,
al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o aún
100% de identidad con las secuencias de enzima maduras.

Las composiciones comercialmente disponibles que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SANTM SUPER, SANTM EXTRA L, SPIRIZYMETM PLUS, SPIRIZYMETM FUEL, 5 SPIRIZYMETM B4U y AMGTM E (de Novozymes A/S); OPTIDEXTM 300 (de Genecor Int.); AMIGASETM y AMIGASETM PLUS (de DSM); G-ZYMETM G900, y G990 ZR (de Genencor Int.).

Las glucoamilasas se pueden agregar en una realización en 10 una cantidad de 1-5,000 AGU/L de medio de fermentación, preferiblemente 10-1,000 AGU/L de medio de fermentación.

Proteasas

15 La proteasa puede ser cualquier proteasa. En una realización preferida la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen fungoso o bacteriano. Una proteasa fúngica ácida se prefiere, pero también se pueden utilizar otras proteasas.

20

Utilizando proteasa en un proceso de la invención generalmente se reduce la floculación de las células de organismos de fermentación, especialmente células de levadura, y también resultan en un incremento en el nivel de 25 FAN (Nitrógeno Amino Libre) que conduce a un incremento en el metabolismo del organismo de fermentación.

Las proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngica y bacterianas. Las proteasas preferidas son las proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar las proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de un pH de 7.

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

También se contemplan proteasas neutras o alcalinas, tal como una proteasa derivada de una cepa de *Bacillus*. Una proteasa particular contemplada para la invención se deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia en el Swissprot como No. de Acceso P06832. También se contemplan las proteasas que tienen al menos 90% de identidad con la secuencia de amino ácido obtenible en el Swissprot como No. de Acceso P06832 tal como al menos 92%, al menos 95%, al

menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

Se contemplan además las proteasas que tienen al menos 90% de identidad con la secuencia de amino ácido descrita en la SEQ ID NO:1 en la WO 2003/048353 tal como 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

También se contemplan las proteasas similares a papaína tales como las proteasas dentro de la E.C. 3.4.22.* (cisteína proteasa), tal como la EC 3.4.22.2 (papaína), EC 3.4.22.6 (quimopapaína), EC 3.4.22.7 (asclepaina), EC 3.4.22.14 (actinidaina), EC 3.4.22.15 (catepsina L), EC 3.4.22.25 (gicil endopeptidasa) y EC 3.4.22.30 (caricaína).

En una realización la proteasa es una preparación de proteasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*. En otra realización la proteasa se deriva de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor mehei*. En otra realización contemplada la proteasa es una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, y una proteasa derivada de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor mehei*.

Las proteasas de ácido aspártico se describen en, por ejemplo, Hand-book of Proteolytic Enzymes, Editado por A.J.

Barrett, N.D. Rawlings y J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Capítulo 270). Ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluye, por ejemplo, aquellos descritas 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 se incorporan aquí como referencia.

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

La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0.001-1 AI/L de medio de fermentación, preferiblemente 0.005 a 0.5 AU/L de medio de fermentación, especialmente 0.05-0.1 AU/L de medio de fermentación.

La invención descrita y reivindicada aquí no se limita en alcance por las realizaciones específicas descritas aquí, en razón a que estas realizaciones pretenden ser ilustraciones de varios aspectos de la invención. Cualquier realización equivalente está destinada a estar dentro del alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí serán evidentes para aquellos expertos en la técnica de la descripción anterior. Tales modificaciones también pretenden caer dentro

del alcance de las reivindicaciones finales. En caso de conflicto, la presente descripción incluyendo las definiciones prevalecerán. Varias referencias se citan aquí, cuyas descripciones se incorporan mediante referencia en su totalidad. La presente invención se describe además en los siguientes ejemplos que no se deben considerar como limitantes del alcance de la invención.

MATERIALES & MÉTODOS

Enzimas:

Proteasa ALC: la proteasa alcalina tipo silvestre derivada de *Bacillus licheniformis* disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

Glucoamilasa SF: Glucoamilasa derivada de *Talaromyces emersonii* y descrita en la SEQ ID NO:7 en la WO 99/28448.

Glucoamilasa TC: Glucoamilasa derivada de *Trametes cingulata* descrita en la SEQ ID NO:2 en la WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

Alfa-amilasa SC: variante de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181*+G182*+N193F descrita en la patente US no. 6,187,576 y disponible a solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

Alfa-amilasa JA: la alfa-amilasa híbrida consiste de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un ligador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD descrito en la V039 en la Tabla 5 en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S).

5

- Melaza Almacenada: la melaza de Caña de Azúcar almacenada desde el 2006 obtenidas de la Ciudad de Aracatuba, Estado de San Pablo, Brasil.

10 - Melaza Fresca: la melaza de Caña de Azúcar producida en el 2007 obtenidas de la Ciudad de Lencoes Paulista, Estado de Sao Pablo, Brasil.

Determinación de la Identidad

15

El término "identidad" significa el grado de identidad entre dos secuencias de amino ácido. La homología se puede determinar adecuadamente mediante programas de computadora conocidos en la técnica, tal como, GAP suministrado en el

20 paquete de programa GCG (Programa Manual para el Paquete Wisconsin, Versión 8, Agosto 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453. Las siguientes configuraciones para la

25 comparación de la secuencia de polipéptido se utilizan: pena de creación GAP de 3.0 y pena de extensión GAP de 0.1.

3/

Actividad de la Alfa-amilasa (KNU)

La actividad amiolítica se puede determinar utilizando almidón de papa como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de papa modificado mediante la enzima, y la reacción se sigue al mezclar muestras de almidón/solución de enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se debilita y gradualmente se vuelve en un café rojizo, que se compara con un vidrio coloreado estándar.

Una Unidad Kilo Novo de alfa-amilasa(KNU) se define como la cantidad de enzima la cual, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0.05; 0.0003 M de Ca²⁺; y pH 5.6) dextriniza 5260 mg de sustancia de almidón seco Merck Amylum solubile.

Un fólder EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico en más detalle está disponible bajo solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, cuyo fólder se incluye aquí mediante referencia.

Determinación del FAU(F)

El FAU(F) Fungal Alfa-Amilasa Units (Fungamyl) se mide con relación a un estándar de enzima de la resistencia declarada.

Condiciones de Reacción	
Temperatura	37°C
pH	7.15
Longitud de onda	405 nm
Tiempo de reacción	5 min
Tiempo de medición	2 min

Un fólder (EB-SM-0216.02) que describe este método estándar con más detalle está disponible bajo solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca, cuyo fólder se incluye aquí
5 mediante referencia.

Actividad de la Glucoamilasa (AGU)

La Unidad de Glucoamilasa Novo (AGU) se define como la
10 cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4.3, sustrato: maltosa 23.2 mM, amortiguador: acetato 0.1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

15 Se puede utilizar un sistema auto analizador. Se agrega mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de tal manera que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierte a su vez en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada
20 anteriormente, formando NADH que se determina utilizando un fotómetro a 340 nm como una medición de la concentración de glucosa original.

<u>Incubación AMG</u>	
Sustrato:	Maltosa 23.2 mM
Amortiguador:	Acetato 0.1 M
pH:	4.30 ± 0.05
Temperatura de Incubación:	37°C ± 1
Tiempo de Reacción:	5 minutos
Rango de trabajo de enzima:	0.5-4.0 AGU/mL
<u>Reacción de Color:</u>	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0.21 mM
Amortiguador:	Fosfato 0.12 M; 0.15 M de NaCl
pH:	7.60 ± 0.05
Temperatura de Incubación:	37°C ± 1
Tiempo de Reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

Un fólder (EB-SM-0131.02/01) describe este método analítico con más detalle está disponible bajo solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca, cuyo fólder se incluye aquí como
5 referencia.

Método de Ensayo de Proteasa - AU (RH)

La actividad proteolítica se puede determinar con la
10 hemoglobina desnaturalizada como sustrato. En el método Anson-Hemoglobina para la determinación de la actividad proteolítica se digirió hemoglobina desnaturalizada, y la hemoglobina no digerida se precipitó con ácido tricloroacético (TCA). La cantidad del producto soluble TCA

se determinó con un reactivo de fenol, que le da un color azul con tirosina y triptofano.

Una Unidad Anson (AU-RH) se define como la cantidad de
5 enzima que bajo condiciones estándar (es decir, 25°C, pH 5.5 y tiempo de reacción 10 min.) digiere la hemoglobina a una tasa inicial de tal manera que se libera por minuto una cantidad de producto soluble TCA que da el mismo color con reactivo de fenol como un miliequivalente de tirosina.

10

El método AU(RH) se describe en EAL-SM-0350 y está disponible de Novozymes A/S Dinamarca bajo solicitud.

EJEMPLOS

15 **Ejemplo 1:**

Sacarificación Simultánea y Fermentación de Melaza de Caña de
Azúcar

Este ejemplo investiga el efecto de alfa-amilasa,
20 glucoamilasa y proteasa en un proceso de fermentación de etanol utilizando melaza de caña de azúcar como materia prima.

La melaza de caña de azúcar almacenada se diluyó en agua
25 corriente a un °Bx de 18-20%. El pH se ajustó a 4.7-4.9 con ácido sulfúrico. La melaza diluida se llenó en tubos con tapas de aproximadamente 25 mL. El medio de fermentación no se suplementó con nitrógeno, fosfato, vitamina o antibiótico.

El inóculo de levadura se preparó en una solución de melaza de 5-7% °Bx. Se agregó el inóculo de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (RED STAR™) al medio de fermentación hasta que la suspensión contenía aproximadamente 40-50% de sólidos (que corresponden a entre 10^8 - 10^9 células/mL de medio de fermentación) medido utilizando una centrífuga (2500 rpm, 20°C durante 10 minutos). La suspensión de la levadura se incubó a temperatura ambiente (18-25°C) durante alrededor de 12 horas.

Las enzimas se diluyeron en agua corriente y se pipetearon en tubos y se homogenizaron.

Dosis y enzimas utilizadas:

Alfa-amilasa SC:	9.6 KNU/L de medio de fermentación
Glucoamilasa SF:	60 AGU/L de medio de fermentación
Proteasa ALC:	0.048 AU/L de medio de fermentación

La fermentación se inició al agregar 2 mL de suspensión de levadura en los tubos. Todos los tubos se incubaron en un baño de agua a $32 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante 24 horas. El experimento se configuró con 5 tubos para cada tratamiento (duplicado).

Se llevaron a cabo los siguiente análisis: pH (potenciómetro), % Brix (refractómetro) viscosidad (viscómetro: ANTO PAAR, DMA 5000 y un micro-viscómetro AMVn) y HPLC (AMINEX HPX-87H, 0.005M de ácido sulfúrico, 65°C de

temp, 10 microL de volumen de inyección y 30 min de tiempo de corrida).

El blanco (no enzimas agregadas) se comparó con el
5 tratamiento enzimático con 9.6 KNU/L + 60 AGU/L + 0.048 AU/L de medio de fermentación. Los resultados se muestran en las Figs. 1 y 2.

En general, el decaimiento de los °Bx mide el consumo de
10 azúcar fermentable mediante la levadura.

