



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 991**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)	C12P 7/10 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)	C12P 7/20 (2006.01)
C12P 7/44 (2006.01)	C12P 7/56 (2006.01)
C12P 7/58 (2006.01)	C12P 7/60 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03707738 .5**

96 Fecha de presentación : **06.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1581617**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54

Título: **Procedimientos para producir productos finales a partir de sustratos de carbono.**

30

Prioridad: **08.02.2002 US 355260 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2011

73

Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US
DANISCO US Inc.

72

Inventor/es: **Chotani, Gopal, K.;**
Kumar, Manoj;
Pucci, Jeff, P.;
Sanford, Karl, J. y
Shetty, Jayarama, K.

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 358 991 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para producir productos finales a partir de sustratos de carbono

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención proporciona medios para la producción de láctico y a partir de almidón granular. Los procedimientos de la presente invención no requieren gelatinización ni licuefacción del sustrato.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Las fermentaciones industriales usan predominantemente glucosa como materia prima para la producción de proteínas, enzimas y productos químicos. Estas fermentaciones son normalmente discontinuas, alimentadas discontinuas o continuas y operan bajo condiciones limitadas por sustrato y formadoras de subproductos mínimos. Éstas son condiciones de operación críticas que deben controlarse durante la fermentación con el fin de optimizar el tiempo, el rendimiento y la eficiencia de fermentación. Los procedimientos y materias primas actualmente usados tienen inconvenientes que reducen la eficiencia de los procedimientos de fermentación.

[0003] La glucosa es un compuesto natural basado en carbono que es útil en una multitud de aplicaciones sintéticas químicas y biológicas como sustrato de partida. Sin embargo, los jarabes que contienen niveles de pureza de glucosa superiores al 90% son relativamente caros. Además, la presencia de altas concentraciones de glucosa aumenta la susceptibilidad del sistema de fermentación a contaminación microbiana, produciéndose así un efecto adverso sobre la eficiencia de producción. Otra desventaja es que incluso la presencia de niveles bajos a moderados de glucosa en la fermentación puede afectar adversamente la conversión de la glucosa en el producto final deseado, por ejemplo, por inhibición enzimática y/o represión de catabolitos, y/o el crecimiento de microorganismos. Como resultado se ha intentado reducir los costes de la fermentación industrial, particularmente en la utilización de sustratos menos caros que la glucosa. Sin embargo, a pesar del desarrollo de numerosos enfoques, sigue existiendo una necesidad en la materia sustratos económicos utilizados eficazmente para la fermentación. De hecho, hay una gran necesidad en la materia de procedimientos que utilicen un material de partida menos caro que la glucosa para producir más eficazmente un producto final deseado.

Resumen de la invención

[0004] La invención proporciona un procedimiento para producir ácido láctico que comprende:
35 poner en contacto una suspensión que comprende almidón granular con una glucoamilasa que puede hidrolizar tanto los enlaces glucosídicos lineales como ramificados del almidón, una alfa-amilasa y un *Lactobacillus* productor de lactato en un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneo; en el que dicho almidón no está sometido a licuefacción ni gelatinización.

[0005] El almidón granular puede derivarse de trigo, cebada, boniato, tapioca, grano, maíz, mandioca, sorgo, centeno, salvado o arroz.

[0006] La alfa-amilasa puede ser de una especie de *Bacillus*, por ejemplo, de *Bacillus licheniformis*, o puede ser de un organismo diferente tal como *Aspergillus oryzae*.

[0007] La glucoamilasa puede ser de una especie *Humicola* o *Rhizopus*.

[0008] El *Lactobacillus* puede ser *Lactobacillus amylovorus*.

[0009] En ciertas realizaciones, tanto la glucoamilasa como la alfa-amilasa pueden ser de *Rhizopus*.

[0010] La suspensión que comprende el almidón granular puede someterse a pasteurización a 65°C antes de ponerse en contacto con la enzima hidrolizante de almidón.

[0011] El pH del medio puede ser pH 5,0 a 9,0.

[0012] La fermentación puede tener lugar a un intervalo de temperatura de 25°C a 35°C.

[0013] El almidón granular puede estar presente en la suspensión en una concentración del 10% al 35% en

peso/volumen.

[0014] El procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de recuperar el ácido láctico producido.

5 Descripción de las figuras

[0015] La Figura 1 proporciona una gráfica que muestra la bioconversión de almidón granular en glucosa y lactato.

10 Descripción de la invención

[0016] Hay una gran necesidad en la materia de procedimientos en los que se usen materiales de partida menos caros que la glucosa para producir eficientemente ácido láctico. Como se describe en mayor detalle en este documento, la presente invención proporciona procedimientos que usan almidón (por ejemplo, almidón de grano y de trigo) como sustrato.