El pH da una indicación de la contaminación. Los ácidos normalmente se producen mediante contaminantes que reducen el pH. El incremento del pH podría significar la falta de
15 levadura como consecuencia de la falta de nutrientes.

Cuando los °Bx son estables durante al menos 1 hora la fermentación se considera finalizada. La estera mostró que la fermentación de la melaza enzimáticamente tratada se finalizó
20 antes del blanco (control). La ganancia de productividad se estimó en alrededor del 6% como se demostró mediante la línea de tendencia lineal de los °Bx mostrada en la Fig. 3.

Ejemplo 2

25

Sacarificación Simultánea y Fermentación de la Melaza de Caña de Azúcar

Este ejemplo se llevó a cabo a la misma condición experimental como en el Ejemplo 1. Adelante se utilizaron dosis y mezclas de enzima.

- 5 -Alfa-amilasa SC (19 KNU/L) + Glucoamilasa SF (120 AGU/L);
 -Alfa-amilasa JA (26 FAU(F)/L + Glucoamilasa TC (160
 AGU/L);

10 Las Figs. 4 y 5, respectivamente, despliegan el pH y las
 curvas de decaimiento de los °Bx para las anteriores mezclas.
 La ganancia de productividad se estimó en alrededor del 6%
 como se demostró mediante la línea de tendencia lineal de °Bx
 mostrada en la Fig. 6.

15 **Ejemplo 3**

Pre-tratamiento Enzimático de la melaza de caña de azúcar

20 Este ejemplo investiga el efecto del pre-tratamiento
 enzimático de la melaza de caña de azúcar sobre los
 rendimientos de etanol.

Se utilizaron las siguientes mezclas de enzima:

- 25 -Mezcla de Alfa-Amilasa JA (26 FAU(F)/L); Glucoamilasa TC
 (160 AGU/L y Proteasa ALC;

-Mezcla de Alfa-Amilasa SC (18 KNU/L); Glucoamilasa SF (112 AGU/L) y Proteasa ALC (0.048 AU/L de medio de fermentación).

5 La melaza de caña de azúcar (°Bx aproximadamente 80%) se pre-trató a 50°C durante 30 horas antes de la fermentación utilizando la levadura RED STAR™ se llevó a cabo durante 6 y 10 horas, respectivamente, a las mismas condiciones experimentales como se indicó en el Ejemplo 1.

10

Resultados:

Después de 6 y 10 horas las muestras de fermentación se tomaron para análisis HPLC. Las Figs. 7 y 8, respectivamente, 15 muestran los rendimientos de etanol. Se encontró un incremento en el rendimiento de etanol significativo cuando se pre-trató enzimáticamente a 50°C durante 30 horas ante de la fermentación (nivel de confianza = 95%).

20 La productividad se estimó a través del decaimiento del azúcar de reducción total (TRS). TRS significa la suma de dextrosa y fructosa obtenida mediante análisis HPLC. Las Figs. 9 y 10, respectivamente, muestran el decaimiento TRS después de 6 horas y 10 horas de fermentación, 25 respectivamente.

La ganancia de productividad corresponde a la ganancia estimada de aproximadamente 4% también encontrada en el Ejemplo 1.

5 En conclusión, el enzimático pre-tratado de la melaza a 50°C durante 30 horas conduce tanto al incremento del rendimiento como a mejoras en la productividad.

Ejemplo 4

10

Viscosidad Durante la Sacarificación y la Fermentación Simultánea de la Melaza de Caña de Azúcar

Este ejemplo investiga la viscosidad de la melaza durante
15 la sacarificación y la fermentación simultáneas utilizando las mezclas de enzima mencionadas abajo. Los rastros fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones y utilizando la misma melaza como en el Ejemplo 1.

20 Mezclas de Enzima:

- Alfa-amilasa JA (26 FAU(F)/L) + Glucoamilasa TC (160 AGU/L);

- Alfa-amilasa SC (9.6 KNU/L) + Glucoamilasa SF (60 AGU/L) +
25 Proteasa ALC (0.048 AU/L)

- Alfa-amilasa SC (19 KNU/L) + Glucoamilasa SF (120 AGU/L) +
Proteasa ALC (0.048 AU/L)

- Alfa-amilasa JA (13 FAU(F)) + Glucoamilasa TC (80 AGU/L)

La viscosidad se determinó utilizando un viscómetro (ANTO PAAR, DMA 5000). Los resultados de rastro se muestran en la Fig. 11.

5 Ejemplo 5:

Sacarificación y Fermentación Simultáneas de la Melaza de Caña de Azúcar en un Rastro a Escala Industrial

10 Este ejemplo investiga el efecto de la alfa-amilasa y la glucoamilasa en un proceso de fermentación de etanol a gran escala utilizando melaza de caña de azúcar como materia prima.

15 Se llevaron a cabo catorce tandas de prueba en producción a escala industrial en las cuales se agregaron la mezcla de enzimas. Se llevaron a cabo veintidós tandas en blanco a la misma escala de producción. Las tandas de prueba y las en blanco se cargaron con el mismo volumen de trabajo (320 m^3),
20 así como también las mismas dosis de antibiótico y micronutriente.

Se obtuvo un inóculo de levadura al reciclar la metodología de célula en la cual el caldo de fermentador
25 completo pasa a través de parte del líquido de separación de centrífuga - etanol y agua - parte sólida - célula de levadura o crema de levadura conteniendo al menos 30% de sólidos (que corresponden a entre 10^7 - 10^9 células/mL de medio

de fermentación) medido utilizando una centrífuga (2500 rpm, temperatura ambiente durante 10 minutos).

La crema de levadura o el inóculo se pre-trata con ácido
5 sulfúrico concentrado hasta de 2.5 - 3.0 pH y mantenida bajo
agitación suave durante 30 min. Después de eso, la crema de
levadura se bombeó hacia el fermentador. El volumen del
inóculo es de alrededor del 25% de volumen de trabajo total
del fermentador.

10

El caldo de fermentación o la melaza lavada se obtuvieron
a través de la dilución del almacenamiento de melaza de caña
de azúcar a un Bx de 75 - 80% en agua de llave a un Bx de 18
- 22% alcanzando 13 - 16% de azúcar reductor, que se bombea
15 continuamente hacia el fermentador de acuerdo con una tasa de
llenado de 40 m³/h, completando la operación en
aproximadamente 6 horas.

Las tandas de prueba recibieron 9.6 KNPU/L de Alfa-
20 amilasa SC y 60 AGU/L de Glucoamilasa SF, justo antes de
bombear el caldo de fermentación hacia el fermentador o justo
antes de tener el inóculo en el fermentador. No se agregaron
enzimas a las tandas en blanco.

25 La temperatura de fermentación fue de $32 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ para
todas las tandas, incluyendo en blanco y pruebas. No se hizo
ajuste de pH. Sin embargo, las muestras del caldo de
fermentación se midieron dentro de 4.5 - 5.0 pH.

Las tandas de fermentación finalizaron cuando la medición del Bx era estable entre 6 - 8% y/o un azúcar residual reductor estaba por debajo del 1%, típicamente dentro de 8 - 10 h después de iniciar la rampa de llenado.

Los siguientes análisis se llevaron a cabo: pH (potenciómetro), % Brix (refractómetro), concentración de etanol (destilación y densitometría) y azúcar reductor (titulación fehling). El rendimiento de la fermentación se expresó a través de la tasa de conversión entre el etanol formado durante la fermentación (que excluye el etanol llevado por inóculo) por los sólidos totales en el caldo de fermentación expresado a través del Bx. Los resultados se muestran en la tabla 2 y 3.

El desempeño del rendimiento se resume en la tabla 1:

Experimentos	Media	Varianza
Blanco (22 tandas)	38.38%	0.0392%
Pruebas (14 tandas)	40.62%	0.0524%
Prueba T: dos muestras asumiendo varianzas no iguales: tiene la hipótesis de diferencia media para 95% de probabilidad		
P(T<=t) una cola		0.002948
Conclusión: las medias son 2.24% estadísticamente diferentes a 95% de probabilidad		
Tabla 1: resumen del desempeño de experimentos		

43

Tandas en Blanco	Melaza de Almacenamiento		Caldo de Fermentación		Inóculo	Cerveza (fin de fermentación)		Etanol	Rendimiento
	Bx %	TRS %	Bx %	TRS %	Etanol oGL	TRRS %	Etanol oGL	Real oGL	oGl Real/Bx
BK_1	82.40	56.37	20.63	14.51	3.79	1.01	7.01	8.23	39.90%
BK_2	82.60	57.12	18.83	13.57	3.77	0.97	6.56	7.62	40.46%
BK_3	83.20	57.35	19.81	13.68	3.28	0.74	6.50	7.72	38.98%
BK_4	82.80	57.48	22.08	15.79	4.20	1.30	7.17	8.30	37.57%
BK_5	82.60	57.90	20.33	14.86	3.54	0.98	6.90	8.17	40.21%
BK_6	82.00	54.75	20.58	14.97	3.63	0.97	6.90	8.14	39.55%
BK_7	82.40	55.89	20.28	14.57	3.43	0.98	6.72	7.97	39.29%
BK_8	82.60	54.22	20.18	13.60	3.22	0.85	6.73	8.06	39.95%
BK_9	83.20	55.06	21.94	14.92	3.60	0.90	7.32	8.73	39.80%
BK_10	82.60	54.66	21.97	14.64	4.21	1.00	7.18	8.31	37.81%
BK_11	82.60	55.76	20.92	14.82	3.39	1.14	6.64	7.87	37.63%
BK_12	81.00	55.12	20.96	14.54	3.64	0.97	7.01	8.29	39.54%
BK_13	80.00	54.47	20.97	14.78	3.53	0.99	6.94	8.23	39.26%
BK_14	79.60	53.44	13.86	9.47	1.71	0.55	4.09	4.99	36.02%
BK_15	79.20	55.64	15.75	11.91	1.88	0.54	4.58	5.60	35.58%
BK_16	79.40	54.37	17.55	14.61	3.54	4.11	5.17	5.79	32.98%
BK_17	79.00	54.52	16.52	10.75	2.77	0.71	4.98	5.82	35.22%
BK_18	79.60	54.58	19.30	15.03	2.50	0.74	5.81	7.07	36.61%
BK_19	79.60	54.27	19.80	15.90	2.98	0.89	6.53	7.88	39.78%
BK_20	78.40	54.27	19.78	14.81	3.43	1.05	6.67	7.90	39.93%
BK_21	78.60	53.60	18.73	14.00	3.14	0.93	6.12	7.25	38.71%
BK_22	79.40	55.73	19.90	14.11	2.82	0.63	6.49	7.88	39.61%

Tab 2: Tandas en blanco: datos brutos y cálculo de rendimiento
Bx % o Bx - sólido total disuelto en solución (caldo de fermentación o cerveza de fermentación)
TRRS % - azúcar reductor total
Etanol oGL - concentración de etanol (% v/v)
TRRS % - azúcar residual reductor total
Etanol Real oGL - concentración de etanol efectivamente formado durante la fermentación o que excluye el etanol llevado por el inóculo
Rendimiento % - oGL real/brix - porcentaje de conversión entre el etanol formado durante la fermentación por el sólido total expresado mediante Bx %

Tandas de Prueba	Melaza de Almacenamiento		Caldo de Fermentación		Inóculo	Cerveza (fin de fermentación)		Etanol	Rendimiento
	Bx %	TRS %	Bx %	TRS %	Etanol oGL	TRRS %	Etanol oGL	Real oGL	oGl Real/Bx
Te_1	79.40	54.37	17.55	15.98	4.18	4.22	5.88	6.52	37.18%
Te_2	79.40	54.37	17.55	15.75	3.28	0.97	5.66	6.56	37.39%
Te_3	79.20	52.33	16.40	11.36	2.34	0.69	5.30	6.42	39.16%
Te_4	79.20	52.33	16.40	11.38	1.90	0.63	5.20	6.45	39.34%
Te_5	79.20	54.49	19.40	15.02	1.98	0.80	6.12	7.69	39.64%

44

Te_6	79.20	54.49	19.30	15.20	2.10	0.75	6.16	7.70	39.90%
Te_7	79.20	55.00	19.70	15.40	2.80	1.74	6.36	7.71	39.14%
Te_8	79.20	55.00	20.00	15.54	2.92	1.02	6.89	8.40	41.98%
Te_9	78.40	54.27	20.30	15.26	3.70	0.78	7.26	8.61	42.42%
Te_10	78.40	54.27	19.80	14.75	3.62	0.79	7.26	8.64	43.64%
Te_11	78.60	53.60	18.10	13.55	3.22	0.63	6.04	7.11	39.28%
Te_12	78.60	53.60	18.30	14.00	3.02	0.58	6.42	7.71	42.13%
Te_13	79.40	55.73	19.60	15.22	2.90	0.58	7.10	8.69	44.35%
Te_14	79.40	55.73	19.90	15.30	2.76	0.60	6.98	8.58	43.12%

Tab 3: Tandas de prueba: datos brutos y cálculo de rendimiento
Bx % o Bx - sólido total disuelto en solución (caldo de fermentación o cerveza de fermentación)
TRS % - azúcar reductor total
Etanol oGL - concentración de etanol (% v/v)
TRRS % - azúcar residual reductor total
Etanol Real oGL - etanol de concentración efectivamente formado durante la fermentación o que excluye el etanol llevado por el inóculo
Rendimiento % - oGL real/brix - porcentaje de conversión entre el etanol formado durante la fermentación por el sólido total expresado mediante Bx %

REIVINDICACIONES

1. Un procesos para producir un producto de fermentación de melaza que utiliza un organismo fermentador, en donde
5 la melaza se
 - i. trata con una combinación de alfa-amilasa y glucoamilasa, y
 - ii. fermenta utilizando uno o más organismos
10 fermentadores en un conteo celular en el rango de 10^7 - 10^{10} células/mL de medio de fermentación.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el conteo de célula está en el rango de 10^8 - 10^{10} células/mL de medio
15 de fermentación, especialmente alrededor de 10^9 células/mL de medio de fermentación.
3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde el tratamiento de enzima en la etapa i) y la fermentación
20 en la etapa ii) se llevan a cabo secuencialmente o simultáneamente.
4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde una etapa i) se lleva a cabo como una etapa de
25 pre-tratamiento a condiciones adecuadas para las enzimas.

5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la etapa i) se lleva a cabo a una temperatura en el rango de 20-70°C, preferiblemente 40-60°C, preferiblemente 45-55°C.

5

6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el pH durante el tratamiento en la etapa i) está en el rango de 4-6.

10

7. El proceso de las reivindicaciones 1-6, en donde la etapa i) se lleva a cabo al someter la melaza a tratamiento de enzima durante 1-10 días.

15

8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la fermentación en la etapa ii) o las etapas simultáneas i) y ii) se llevan a cabo entre 1 y 96 horas, preferiblemente entre 5 y 48 horas.

20

9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el tratamiento de enzima en la etapa i) y la fermentación en la etapa ii) se lleva simultáneamente.

25

10. El proceso de la reivindicación 8, en donde la temperatura durante la etapa simultánea i) y la etapa ii) es óptima para el organismo fermentador, preferiblemente levadura.

11. El proceso de la reivindicación 10, en donde la temperatura está en el rango de 25-60°C.
- 5 12. El proceso de la reivindicación 11, en donde la etapa simultánea i) y la etapa ii) se llevan a cabo a una temperatura entre 25 y 40°C cuando el organismo fermentador es levadura, preferiblemente 28 y 36°C, especialmente en el rango de 30-34°C, tal como alrededor de 32°C.
- 10 13. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el producto de fermentación es etanol.
- 15 14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la alfa-amilasa es una alfa-amilasa fúngica, preferiblemente una alfa-amilasa fúngica ácida, preferiblemente derivada de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii* o *Aspergillus oryzae*; o
- 20 del género *Rhizomucor*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus*, o el género *Meripilus*, preferiblemente *Meripilus giganteus*.
- 25 15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde la glucoamilasa se selecciona del grupo que consiste de glucoamilasas derivadas del género *Aspergillus*, preferiblemente una cepa de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, o el

género *Athelia*, preferiblemente una cepa de *Athelia rolfsii*, el género *Talaromyces*, preferiblemente una cepa de *Talaromyces emersonii*, o el género *Rhizopus*, tal como una cepa de *Rhizopus nivius*, o del género *Humicola*, preferiblemente una cepa de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, o una cepa del género *Trametes*, preferiblemente una cepa de *Trametes cingulata*.

16. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde además el organismo fermentador es levadura y se somete a una o más proteasas durante la fermentación en la etapa ii) o tratamiento de enzima y fermentación simultáneo.

17. El proceso de la reivindicación 16, en donde la proteasa es de origen fungoso o bacteriano.

18. El proceso de la reivindicación 17, en donde la proteasa fúngica se deriva de una cepa del género *Aspergillus*, preferiblemente una cepa de *Aspergillus oryzae*, o una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor miehei*.

19. El proceso de la reivindicación 17, en donde la proteasa se deriva de una cepa de *Bacillus*, preferiblemente *Bacillus licheniformis* o *Bacillus amyloliquefaciens*.

20. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en donde el material que contiene almidón es melaza de caña de azúcar.
- 5 21. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el organismo fermentador es levadura, tal como *Saccharomyces*, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*.