[0017] El almidón es una fuente de carbono para la fermentación basada en plantas. El almidón de grano y el almidón de trigo son fuentes de carbono que son mucho más baratas que la materia prima de carbono glucosa para la fermentación. La conversión de almidón licuado en glucosa se conoce en la técnica y se lleva a cabo generalmente usando enzimas tales como alfa-amilasa, pululanasa y glucoamilasa. Se ha descrito un gran número de procedimientos para convertir almidón licuado en el monosacárido, la glucosa. La glucosa tiene valor propio y también como precursor para otros sacáridos tales como fructosa. Además, la glucosa también puede fermentarse a etanol u otros productos de fermentación. Sin embargo, la capacidad de la conversión enzimática de una primera fuente de carbono en el producto intermedio, especialmente la glucosa, puede alterarse por la presencia del producto intermedio.

[0018] Por ejemplo, los procedimientos típicos usados en la fabricación de sake japonés y la producción de alcohol usan almidón sin cocción. Sin embargo, estas técnicas requieren algunas operaciones especiales tales como acidificación del mosto (pH 3,5), que evita la contaminación de microorganismos perjudiciales. Además, estos procedimientos requieren un periodo de tiempo más largo para la sacarificación y fermentación que la presente invención. Además, estos procedimientos requieren complejas etapas de procedimiento tales como diálisis de un caldo fermentado y son demasiado enrevesadas como para utilizarlas en la producción general de productos mediante fermentación.

[0019] El uso de dextrinas solubles y glucosa como materia prima en fermentaciones tiene diversos inconvenientes que incluyen alto coste de procesamiento y problemas asociados con la viscosidad y la transferencia de oxígeno. Además, en comparación con la presente invención, estos procedimientos producen menores rendimientos de los productos deseados y más problemas asociados a la formación de subproductos. De hecho, los costes de convertir almidón o biomasa en dextrinas son sustanciales e implican un alto aporte de energía, tanques de reactor separados, más tiempo, una operación de bioproceso detallada, sacarificación incompleta, reacción inversa y enzimas asociadas a la etapa de sacarificación previa a la fermentación típica. Estos problemas han llevado a varios intentos por proporcionar procedimientos para la conversión directamente en almidón dentro de un recipiente de reacción o recipiente y a menores temperaturas. La biotransformación de una fuente de hidrato de carbono en 1,3-propanodiol en cultivos mixtos se describe en la patente de EE.UU. nº 5.599.689 (Haynie y col.). El procedimiento descrito por Haynie y col. implica mezclar un organismo productor de glicerol (es decir, un producto intermedio) con un organismo productor de diol (es decir, un producto final), poner en contacto el medio de cultivo mixto con un sustrato de carbono e incubar el medio de cultivo mixto para producir el producto final deseado, el 1,3-propanodiol. En la patente de EE.UU. nº 4.514.496 Yoshizuma describe procedimientos que implican mantener la concentración del material de partida en la suspensión con respecto al líquido de maceración para producir alcohol por fermentación sin cocción (es decir, sin licuefacción a alta temperatura antes de la sacarización). Sin embargo, estos procedimientos carecen de la eficiencia y ventajas económicas proporcionadas por la presente invención.

Definiciones

[0020] A menos que se defina de otro modo en este documento, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Diversas referencias (véanse, por ejemplo, Singleton y col., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2ª ED., John Wiley and Sons, Nueva York [1994]; y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY*, Harper Perennial, NY [1991]) proporcionan

definiciones generales de muchos de los términos usados en este documento.

5 **[0021]** Aunque en la práctica de la presente invención se usa cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en este documento, los procedimientos y materiales preferidos se describen en este documento. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de otro modo, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente. Debe entenderse que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos, ya que éstos pueden variar.

10 **[0022]** Los encabezamientos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que pueden tomarse por referencia a la memoria descriptiva como un todo. Además, los términos definidos inmediatamente más adelante se definen más completamente mediante referencia a la memoria descriptiva como un todo.

15 **[0023]** Como se usa en este documento, el término "sustrato de carbono" se refiere a un material que contiene al menos un átomo de carbono que puede convertirse enzimáticamente en un producto intermedio para su posterior conversión en el producto final de carbono deseado. Sustratos de carbono a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, biomasa, almidones, dextrinas y azúcares.

20 **[0024]** Como se usa en este documento, "biomasa" se refiere a materiales de partida que contienen celulosa y/o almidón que incluyen, pero no se limitan a, astillas de madera, hojas y tallos de maíz, arroz, pastos, forrajes, pasto perrie, patatas, tubérculos, raíces, maíz molido entero, mazorcas, granos, trigo, cebada, centeno, sorgo, salvados, cereales, materiales de partida que contienen azúcares (por ejemplo, melazas, materiales de fruta, caña de azúcar o remolachas azucareras), madera y residuos de plantas. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún material particular usado como biomasa. En realizaciones preferidas de la presente invención, los materiales de partida son materiales de partida que contienen almidón (por ejemplo, mazorcas, maíces molidos enteros, maíces, granos, sorgo y/o cereales, y mezclas de los mismos). En realizaciones particularmente preferidas, el término se refiere a cualquier material que contiene almidón originalmente obtenido a partir de cualquier fuente vegetal.

25 **[0025]** Como se usa en este documento, "almidón" se refiere a cualquier material que contiene almidón. En particular, el término se refiere a diversos materiales basados en plantas que incluyen, pero no se limitan a, trigo, cebada, patata, boniato, tapioca, grano, maíz, mandioca, sorgo, centeno y salvados. De hecho, no se pretende que la presente invención se limite a ningún tipo y/o fuente particular de almidón. En general, el término se refiere a cualquier material comprendido por los complejos hidratos de carbono de polisacáridos de plantas, comprendidos por amilosa y amilopectina, con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$ en la que "x" puede ser cualquier número.

30 **[0026]** Como se usa en este documento, "celulosa" se refiere a cualquier material que contiene celulosa. En particular, el término se refiere al polímero de glucosa (o "celobiosa") con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$ en la que "x" puede ser cualquier número. La celulosa es el constituyente principal de las paredes de las células vegetales y está entre las sustancias orgánicas más abundantes en la naturaleza. Mientras que en la celulosa hay un enlace de β -glucósido, en el almidón hay un enlace de α -glucósido. En combinación con lignina, la celulosa forma "lignocelulosa".

35 **[0027]** Como se usa en este documento, "producto intermedio" se refiere a un compuesto que contiene al menos un átomo de carbono en el que los sustratos de carbono se convierten enzimáticamente. Productos intermedios a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, pentosas (por ejemplo, xilosa, arabinosa, lixosa, ribosa, ribulosa, xilulosa); hexosas (por ejemplo, glucosa, alosa, altrosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, psicosa, fructosa, sorbosa y tagatosa); y ácidos orgánicos de las mismas.

40 **[0028]** Como se usa en este documento, el término "conversión enzimática" se refiere a la modificación de un sustrato de carbono en un producto intermedio o la modificación de un producto intermedio en un producto final poniendo en contacto el sustrato o producto intermedio con una enzima. En algunas realizaciones, el contacto se hace exponiendo directamente el sustrato o producto intermedio a la enzima apropiada. En otras realizaciones, la puesta en contacto comprende exponer el sustrato o producto intermedio a un organismo que expresa y/o secreta la enzima y/o metaboliza el sustrato y/o producto intermedio deseado en el producto intermedio deseado y/o producto final, respectivamente.

[0029] Como se usa en este documento, el término “enzima hidrolizante de almidón” se refiere a cualquier enzima que puede convertir almidón en el azúcar intermedio (por ejemplo, una hexosa o pentosa).

5 **[0030]** Como se usa en este documento, “monosacárido” se refiere a cualquier compuesto que tiene una fórmula empírica $(CH_2O)_n$ en la que n es 3 - 7, y preferentemente 5 - 7. En algunas realizaciones, el término se refiere a “azúcares simples” que consisten en una única unidad de polihidroxialdehído o cetona. El término engloba, pero no se limita a, compuestos tales como glucosa, galactosa y fructosa.

10 **[0031]** Como se usa en este documento, “disacárido” se refiere a cualquier compuesto que comprende dos unidades de monosacáridos covalentemente unidas. El término engloba, pero no se limita a, compuestos tales como sacarosa, lactosa y maltosa.

15 **[0032]** Como se usa en este documento, “oligosacárido” se refiere a cualquier compuesto que tiene 2 - 10 unidades de monosacáridos unidas en enlaces glicosídicos. En algunas realizaciones preferidas, el término se refiere a cadenas cortas de unidades de monosacáridos unidas juntas por enlaces covalentes.

20 **[0033]** Como se usa en este documento, “polisacárido” se refiere a cualquier compuesto que tiene múltiples unidades de monosacáridos unidas en una cadena lineal o ramificada. En algunas realizaciones preferidas, el término se refiere a cadenas largas con cientos o miles de unidades de monosacáridos. Algunos polisacáridos tales como la celulosa tienen cadenas lineales, mientras que otros (por ejemplo, el glucógeno) tienen cadenas ramificadas. Entre los polisacáridos más abundantes están el almidón y la celulosa que consisten en unidades de glucosa recurrentes (aunque estos compuestos se diferencian en cómo están unidas las unidades de glucosa).

25 **[0034]** Como se usa en este documento, “cultivar” se refiere a la bioconversión fermentativa de un sustrato de carbono en el producto final deseado (normalmente dentro de un recipiente de reacción). En realizaciones particularmente preferidas, cultivar implica el crecimiento de microorganismos bajo condiciones adecuadas para la producción del (de los) producto(s) final(es) deseado(s).

30 **[0035]** Como se usa en este documento, el término “sacarificación” se refiere a convertir un polisacárido directamente inservible en una materia prima de azúcar útil para la bioconversión o bioconversión fermentativa.

35 **[0036]** Como se usa en este documento, el término “fermentación” se refiere a la rotura enzimática y anaerobia de sustancias orgánicas por microorganismos para producir productos orgánicos más simples. En realizaciones preferidas la fermentación se refiere a la utilización de hidratos de carbono por microorganismos (por ejemplo, bacterias) que implica un procedimiento metabólico de oxidación-reducción que tiene lugar en condiciones anaerobias y en el que un sustrato orgánico sirve de aceptor de hidrógeno final (es decir, en vez de oxígeno). Aunque la fermentación se produce en condiciones anaerobias, no se pretende que el término se limite únicamente a condiciones estrictamente anaerobias, ya que la fermentación también se produce en presencia de oxígeno.