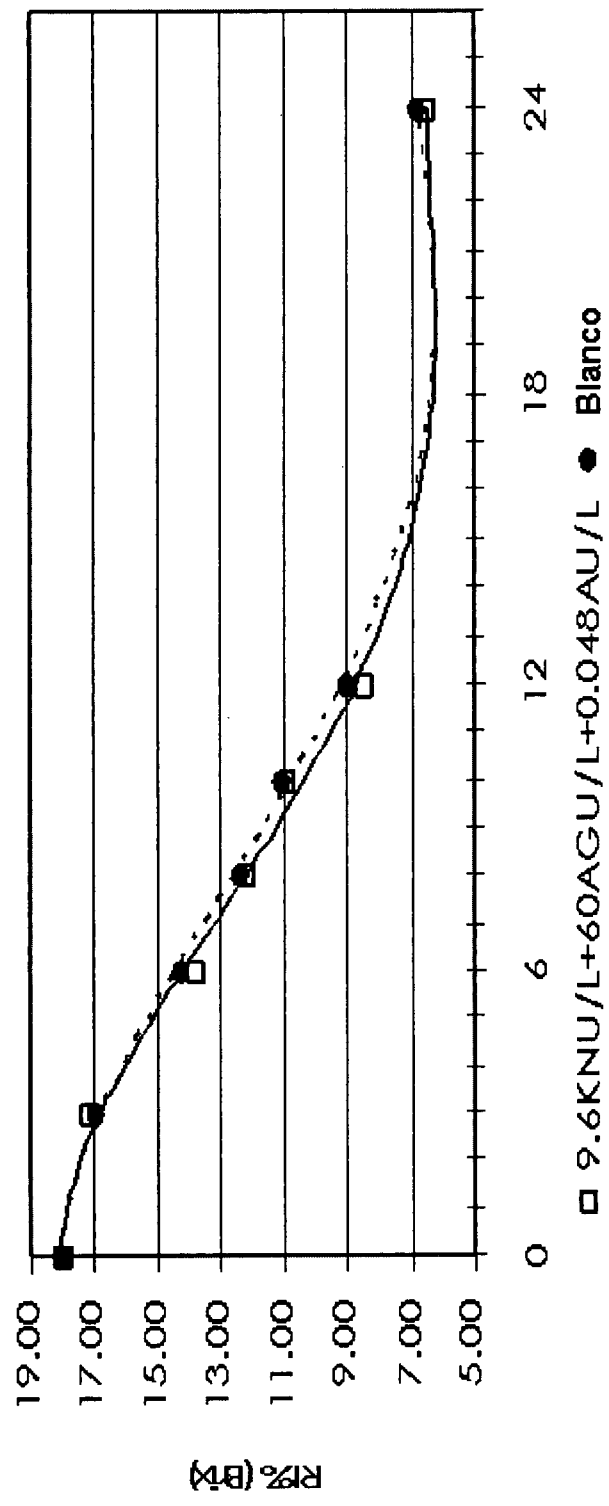


Figura 1

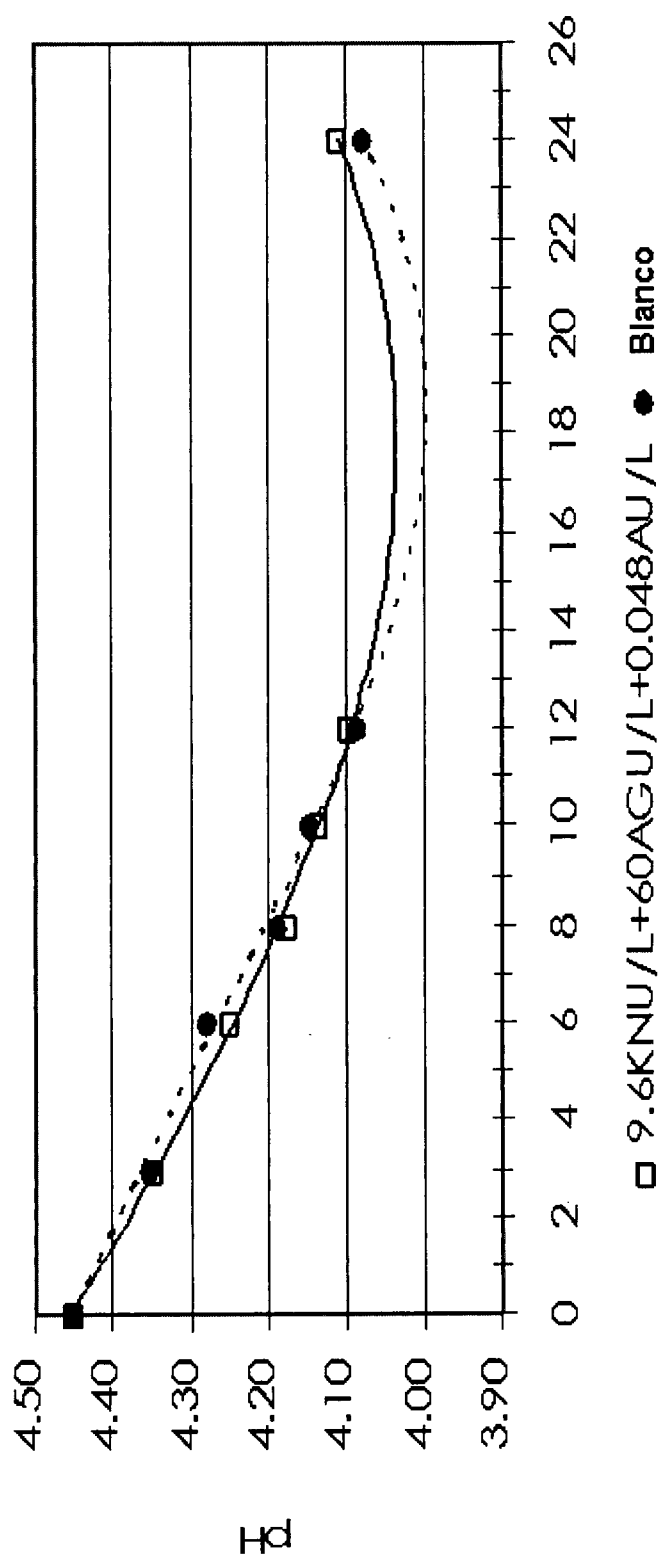


Figura 2

$$y = -0.7721x + 18.622$$

$$R^2 = 0.983$$

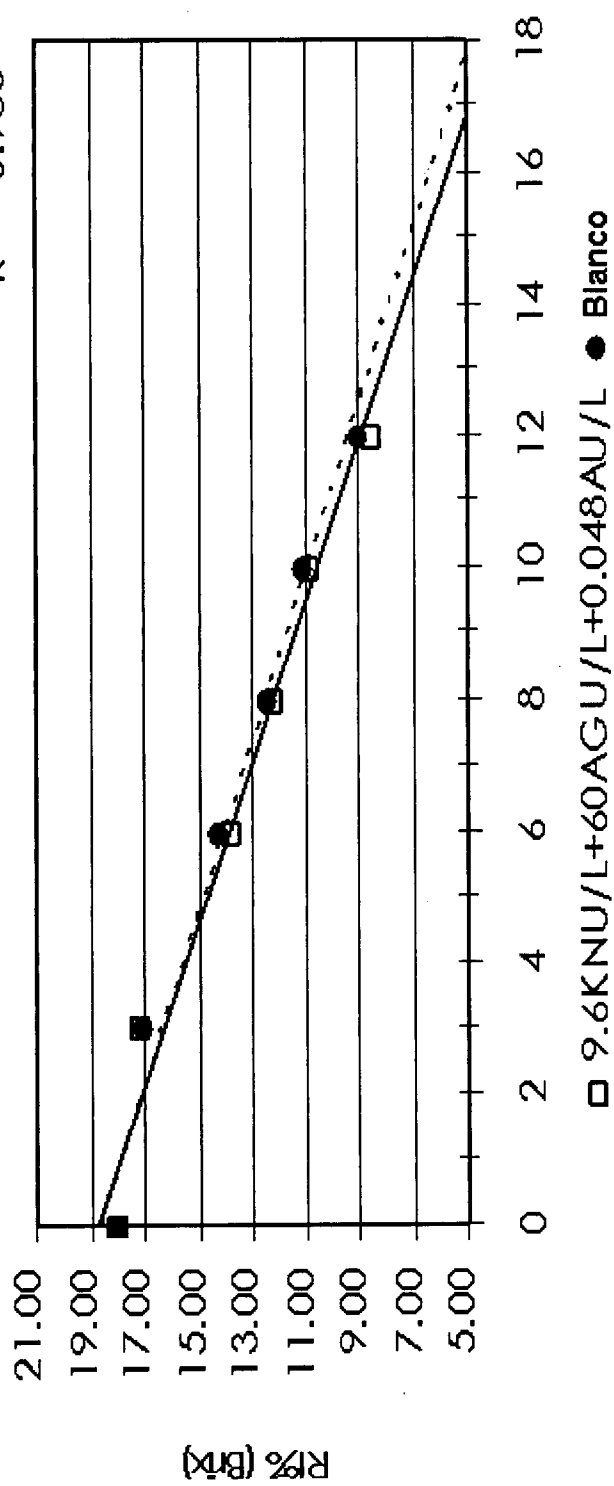


Figura 3