40 **[0037]** Como se usa en este documento, los términos “consumido sustancialmente todo” y “bioconvertido sustancialmente todo” se refieren al mantenimiento de un bajo nivel de producto intermedio en un medio de conversión que afecta adversamente la inhibición enzimática, transferencia de oxígeno, rendimiento, minimización de subproductos y/o efectos de represión de catabolitos del producto intermedio (por ejemplo, una hexosa) sobre la capacidad de la enzima convertora de producto intermedio para convertir el producto intermedio en el producto final u otro producto intermedio y/o la capacidad de la enzima convertora de sustrato para convertir el sustrato en el producto intermedio.

45 **[0038]** Como se usa en este documento, los términos “bioconversión” y “bioconvertido” se refieren a poner en contacto un microorganismo con el sustrato de carbono o producto intermedio en condiciones tales que el sustrato de carbono o producto intermedio se convierta en el producto intermedio o producto final deseado, respectivamente. En algunas realizaciones, estos términos se usan para describir la producción de otro producto intermedio interviniente en procedimientos *in vitro* en los que sólo se usan biocatalizadores. En algunas realizaciones preferidas, los términos engloban metabolismo por microorganismos y/o expresión o secreción de enzima(s) que alcanzan la conversión deseada.

55 **[0039]** Como se usa en este documento, los términos “medios de conversión” y “medio de conversión” se refieren a el medio/los medios en el/los que las enzimas y el sustrato de carbono, producto intermedio y productos finales se ponen en contacto entre sí. Estos términos incluyen, pero no se limitan a, medios de fermentación, medios orgánicos y/o acuosos que disuelven o suspenden de otro modo las enzimas y el sustrato de carbono, producto

intermedio y productos finales. En algunas realizaciones, los medios son complejos, mientras que en otras realizaciones preferidas los medios son definidos.

5 **[0040]** Como se usa en este documento, el término “producto final” se refiere a cualquier producto de moléculas derivado de fuentes de carbono que se convierte enzimáticamente a partir del producto intermedio. En realizaciones particularmente preferidas, los procedimientos de la presente invención se usan con el fin de producir un “producto final deseado” (es decir, el producto que pretende producirse mediante el uso de estos procedimientos).

10 **[0041]** Como se usa en este documento, “baja concentración” se refiere a un nivel de concentración de un compuesto que es inferior al que produciría la producción de efectos perjudiciales debido a la presencia del compuesto. En realizaciones particularmente preferidas, el término se usa en referencia a la concentración de un producto intermedio particular por debajo de la cual se observan los efectos perjudiciales de supresión de catabolitos y/o inhibición de enzimas. En algunas realizaciones, el término se refiere al nivel de concentración de un producto intermedio particular por encima del cual se desencadena la represión de catabolitos y/o la inhibición de enzimas por el sustrato y/o los productos.

15 **[0042]** Como se usa en este documento, la frase “mantenida a un nivel por debajo de la cual desencadena los efectos de represión de catabolitos” se refiere a mantener la concentración de un producto intermedio por debajo del nivel que desencadena la represión de catabolitos.

20 **[0043]** Como se usa en este documento, el término “reduce la represión de catabolitos” significa condiciones bajo las cuales se producen los efectos de represión de catabolitos. En realizaciones preferidas, el término se refiere a condiciones en las que la concentración de producto intermedio es inferior al umbral que desencadena efectos represivos de catabolitos.

25 **[0044]** Como se usa en este documento, el término “reduce la inhibición de enzimas” significa condiciones bajo las cuales se reduce la inhibición de una enzima con respecto a la inhibición de la enzima bajo condiciones estándar usuales. En realizaciones preferidas de la presente invención, el término se refiere a condiciones en las que la concentración de un producto intermedio, sustrato y/o producto de la reacción enzimática es inferior al umbral que desencadena una inhibición de enzimas.

30 **[0045]** Como se usa en este documento, el término “enzima convertora de sustrato” se refiere a cualquier enzima que convierte el sustrato (por ejemplo, almidón granular) en un producto intermedio, (por ejemplo, glucosa). Las enzimas convertoras de sustrato incluyen, pero no se limitan a, alfa-amilasas, glucoamilasas, pululanasa, enzimas hidrolizantes de almidón y diversas combinaciones de las mismas.

35 **[0046]** Como se usa en este documento, el término “enzima convertora de producto intermedio” se refiere a cualquier enzima que convierte un producto intermedio (por ejemplo, D-glucosa, D-fructosa, etc.) en el producto final deseado. En realizaciones preferidas, esta conversión se lleva a cabo mediante hidrólisis, mientras que en otras realizaciones la conversión implica el metabolismo del producto intermedio en el producto final por un microorganismo. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a alguna enzima particular o medios de conversión. De hecho, se pretende que cualquier enzima apropiada se use en las diversas realizaciones de la presente invención.

40 **[0047]** Como se usa en este documento, “rendimiento” se refiere a la cantidad de producto final o producto intermedio producida usando los procedimientos de la presente invención. En algunas realizaciones preferidas, el rendimiento producido usando los procedimientos de la presente invención es mayor que el producido usando los procedimientos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el rendimiento se refiere al volumen del producto final o producto intermedio, mientras que en otras realizaciones el término se usa en referencia a la concentración de producto final o producto intermedio en una composición.

45 **[0048]** Como se usa en este documento, el término “transferencia de oxígeno” se refiere a tener suficiente oxígeno disuelto en la bioconversión y/o medio de bioconversión fermentativa transferido de la fase gaseosa a un medio líquido de forma que no sea una etapa limitante de la velocidad.

50 **[0049]** Como se usa en este documento, “formación de subproductos” se refiere a la producción de productos que no son deseados. En algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona procedimientos que

evitan o reducen la producción de subproductos en comparación con procedimientos conocidos en la técnica.

5 **[0050]** Como se usa en este documento, el término “inhibición enzimática” se refiere a la pérdida de actividad enzimática por tanto efectos físicos como bioquímicos sobre la enzima. En algunas realizaciones, la inhibición resulta de efectos del producto formado por la actividad enzimática, mientras que en otras realizaciones la inhibición resulta de la acción del sustrato o producto intermedio sobre la enzima.

10 **[0051]** Como se usa en este documento, “actividad enzimática” se refiere a la acción de una enzima sobre su sustrato. En algunas realizaciones, la actividad enzimática se cuantifica usando medios para determinar la conversión del sustrato en el producto intermedio, mientras que en otras realizaciones se determina la conversión del sustrato en el producto final, mientras que en todavía otras realizaciones se determina la conversión del producto intermedio en el producto final.

15 **[0052]** Como se usa en este documento, el término “unidad de enzima” se refiere a la cantidad de enzima que convierte 1 micromol de sustrato por minuto en el producto de sustrato en condiciones de ensayo óptimas (a menos que se establezca de otro modo). En algunas realizaciones, en los procedimientos de la presente invención se usan enzimas comercialmente disponibles (por ejemplo, SPEZYME®, DISTALLASE®, OPTIMAX®; Genencor International).

20 **[0053]** Como se usa en este documento, el término “unidad de glucoamilasa” (UGA) se define como la cantidad de enzima requerida para producir un micromol de glucosa por minuto bajo condiciones de ensayo de 40°C y pH 5,0.

25 **[0054]** Como se usa en este documento, el término “unidad de glucosa oxidasa” (UGO) se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar un micromol de D-glucosa por minuto bajo condiciones de ensayo de 25°C y pH 7,0 a ácido glucónico.

30 **[0055]** Como se usa en este documento, el término “unidades de catalasa” (UC) se define como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1 micromol de peróxido de hidrógeno por minuto bajo condiciones de ensayo de 25°C y pH 7,0.

35 **[0056]** Como se usa en este documento, una unidad de GA (UGA) es la cantidad de enzima que disocia un micromol de maltosa por minuto a 25°C y pH 4,3. En algunas realizaciones de la presente invención se usa una forma líquida de glucoamilasa comercialmente disponible (OPTIDEX® L-400; Genencor International) con una actividad de 400 UGA por ml.

40 **[0057]** Como se usa en este documento, “producto final de carbono” significa cualquier producto de carbono producido a partir del producto intermedio de carbono, en el que el sustrato contiene al menos un átomo de carbono (es decir, un sustrato de carbono).

45 **[0058]** Como se usa en este documento, “producto intermedio de carbono” se refiere a los compuestos que contienen carbono que se producen durante la conversión de un sustrato que contiene carbono en un producto final de carbono.

50 **[0059]** Como se usa en este documento, “enzimáticamente controlado” significa regular la cantidad de producto intermedio de carbono producido a partir del sustrato de carbono alterando la cantidad o la actividad de la enzima usada en la reacción.

55 **[0060]** Como se usa en este documento, “microorganismo” se refiere a cualquier organismo con células que normalmente se considera microscópico que incluye organismos tales como bacterias, hongos (levaduras y mohos), rickettsia y protozoos. No se pretende que la presente invención se limite a ningún microorganismo particular ni a especies de microorganismos ya que diversos microorganismos y enzimas microbianas son adecuados para uso en la presente invención. Tampoco se pretende que la presente invención se limite a microorganismos naturales ya que los microorganismos y las enzimas microbianas producidos usando tecnologías de ADN recombinante también se usan en la presente invención.

[0061] Como se usa en este documento, “enzima microbiana” se refiere a cualquier enzima que es producida por un microorganismo. Como se usa en este documento, una “enzima microbiana convertidora de producto intermedio” es una enzima que convierte un producto intermedio en un producto final, mientras que una “enzima

microbiana conversora de sustrato” es una enzima que convierte un sustrato en un producto intermedio o directamente convierte un sustrato en un producto final (es decir, no hay compuesto intermedio).