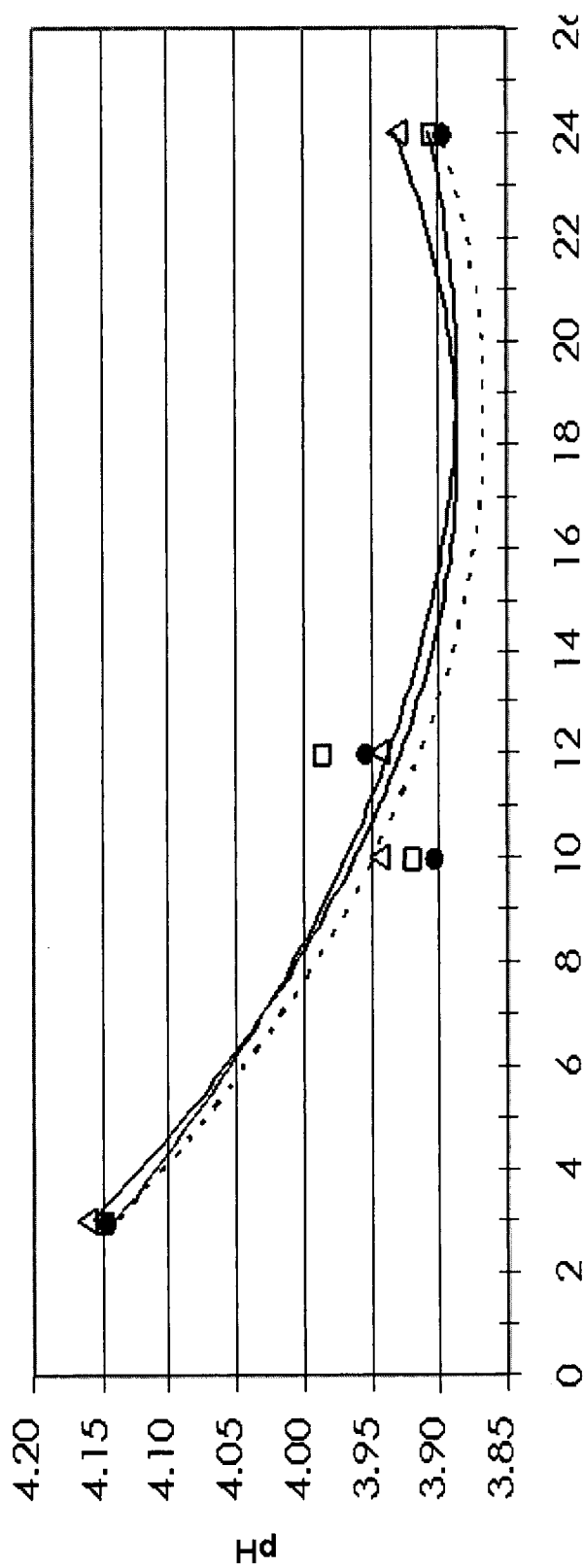


Figura 4

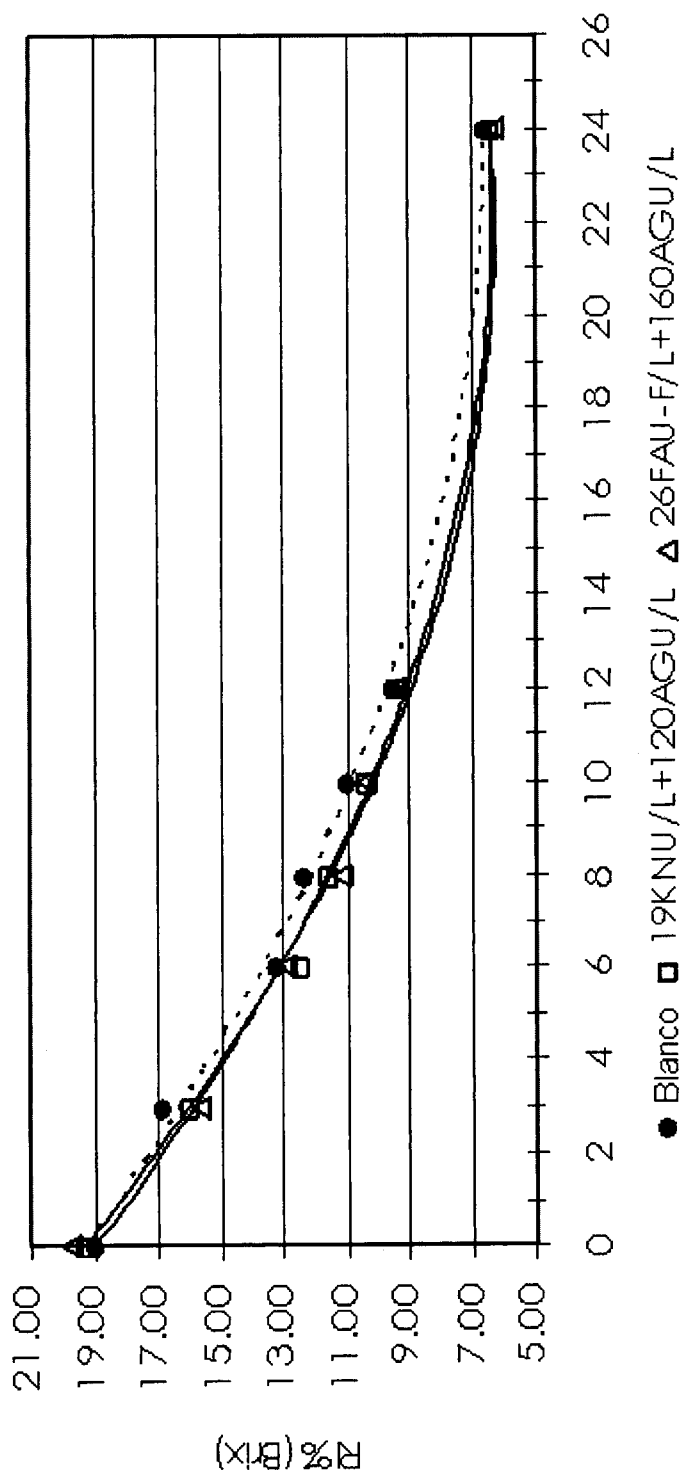


Figura 5

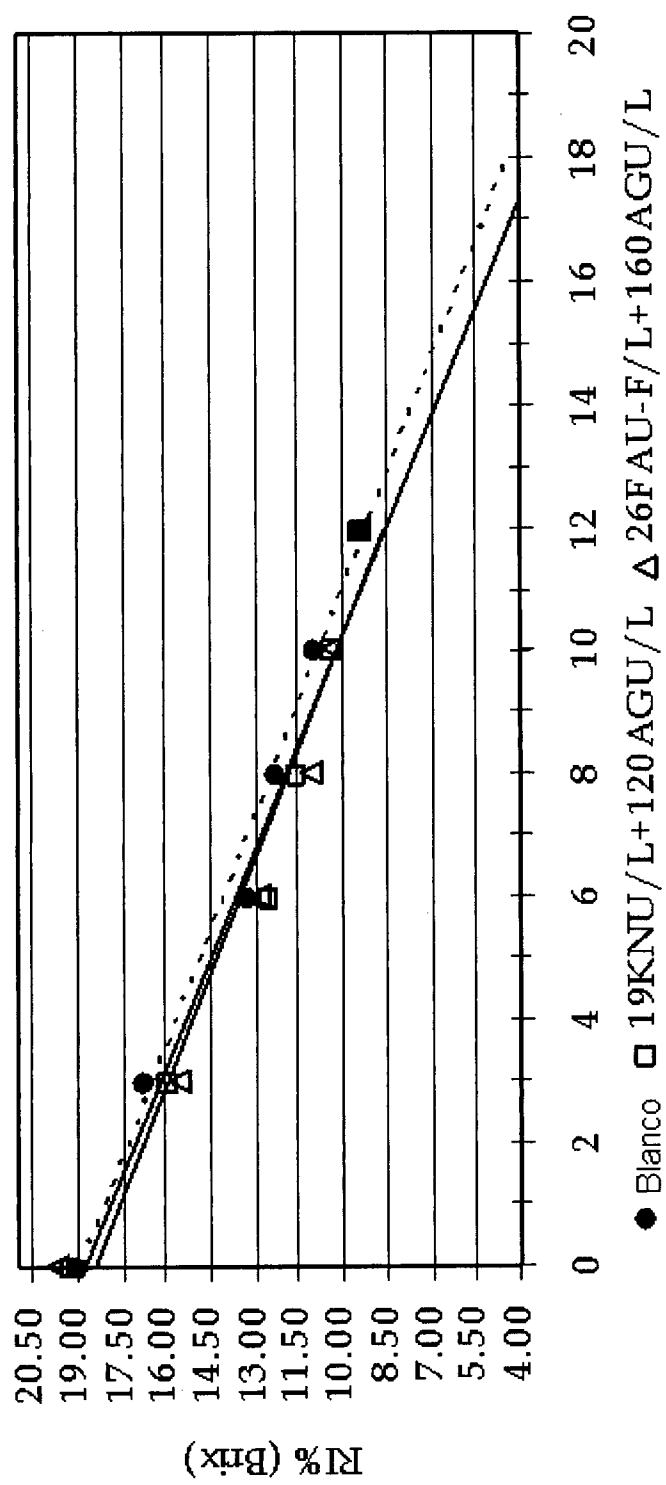
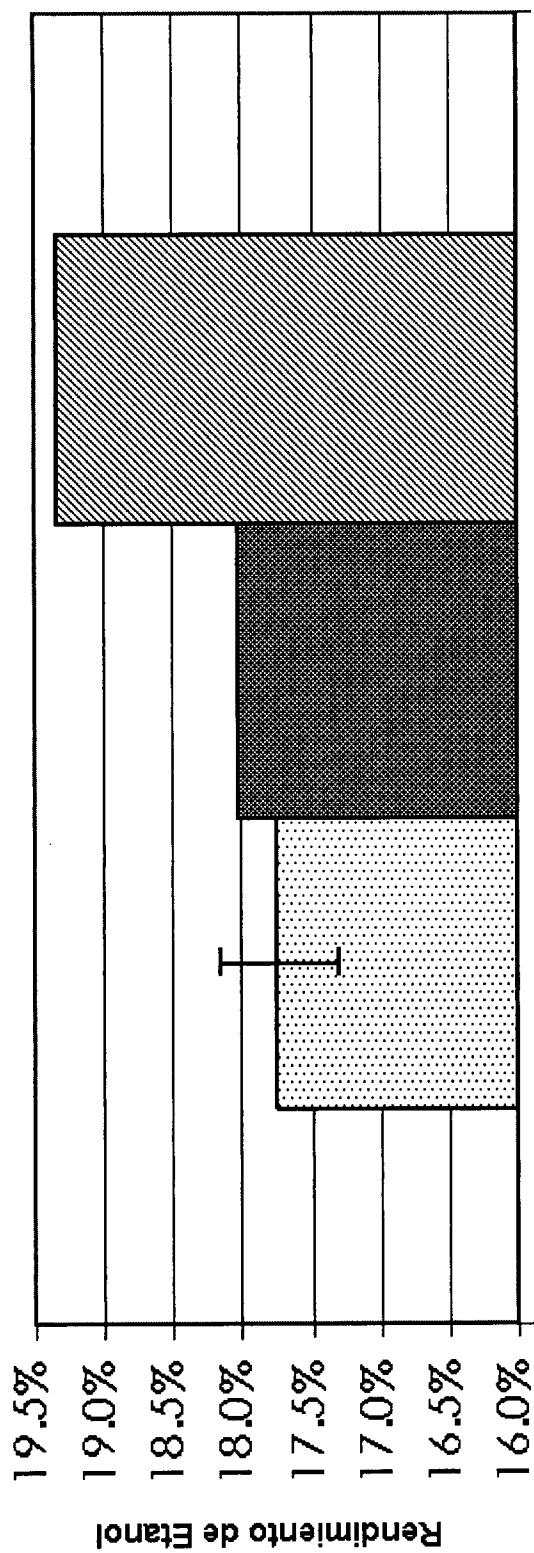
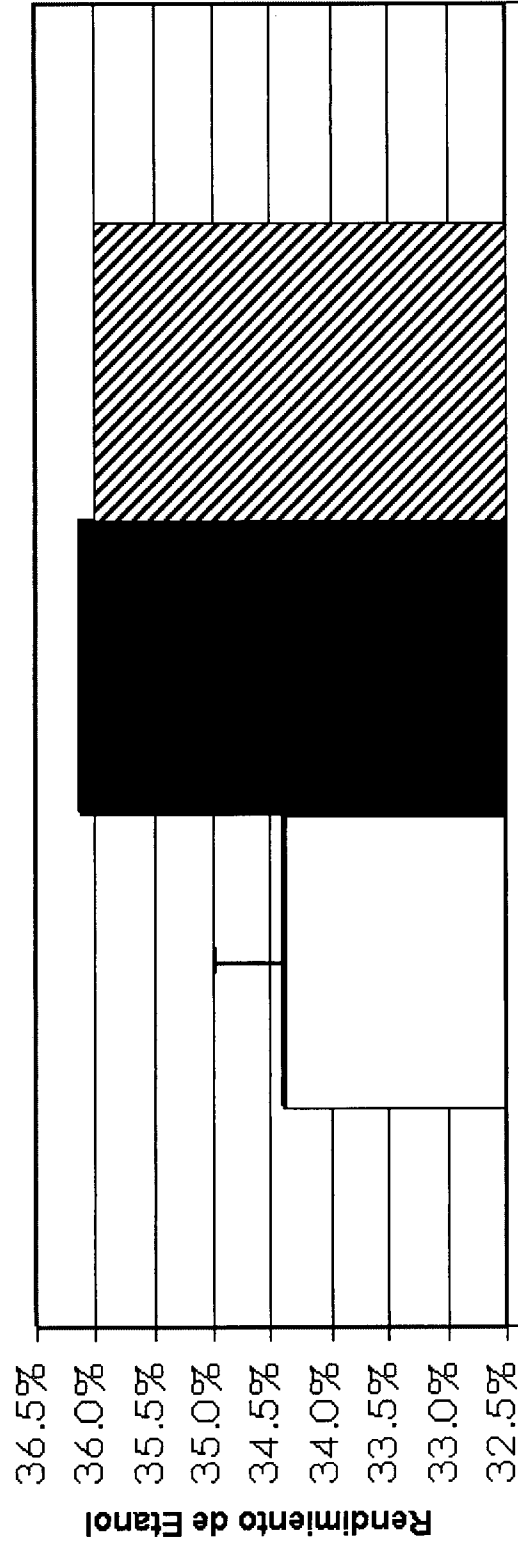