5 **[0062]** Como se usa en este documento, “ácido glucónico” se refiere a un producto oxidativo de glucosa en el que el grupo hidroxilo C6 de glucosa se oxida a un grupo ácido carboxílico.

10 **[0063]** Como se usa en este documento, los términos “productor de ácido glucónico” y “organismo productor de ácido glucónico” se refieren a cualquier organismo o célula que puede producir ácido glucónico mediante el uso de una hexosa o una pentosa. En algunas realizaciones, las células productoras de ácido glucónico contienen una celulasa como enzima conversora de sustrato, y glucosa oxidasa y catalasa para la conversión de los productos intermedios en ácido glucónico.

15 **[0064]** Como se usa en este documento, “productor de glicerol” y “organismo productor de glicerol” se refieren a cualquier organismo o célula que puede producir glicerol. En algunas realizaciones, los organismos productores de glicerol son bacterias aerobias, mientras que en otras realizaciones son bacterias anaerobias. En aún otras realizaciones, los organismos productores de glicerol incluyen microorganismos tales como hongos (es decir, mohos y levadura), algas y otros organismos adecuados.

20 **[0065]** Como se usa en este documento, los términos “productor de diol”, “productor de propanodiol”, “organismo productor de diol” y “organismo productor de propanodiol” se refieren a cualquier organismo que puede producir 1,3-propanodiol utilizando glicerol. Generalmente, las células productoras de diol contienen tanto una enzima diol deshidratasa como una enzima glicerol deshidratasa.

25 **[0066]** Como se usa en este documento, los términos “productor de lactato” y “organismo productor de lactato” y “microorganismo productor de lactato” se refieren a cualquier organismo o célula que puede producir lactato utilizando una hexosa o una pentosa. En algunas realizaciones, los productores de lactato son miembros de los géneros *Lactobacillus* o *Zymomonas*, mientras que en otras realizaciones los organismos son hongos.

30 **[0067]** Como se usa en este documento, los términos “productor de etanol” y “organismo productor de etanol” se refieren a cualquier organismo o célula que puede producir etanol a partir de una hexosa o una pentosa. Generalmente, las células productoras de etanol contienen una alcohol deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa.

35 **[0068]** Como se usa en este documento, los términos “productor del producto intermedio de ácido ascórbico” y “organismo productor del producto intermedio de ácido ascórbico” se refieren a cualquier organismo o célula que puede producir un producto intermedio de ácido ascórbico a partir de una hexosa o una pentosa. Generalmente, las células productoras de etanol contienen una glucosa deshidrogenasa, ácido glucónico deshidrogenasa, 2,5-diceto-D-gluconato reductasa, 2-ceto-D-gluconato reductasa, 2-ceto-reductasa, 5-ceto reductasa, glucoquinasa, gluconocinasa, ribulosa-5-fosfato epimerasa, transcetolasa, transaldolasa, hexocinasa, 2,5-DKG reductasa e/o idonato deshidrogenasa, que dependen del producto intermedio de ácido ascórbico específico deseado.

40 **[0069]** Como se usa en este documento, el término “producto intermedio del producto intermedio de ácido ascórbico” se refiere a cualquiera de los siguientes compuestos: D-gluconato, 2-ceto-D-gluconato (2KDG), 2,5-diceto-D-gluconato (2,5-DKG o 5-DKG), ácido 2-ceto-L-gulónico (2KLG o KLG), ácido L-idónico (IA), ácido eritórbico (EA) y ácido ascórbico (ASA).

45 **[0070]** Como se usa en este documento, “ácido cítrico” se refiere a tener la fórmula $C_6H_8O_7$, comúnmente encontrado en cítricos, remolachas, arándanos y otras frutas ácidas. El término se refiere a ácido cítrico de cualquier fuente, tanto si es natural como sintética, además de a sales y a cualquier otra forma de los ácidos.

50 **[0071]** Como se usa en este documento, “ácido succínico” se refiere al ácido que tiene la fórmula $C_4H_6O_4$ que se encuentra comúnmente en ámbar, algas, líquenes, caña de azúcar, remolachas y otras plantas. Este ácido también se forma durante la fermentación de azúcar, tartratos, malatos y otras sustancias por diversos mohos, levaduras y bacterias. El término se refiere a ácido succínico de cualquier fuente, tanto si es natural como sintética, además de a sales y ésteres ácidos y neutros, y a cualquier otra forma del ácido.

55 **[0072]** Como se usa en este documento, “aminoácido” se refiere a cualquier aminoácido que se produce naturalmente, además de a cualquier aminoácido sintético, incluyendo derivados de aminoácidos.

[0073] Como se usa en este documento, “antimicrobiano” se refiere a cualquier compuesto que destruye o

inhibe el crecimiento de microorganismos (que incluye, pero no se limita a, compuestos antibacterianos).

5 **[0074]** Como se usa en este documento, el término “cultivo ligado” se refiere a un sistema de fermentación que emplea al menos dos cultivos celulares, en el que los cultivos se añaden secuencialmente. En la mayoría de las realizaciones de los sistemas ligados, un cultivo primario o un conjunto de cultivos primarios se cultiva bajo condiciones de fermentación óptimas para la producción de un producto intermedio deseado (es decir, el producto intermedio se libera a los medios de cultivo para producir un “medio acondicionado”). Tras la fermentación del cultivo primario, el medio acondicionado se expone entonces al (a los) cultivo(s) secundario(s). Los cultivos secundarios convierten entonces el producto intermedio en los medios acondicionados en el producto final deseado. En algunas realizaciones de la presente invención, los cultivos primarios son normalmente productores de glicerol y los cultivos secundarios son productores de 1,3-propanodiol.

15 **[0075]** Como se usa en este documento, “cultivo mixto” se refiere a la presencia de cualquier combinación de especies microbianas en un cultivo. En algunas realizaciones preferidas, el cultivo mixto se cultiva en un recipiente de reacción en condiciones tales que la interacción de los procedimientos metabólicos individuales de los organismos combinados produzca un producto que no puede producir ningún organismo individual. No se pretende que la presente invención se limite a cultivos mixtos que comprenden un número particular de especies microbianas.

20 **[0076]** Como se usa en este documento, “medios acondicionados” se refiere a cualquier medio de fermentación adecuado para el crecimiento de microorganismos que ha sido complementado con subproductos orgánicos de crecimiento microbiano. En realizaciones preferidas de la presente invención, los medios acondicionados se producen durante la fermentación de cultivos ligados en los que las células productoras de glicerol secretan glicerol a los medios de fermentación para su posterior conversión en 1,3-propanodiol.

25 **[0077]** Como se usa en este documento, “tasa de consumo de oxígeno” (“TCO”) se refiere a la determinación del consumo específico de oxígeno dentro de un recipiente de reacción. El consumo de oxígeno puede determinarse usando diversas mediciones en línea conocidas en la técnica. En una realización, la TCO (mmol/(litro*hora)) se determina por la siguiente fórmula: ((Caudal de aire (litros fijos por minuto) / peso de fermentación (peso del caldo de fermentación en kilogramos)) X suministro de O₂ X densidad del caldo X (una constante para corregir la calibración del caudal de aire a 21,1°C en lugar de a los 20,0°C estándar)) menos ([caudal de aire / peso de fermentación] x [descarga de gas O₂/ descarga de gas N₂] X suministro de N₂ X densidad del caldo X constante).

35 **[0078]** Como se usa en este documento, “tasa de desprendimiento de carbono” (“TDC”) se refiere a la determinación de cuánto CO₂ se produce dentro de un recipiente de reacción durante la fermentación. Normalmente, como no se proporciona ni inicialmente ni posteriormente CO₂ al recipiente de reacción, se supone que cualquier CO₂ se produce por el procedimiento de fermentación que se produce dentro del recipiente de reacción. “Descarga de gas CO₂” se refiere a la cantidad de CO₂ medida dentro de un recipiente de reacción, normalmente por procedimientos de espectroscopía de masas conocidos en la técnica.

40 **[0079]** Como se usa en este documento, el término “potenciado” se refiere a la producción mejorada de proteínas de interés. En realizaciones preferidas, la presente invención proporciona la producción y secreción potenciada (es decir, mejorada) de una proteína de interés. En estas realizaciones, la producción “potenciada” mejora en comparación con los niveles de producción normales por el huésped (por ejemplo, células naturales). Por tanto, para proteínas heterólogas, básicamente cualquier expresión es potenciada ya que las células normalmente no producen la proteína.

[0080] Como se usa en este documento, los términos “aislado” y “purificado” se refieren a un ácido nucleico o aminoácido que se elimina de al menos un componente al que está naturalmente asociado.

50 **[0081]** Como se usa en este documento, el término “proteína heteróloga” se refiere a una proteína o polipéptido que no se produce naturalmente en una célula huésped. En realizaciones alternativas, la proteína es una proteína o péptido industrial comercialmente importante. Se pretende que el término englobe proteínas que están codificadas por genes que se producen naturalmente, genes mutados y/o genes sintéticos.

55 **Sustratos**

[0082] Durante el desarrollo de la presente invención se obtuvieron buenos resultados con almidón de maíz y almidón de trigo, aunque con la presente invención también se usan otras fuentes que incluyen almidones de granos y tubérculos (por ejemplo, almidón de boniato, patata, arroz y mandioca). Diversos almidones están comercialmente

disponibles. Por ejemplo, están disponibles almidones de maíz de Cerestar, Sigma, y Katayama Chemical Industry Co. (Japón); están disponibles almidones de trigo de Sigma; está disponible almidón de boniato de Wako Pure Chemical Industry Co. (Japón); y está disponible almidón de patata de Nakari Chemical Pharmaceutical Co. (Japón). Un sustrato de carbono particularmente útil es almidón de maíz. En algunas realizaciones de la presente invención se usa almidón granular en una suspensión que tiene un porcentaje de almidón entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 35%. Preferentemente, el almidón está en una concentración entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 35%. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el intervalo para el porcentaje de almidón está entre el 30% y el 32%.