Figura 6



Blanco 26FAU-F/L+160AGU/L+0.048AU/L 18KNU/L+12AGU/L+0.048AU/L

Figura 7



Blanco ■ 26FAU-F/L+160A GU/L+0.048A U/L ▨ 18KNU/L+112A GU/L+0.048A U/L

Figura 8

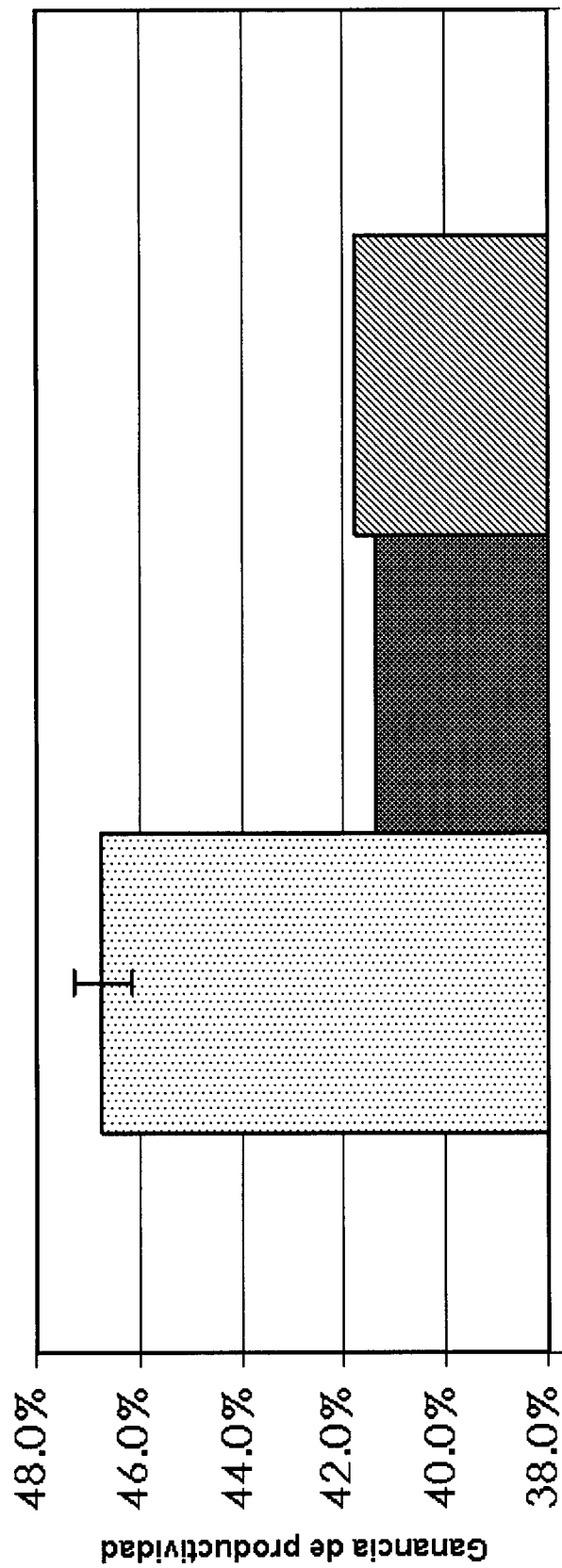


Figura 9

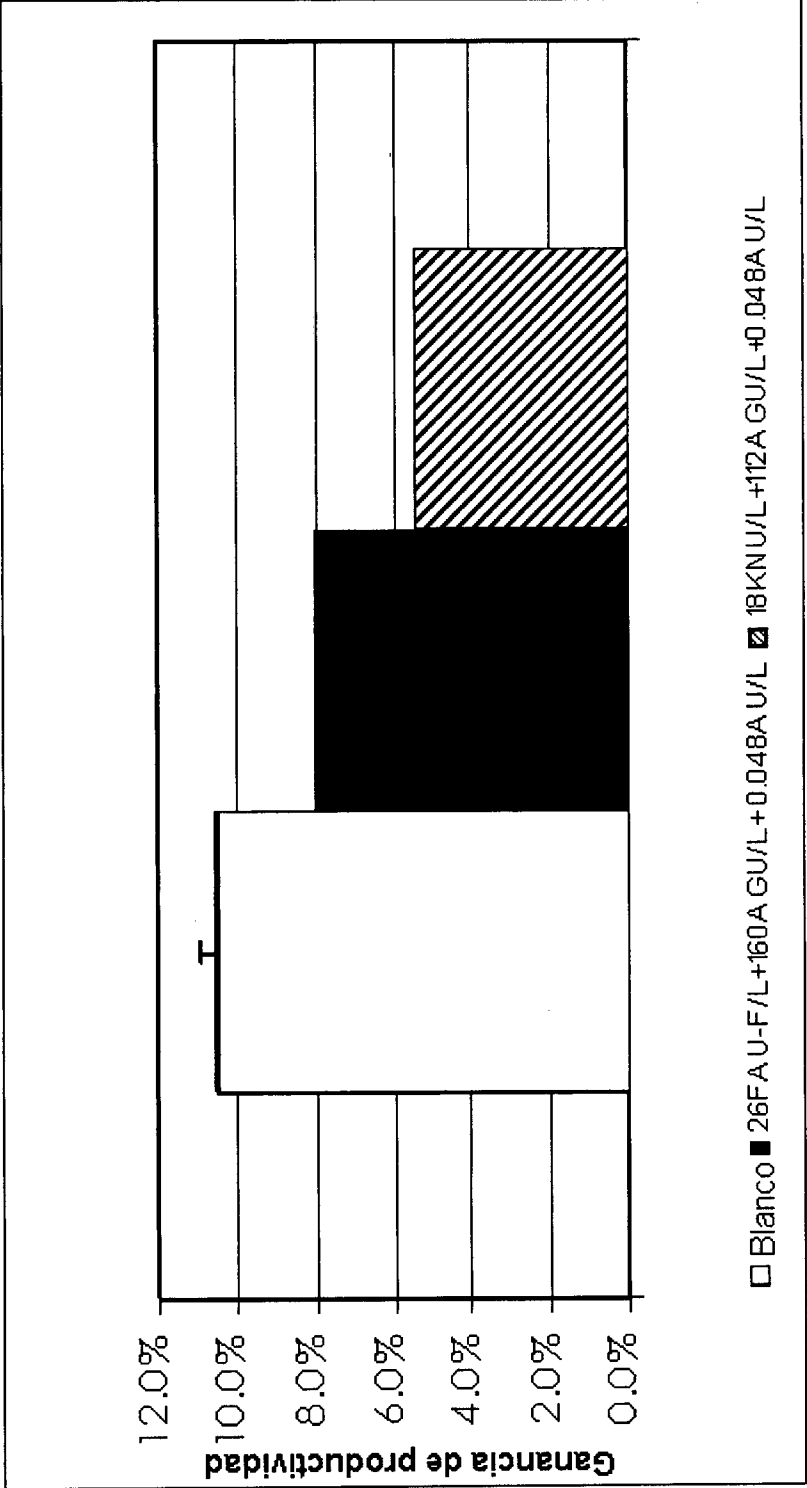


Figura 10

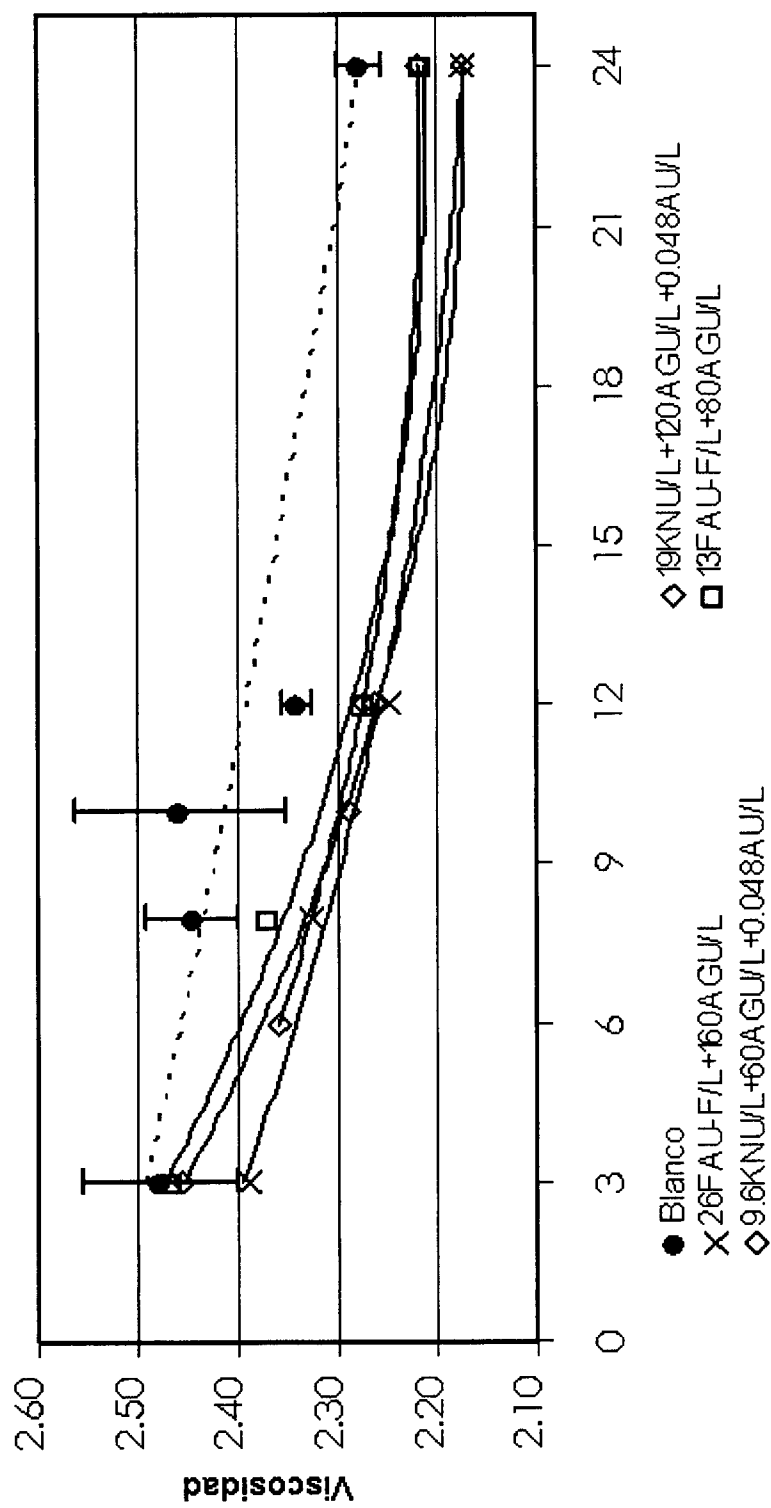


Figura 11

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	PCT/US08/79490
0-2	International Filing Date	10 OCT 2008(10.10.2008)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	PCT INTERNATIONAL APPLICATION RO/US
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.029.204 MT/FOP 20080701/0.20.5.12
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	11283.204-WO
I	Title of Invention	A PROCESS OF PRODUCING A FERMENTATION PRODUCT
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	NOVOZYMES A/S
II-5	Address	Krogshoejvej 36 DK-2880 Bagsvaerd Denmark
II-6	State of nationality	DK
II-7	State of residence	DK
II-8	Telephone No.	2128400097
II-9	Facsimile No.	2128400221
II-10	e-mail	Patents-US-NY@novozymes.com
II-10(a)	E-mail authorization The receiving Office, the International Searching Authority, the International Bureau and the International Preliminary Examining Authority are authorized to use this e-mail address to send, if the Office or Authority so wishes, advance copies of notifications in respect of this international application.	Yes

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant only
III-1-2	Applicant for	all designated States except US
III-1-4	Name	NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.
III-1-5	Address	77 Perry Chapel Church Road P.O. Box 576 Franklinton, North Carolina 27525 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	BORDIN, Eder Manzini
III-2-5	Address	Av. Dr. Eugenio Bertolli, 3192 Sta Felicidade 82410-530 Curitiba PR Brazil
III-2-6	State of nationality	BR
III-2-7	State of residence	BR
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	PEREIRA DE SOUZA, Viviane
III-3-5	Address	Rua Prefeito Angelo Lopes 162 ap 605 80050-330 Curitiba-Parana Brazil
III-3-6	State of nationality	BR
III-3-7	State of residence	BR
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	ORMEROD, Fabiane Bueno
III-4-5	Address	Rua Ricardo Lemos, 304 apt 23- Ahu 84540-030 Curitiba-PR Brazil
III-4-6	State of nationality	BR
III-4-7	State of residence	BR

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-5	Applicant and/or Inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	DE ALAMEIDA JR., Adauto
III-5-5	Address	Rua Pasteur, 486 - ap 201 80050-330 Curitiba-Parana Brazil
III-5-6	State of nationality	BR
III-5-7	State of residence	BR
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	12 October 2007 (12.10.2007)
VI-1-2	Number	60/979,471
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VI-3	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	—	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	—	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	—	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	—	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	—	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description	20	—
IX-3	Claims	3	—
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	11	—
IX-7	TOTAL	40	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	—
IX-11	Copy of general power of attorney	reference no. 11283.204-WO	—
IX-18	PCT-SAFE physical media	—	✓
IX-20	Figure of the drawings which should accompany the abstract	11283.204-WO	
IX-21	Language of filing of the International application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/Jennifer L Fox Reg #52218/	
X-1-1	Name	NOVOZYMES A/S	
X-1-2	Name of signatory	Jennifer L. Fox	
X-1-3	Capacity	Agent	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	10 OCT 2008(10.10.2008)
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only	PCT/US08/79490		
0-1	International Application No.			
0-2	Date stamp of the receiving Office	10 OCT 2008		
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet			
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.029.204 MT/FOP 20080701/0.20.5.12		
0-9	Applicant's or agent's file reference	11283.204-WO		
2	Applicant	NOVOZYMES A/S		
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (USD)	
12-1	Transmittal fee T	⇒	300	300
12-2-1	Search fee S	⇒	2665	2665
12-2-2	International search to be carried out by	EP	1137 150	
12-3	International filing fee (first 30 sheets) i1	1338		
12-4	Remaining sheets	10		
12-5	Additional amount (X) i2	15		
12-6	Total additional amount i2	150		
12-7	i1 + i2 = i	1488		
12-12	EASY Filing reduction R	-101		
12-13	Total International filing fee (i-R) I	⇒	1387	
12-14	Fee for priority document			
	Number of priority documents requested			
12-15	Fee per document (X) 0			
12-16	Total priority document fee: P	⇒		
12-17	Fee for restoration of priority rights RP			
	Number of requests for restoration of priority rights			
	Total amount of fees for restoration of priority rights			
12-19	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+I+P+RP)	⇒	4352	4252

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

12-21	Mode of payment	authorization to charge deposit account
12-22	Deposit account instructions	
	The receiving Office	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
12-22-1	Authorization to charge the total fees indicated above	✓
12-22-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above	✓
12-22-3	Authorization to charge the fee for priority document	✓
12-23	Deposit account No.	501701
12-24	Date	10 October 2008 (10.10.2008)
12-25	Name and signature	NOVOZYMES A/S

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 April 2009 (16.04.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/049136 A2

(51) International Patent Classification:
C12P 7/08 (2006.01) *C12P 19/20* (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

DE ALAMEIDA JR., Adauto [BR/BR]; Rua Pasteur,
486 - ap 201, 80050-330 Curitiba-Parana (BR).

(21) International Application Number:
PCT/US2008/079490

(74) Agents: **FOX, Jennifer, L.** et al.; Novozymes North
America, Inc., 500 5th Avenue, Suite 1600, New York, NY
10110 (US).

(22) International Filing Date: 10 October 2008 (10.10.2008)

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/979,471 12 October 2007 (12.10.2007) US

(71) Applicants (*for all designated States except US*):
NOVOZYMES A/S [DK/DK]; Krogshoejvej 36,
DK-2880 Bagsvaerd (DK). **NOVOZYMES NORTH
AMERICA, INC.** [US/US]; 77 Perry Chapel Church
Road, P.O. Box 576, Franklinton, NC 27525 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **BORDIN, Eder,**
Manzini [BR/BR]; Av. Dr. Eugenio Bertolli, 3192, Sta
Felicidade, 82410-530 Curitiba PR (BR). **PEREIRA
DE SOUZA, Viviane** [BR/BR]; Rua Prefeito Angelo
Lopes 162, ap 605, 80050-330 Curitiba-Parana (BR).
ORMEROD, Fabiane, Bueno [BR/BR]; Rua Ricardo
Lemos, 304, apt 23- Ahu, 84540-030 Curitiba-PR (BR).

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished
upon receipt of that report*

(54) Title: A PROCESS OF PRODUCING A FERMENTATION PRODUCT

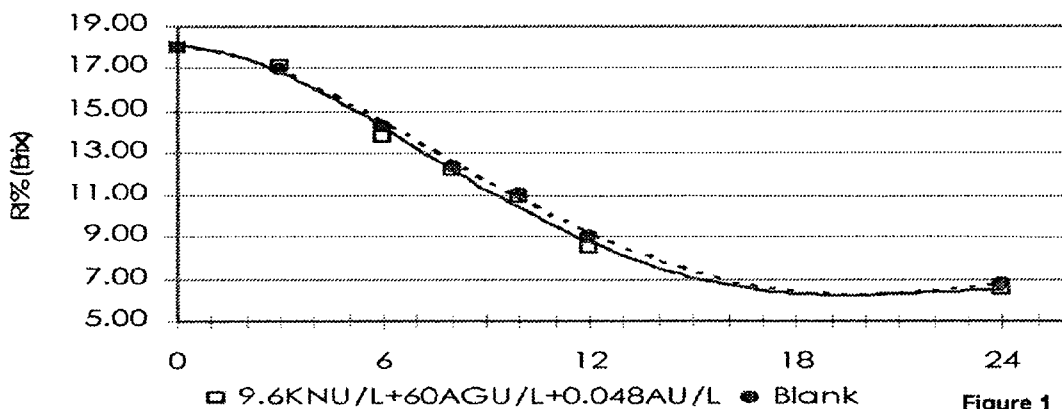


Figure 1

(57) Abstract: The invention relates to a process for producing a fermentation product from molasses wherein molasses is i) treated with a combination of alpha-amylase and glucoamylase and ii) fermented using one or more fermenting organisms at a cell count in the range from 10^7 - 10^{10} cells/mL fermentation medium.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 April 2009 (16.04.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/049136 A3

(51) International Patent Classification:
C12P 7/08 (2006.01)

(74) Agents: FOX, Jennifer, L. et al.; Novozymes North America, Inc., 500 5th Avenue, Suite 1600, New York, NY 10110 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2008/079490

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 10 October 2008 (10.10.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/979,471 12 October 2007 (12.10.2007) US

(71) Applicants (for all designated States except US): NOVOZYMES A/S [DK/DK]; Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd (DK). NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. [US/US]; 77 Perry Chapel Church Road, P.O. Box 576, Franklinton, NC 27525 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

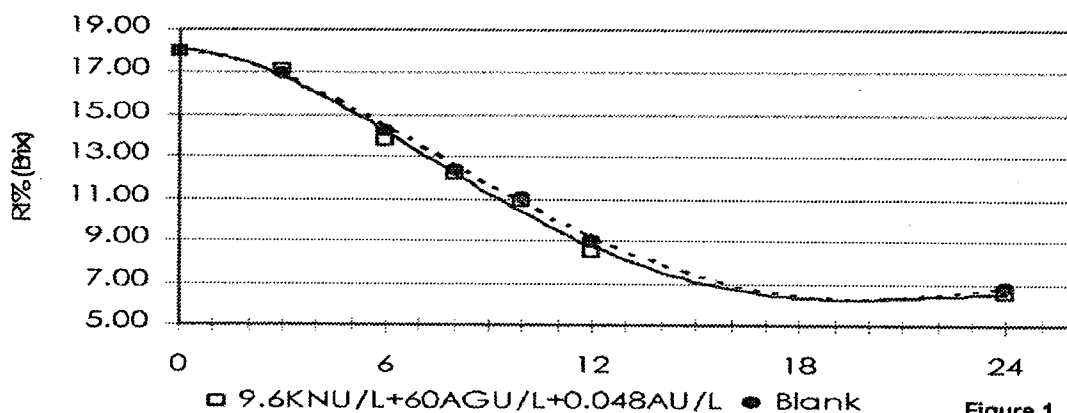
(75) Inventors/Applicants (for US only): BORDIN, Eder, Manzini [BR/BR]; Av. Dr. Eugenio Bertolli, 3192, Sta Felicidade, 82410-530 Curitiba PR (BR). PEREIRA DE SOUZA, Viviane [BR/BR]; Rua Prefeito Angelo Lopes 162, ap 605, 80050-330 Curitiba-Parana (BR). ORMEROD, Fabiane, Bueno [BR/BR]; Rua Ricardo Lemos, 304, apt 23- Ahu, 84540-030 Curitiba-PR (BR). DE ALAMEIDA JR., Adauto [BR/BR]; Rua Pasteur, 486 - ap 201, 80050-330 Curitiba-Parana (BR).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
4 June 2009

(54) Title: A PROCESS OF PRODUCING A FERMENTATION PRODUCT FROM MOLASSES



(57) Abstract: The invention relates to a process for producing a fermentation product from molasses wherein molasses is i) treated with a combination of alpha-amylase and glucoamylase and ii) fermented using one or more fermenting organisms at a cell count in the range from 10^7 - 10^{10} cells/mL fermentation medium.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/079490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12P7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Week 199502 Thomson Scientific, London, GB; AN 1995-009058 XP002523540 & JP 06 292557 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 21 October 1994 (1994-10-21) abstract ----- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 2009

Date of mailing of the international search report

27/04/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, Ad

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/079490

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIDA K ET AL: "Continuous high-ethanol fermentation from cane molasses by a flocculating yeast" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, SOCIETY OF FERMENTATION TECHNOLOGY, JP, vol. 69, no. 1, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 39-45, XP023573078 ISSN: 0922-338X [retrieved on 1990-01-01] abstract page 39, column 2, last paragraph - page 43, column 2, last paragraph	1,2, 10-13, 20,21
Y	US 4 769 324 A (MACKINTOSH THERESA D [ZA] ET AL) 6 September 1988 (1988-09-06) cited in the application the whole document	1,3,5, 7-13,21
Y	WO 2004/081193 A (BROIN AND ASSOCIATES INC [US]; LEWIS STEVEN M [US]) 23 September 2004 (2004-09-23) page 8, line 4 - page 20, line 13 page 29 - page 30	1-17,21
Y	DATABASE WPI Week 200682 Thomson Scientific, London, GB; AN 2006-811695 XP002523541 & RU 2 283 349 C2 (SIBIRSK PATOKA CO LTD) 10 September 2006 (2006-09-10) abstract	1,14,15
Y	WO 96/13600 A (GENENCOR INT [US]; NOORDAM BERTUS [NL]) 9 May 1996 (1996-05-09) cited in the application	1
A	page 1, line 5 - line 10 page 2, line 4 - page 5, line 31	14,15
Y	WO 2004/080923 A (NOVOZYMES AS [DK]) 23 September 2004 (2004-09-23) page 2 - page 10 page 19 - page 25	1,14,15, 18,19
Y	DATABASE WPI Week 198143 Thomson Scientific, London, GB; AN 1981-79122D XP002523542 & SU 800 185 B (FERMENTATION PRODS) 30 January 1981 (1981-01-30) abstract	1,15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/079490

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAJAFPOUR GHASEM D ET AL: "Enzymatic hydrolysis of molasses" BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 86, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 91-94, XP002523539 ISSN: 0960-8524 abstract page 94, column 2	1,15,20
Y	PATIL S G ET AL: "Acceleration of ethanol production activity of yeast in cane molasses fermentation by the addition of fungal mycelium" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 12, no. 2, 1 February 1990 (1990-02-01), pages 141-148, XP023678694 ISSN: 0141-0229 [retrieved on 1990-02-01] abstract	1
Y	US 6 187 576 B1 (SVENDSEN ALLAN [DK] ET AL) 13 February 2001 (2001-02-13) cited in the application abstract	1,15
P,X	WO 2007/124503 A (FAHRENTHOLD MICHAEL CHARLES [US]; FAHRENTHOLD PAUL DAVID [US]) 1 November 2007 (2007-11-01) paragraph [0015] - paragraph [0023] paragraph [0048] - paragraph [0091]	1,3-17, 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/079490

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 6292557	A	21-10-1994	JP 3260896 B2	25-02-2002
US 4769324	A	06-09-1988	AU 585554 B2	22-06-1989
			AU 5090085 A	19-06-1986
			BR 8506166 A	26-08-1986
			IN 165765 A1	06-01-1990
			JP 61139395 A	26-06-1986
WO 2004081193	A	23-09-2004	AU 2004219649 A1	23-09-2004
			BR PI0408215 A	14-02-2006
			CA 2517920 A1	23-09-2004
			CN 1780560 A	31-05-2006
			EP 1603406 A2	14-12-2005
			MX PA05009553 A	17-03-2006
			ZA 200507013 A	31-01-2007
RU 2283349	C2	10-09-2006	NONE	
WO 9613600	A	09-05-1996	AU 4013295 A	23-05-1996
			CA 2203811 A1	09-05-1996
			FI 971781 A	25-04-1997
WO 2004080923	A	23-09-2004	CN 1788083 A	14-06-2006
			DE 04718914 T1	23-02-2006
			EP 1604019 A2	14-12-2005
			ES 2245621 T1	16-01-2006
SU 800185	B	30-01-1981	NONE	
US 6187576	B1	13-02-2001	NONE	
WO 2007124503	A	01-11-2007	US 2007249030 A1	25-10-2007

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 11283.204-WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2008/079490	International filing date (day/month/year) 10/10/2008	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 12/10/2007
Applicant NOVOZYMES A/S		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the International search was carried out on the basis of:

- ☒ the International application in the language in which it was filed
☐ a translation of the International application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of International search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This International search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

A PROCESS OF PRODUCING A FERMENTATION PRODUCT FROM MOLASSES

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
 b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/079490

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12P7/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE WPI Week 199502 Thomson Scientific, London, GB; AN 1995-009058 XP002523540 & JP 06 292557 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 21 October 1994 (1994-10-21) abstract ----- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 2009

Date of mailing of the international search report

27/04/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, Ad

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/079490

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIDA K ET AL: "Continuous high-ethanol fermentation from cane molasses by a flocculating yeast" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, SOCIETY OF FERMENTATION TECHNOLOGY, JP, vol. 69, no. 1, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 39-45, XP023573078 ISSN: 0922-338X [retrieved on 1990-01-01] abstract page 39, column 2, last paragraph - page 43, column 2, last paragraph	1,2, 10-13, 20,21
Y	US 4 769 324 A (MACKINTOSH THERESA D [ZA] ET AL) 6 September 1988 (1988-09-06) cited in the application the whole document	1,3,5, 7-13,21
Y	WO 2004/081193 A (BROIN AND ASSOCIATES INC [US]; LEWIS STEVEN M [US]) 23 September 2004 (2004-09-23) page 8, line 4 - page 20, line 13 page 29 - page 30	1-17,21
Y	DATABASE WPI Week 200682 Thomson Scientific, London, GB; AN 2006-811695 XP002523541 & RU 2 283 349 C2 (SIBIRSK PATOKA CO LTD) 10 September 2006 (2006-09-10) abstract	1,14,15
Y	WO 96/13600 A (GENENCOR INT [US]; NOORDAM BERTUS [NL]) 9 May 1996 (1996-05-09) cited in the application page 1, line 5 - line 10 page 2, line 4 - page 5, line 31	1 14,15
Y	WO 2004/080923 A (NOVOZYMES AS [DK]) 23 September 2004 (2004-09-23) page 2 - page 10 page 19 - page 25	1,14,15, 18,19
Y	DATABASE WPI Week 198143 Thomson Scientific, London, GB; AN 1981-79122D XP002523542 & SU 800 185 B (FERMENTATION PRODS) 30 January 1981 (1981-01-30) abstract	1,15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2008/079490

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAJAFPOUR GHASEM D ET AL: "Enzymatic hydrolysis of molasses" BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 86, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 91-94, XP002523539 ISSN: 0960-8524 abstract page 94, column 2	1,15,20
Y	PATIL S G ET AL: "Acceleration of ethanol production activity of yeast in cane molasses fermentation by the addition of fungal mycelium" ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 12, no. 2, 1 February 1990 (1990-02-01), pages 141-148, XP023678694 ISSN: 0141-0229 [retrieved on 1990-02-01] abstract	1
Y	US 6 187 576 B1 (SVENDSEN ALLAN [DK] ET AL) 13 February 2001 (2001-02-13) cited in the application abstract	1,15
P,X	WO 2007/124503 A (FAHRENTHOLD MICHAEL CHARLES [US]; FAHRENTHOLD PAUL DAVID [US]) 1 November 2007 (2007-11-01) paragraph [0015] - paragraph [0023] paragraph [0048] - paragraph [0091]	1,3-17, 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/079490

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 6292557	A	21-10-1994	JP 3260896 B2	25-02-2002
US 4769324	A	06-09-1988	AU 585554 B2	22-06-1989
			AU 5090085 A	19-06-1986
			BR 8506166 A	26-08-1986
			IN 165765 A1	06-01-1990
			JP 61139395 A	26-06-1986
WO 2004081193	A	23-09-2004	AU 2004219649 A1	23-09-2004
			BR PI0408215 A	14-02-2006
			CA 2517920 A1	23-09-2004
			CN 1780560 A	31-05-2006
			EP 1603406 A2	14-12-2005
			MX PA05009553 A	17-03-2006
			ZA 200507013 A	31-01-2007
RU 2283349	C2	10-09-2006	NONE	
WO 9613600	A	09-05-1996	AU 4013295 A	23-05-1996
			CA 2203811 A1	09-05-1996
			FI 971781 A	25-04-1997
WO 2004080923	A	23-09-2004	CN 1788083 A	14-06-2006
			DE 04718914 T1	23-02-2006
			EP 1604019 A2	14-12-2005
			ES 2245621 T1	16-01-2006
SU 800185	B	30-01-1981	NONE	
US 6187576	B1	13-02-2001	NONE	
WO 2007124503	A	01-11-2007	US 2007249030 A1	25-10-2007

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2008/079490

International filing date (day/month/year)
10.10.2008

Priority date (day/month/year)
12.10.2007

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C12P708

Applicant
NOVOZYMES AS

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
Gitschiner Str. 103
D-10958 Berlin
Tel. +49 30 25901 - 0
Fax: +49 30 25901 - 840

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

De Kok, Ad

Telephone No. +49 30 25901-314



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/079490

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2008/079490

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-21</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and /or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V.

1. Reference is made to the following documents:

- D1 : DATABASE WPI Week 199502, Thomson Scientific, London, GB; AN 1995-009058 &; JP 06 292557 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 21 October 1994 (1994-10-21)
- D2 : KIDA K ET AL: JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, SOCIETY OF FERMENTATION TECHNOLOGY, JP, vol. 69, no. 1, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 39-45,
- D3 : US 4 769 324 A (MACKINTOSH THERESA D [ZA] ET AL) 6 September 1988 (1988-09-06)
- D4 : WO 2004/081193 A (BROIN AND ASSOCIATES INC [US]; LEWIS STEVEN M [US]) 23 September 2004 (2004-09-23)
- D5 : DATABASE WPI Week 200682, Thomson Scientific, London, GB; AN 2006-811695&; RU 2 283 349 C2 (SIBIRSK PATOKA CO LTD) 10 September 2006 (2006-09-10)
- D6 : WO 96/13600 A (GENENCOR INT [US]; NOORDAM BERTUS [NL]) 9 May 1996 (1996-05-09)
- D7 : WO 2004/080923 A (NOVOZYMES AS [DK]) 23 September 2004 (2004-09-23)
- D8 : DATABASE WPI Week 198143, Thomson Scientific, London, GB; AN 1981-79122D &; SU 800 185 B (FERMENTATION PRODS) 30 January 1981 (1981-01-30)
- D9 : NAJAFPOUR GHASEM D ET AL: BIORESOURCE TECHNOLOGY, vol. 86, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 91-94,
- D10 : PATIL S G ET AL: ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, STONEHAM, MA, US, vol. 12, no. 2, 1 February 1990 (1990-02-01), pages 141-148,
- D11 : US 6 187 576 B1 (SVENDSEN ALLAN [DK] ET AL) 13 February 2001 (2001-02-13).

2. Novelty and inventive step (Articles 33(2) and (3) PCT):

- 2.1 Document D1, which is considered to represent the most relevant state of the art to the subject matter of claim 1, discloses (see abstract) the fermentation of

molasses with yeast (*S. cerevisiae*) and an enzyme mix from *A. oryzae* comprising amylase, glucoamylase and protease.

The subject-matter of independent claim 1 differs from the disclosure of D1 in that in that the cell density of the yeast cells is defined.

Thus the subject-matter of **claims 1-21** is novel.

- 2.2 The technical effect of the difference identified above cannot be derived from the present Application.

On the contrary, the cell density seems to be arbitrarily chosen and for this reason alone has to be considered obvious.

Furthermore, even if we would assume some technical effect, e.g. that this cell density is optimal for fermentation of molasses, then this would be known from D2, which discloses (see abstract and pages 39-43) that the optimal cell density for ethanol fermentation from sugar cane molasses by yeast lies between 63 and 134 million cells/mL, which is in the range defined by claim 1.

Therefore, it is concluded that the subject-matter of **claim 1** lacks inventive step.

- 2.3 Dependent **claims 2-21** do not contain any features which, in combination with the features of claim 1, meet the requirements of the PCT in respect of inventive step, since these features are described in documents D1-D11 (see passages cited in the search report) as providing the same advantages as in the present application.

Re Item VIII.

1. **Clarity, support and disclosure** (Articles 5 and 6 PCT):

The subject-matter of **claim 1**, encompasses **any** fermentation product and **any** fermenting organism, whereas support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT has been given only for **one** product (ethanol) and for **one** organism (yeast).

Thus, said claims are not supported and disclosed over their whole breadth.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.
77 Perry Chapel Church Road
P.O. Box 576
Franklinton, NC 27525
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 31 October 2008 (31.10.2008)	
Applicant's or agent's file reference 11283.204-WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/079490	International filing date (day/month/year) 10 October 2008 (10.10.2008)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 12 October 2007 (12.10.2007)
Applicant NOVOZYMES A/S et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
12 October 2007 (12.10.2007)	60/979,471	US	27 October 2008 (27.10.2008)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Philippe Becamel e-mail PT12.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 12
---	--

Facsimile No. +41 22 338 82 70

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/079490

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.
500 5th Avenue, Suite 1600
New York, NY 10110
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
17 November 2008 (17.11.2008)Applicant's or agent's file reference
11283.204-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/079490International filing date (day/month/year)
10 October 2008 (10.10.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

NOVOZYMES A/S
Krogshoejvej 36
DK-2880 Bagsvaerd
DenmarkState of Nationality
DKState of Residence
DKTelephone No.
212-840-0097Facsimile No.
212-840-0221E-mail address
Patents-US-NY@novozymes.com

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

All correspondence for the applicant identified in Box 1 should be sent to the address as indicated in the addressee box at the top of this form.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Park Kwang Woon

e-mail pt12.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 12

Facsimile No. +41 22 338 70 90

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/079490

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

FOX, Jennifer, L.
NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.
500 5th Avenue, Suite 1600
New York, NY 10110
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

22 December 2008 (22.12.2008)

Applicant's or agent's file reference

11283.204-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US2008/079490

International filing date (day/month/year)

10 October 2008 (10.10.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant☐ the inventor☒ the agent☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person☐ the name☐ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

FOX, Jennifer, L.
NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.
500 5th Avenue, Suite 1600
New York, NY 10110
United States of America

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

212-840-0097

Facsimile No.

212-840-0221

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☒ the International Searching Authority☐ the International Preliminary Examining Authority☐ the designated Offices concerned☐ the elected Offices concerned☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Park Kwang Woon

e-mail pt12.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 12

Facsimile No. +41 22 338 70 90

88



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-048736- -00000-0000

ES

Fecha: 2010-04-26 15:54:52 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 87

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT .
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D' ALEMAN DILIA MARIA
Apoderado(a) y/o Representante de
NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC

REFERENCIA	Radicación No.	10 048736
	Solicitud internacional	PCT/US2008/079490
	Fecha inicio fase nacional	12/05/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	<u>06418</u>

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)
3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

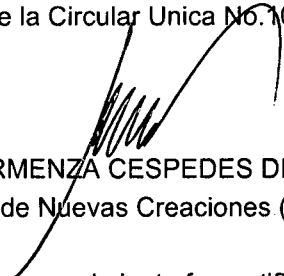
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 048736

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No. 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 14 MAYO 2010.
adpa11