10 Enzimas

[0083] La alfa-amilasa usada en la presente invención es generalmente una enzima que efectúa la escisión aleatoria de enlaces alfa-(1-4) glucosídicos en almidón. En la mayoría de las realizaciones, la alfa-amilasa se elige de entre las enzimas microbianas que tienen un número E. C. E. C. 3.2.1.1 y en particular E. C. 3.2.1.1-3. En algunas realizaciones preferidas, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa bacteriana termoestable. En la mayoría de las realizaciones particularmente preferidas la alfa-amilasa se obtiene o se deriva de especies de *Bacillus*. De hecho, durante el desarrollo de la presente invención se obtuvieron buenos resultados usando la alfa-amilasa SPEZYME® obtenida de *Bacillus licheniformis* (Genencor). En otras realizaciones, en la presente invención se usa la amilasa de carpa negra descrita en procedimientos para la fermentación alcohólica a partir de almidón tal como maíz y mandioca sin precocción (Ueda y col., J. Ferment. Technol., 50:237-242 [1980]; y Ueda y col., J. Ferment. Technol., 58:237-242 [1980]).

[0084] Como es entendido por aquellos expertos en la materia, la cantidad de alfa-amilasa usada en los procedimientos de la presente invención dependerá de la actividad enzimática de la alfa-amilasa y la tasa de conversión de la glucosa generada por el convertidor en producto final. Por ejemplo, generalmente se añade una cantidad entre 0,01 y 1,0 kg de SPEZYME® FRED (Genencor) a una tonelada métrica de almidón. En algunas realizaciones, la enzima se añade en una cantidad entre 0,4 y 0,6 kg, mientras que en otras realizaciones se añade en una cantidad entre 0,5 y 0,6 kg de SPEZYME® FRED/ tonelada métrica de almidón.

[0085] En realizaciones preferidas de la presente invención, la glucoamilasa es una enzima que elimina unidades de glucosa sucesivas de los extremos no reductores del almidón. La enzima puede hidrolizar tanto los enlaces glucosídicos lineales como ramificados de almidón, amilosa y amilopectina. En la mayoría de las realizaciones, la glucoamilasa usada en los procedimientos de la presente invención son enzimas microbianas. En algunas realizaciones preferidas, la glucoamilasa es una glucoamilasa fúngica termoestable tal como la glucoamilasa de *Aspergillus*. De hecho, durante el desarrollo de la presente invención se obtuvieron buenos resultados usando la glucoamilasa DISTALLASE® derivada de *Aspergillus niger* (Genencor). Las preparaciones de glucoamilasa de *Aspergillus niger* también se han usado sin usar precocción (véase Ueda y col., Biotechnol. Bioeng., 23:291 [1981]). Se han separado selectivamente tres glucoamilasas de *Aspergillus awamori* var. *kawachi* para uso en la hidrólisis de almidón (véase Hayashida, Agr. Biol. Chem., 39:2093-2099 [1973]). También se ha descrito la fermentación alcohólica de boniato por glucoamilasa de *Endomycopsis fibuligoeu* sin cocción (Saha y col., Biotechnol. Bioeng., 25:1181-1186 [1983]). Otra enzima que se usa en la presente invención es la glucoamilasa (EC 3.2.1.3), una enzima que hidroliza la cadena de alfa-1,4-glucósido progresivamente a partir del extremo terminal no reductor. Esta enzima también hidroliza la cadena de alfa-1,6-glucósido. La glucoamilasa es secretada por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Mucor* también se usan en los procedimientos de la presente invención. Estas enzimas se usan adicionalmente en la producción de glucosa y la determinación cuantitativa de glucógeno y almidón. Las preparaciones de glucoamilasa obtenidas de *E. fibuligera* (IFO 0111) se han usado para poner en contacto almidón de boniato bruto para la fermentación alcohólica (véase Saha y col., Biotechnol. Bioeng., 25:1181-1186 [1983]). Una de las principales aplicaciones de esta enzima es como agente sacarificante en la producción de alcohol etílico a partir de materiales almidonados. Sin embargo, al igual que con las otras glucoamilasas descritas en este documento, esta enzima también se usa en los procedimientos de la presente invención.

[0086] Glucoamilasas adicionales que se usan en los procedimientos de la presente invención incluyen aquellas obtenidas a partir de los géneros *Rhizopus* y *Humicola* que se caracterizan por tener productividad y actividad enzimática particularmente altas. Además, en comparación con la glucoamilasa derivada de otros organismos, la glucoamilasa derivada de *Rhizopus* presenta una fuerte acción sobre el almidón y sus propiedades enzimológicas y químicas que incluyen pH óptimo son particularmente adecuadas para la sacarificación de almidón de cereal. Debido a estas características, la glucoamilasa derivada de *Rhizopus* se considera la más apta para la producción de alcohol usando almidón no cocido o cocido a baja temperatura (véanse las patentes de EE.UU. nº 4.514.496 y 4.092.434). Se ha observado que tras la incubación de almidón de maíz bruto con glucoamilasa de

- Rhizopus*, usada conjuntamente con alfa-amilasa de *Rhizopus*, se aceleró la degradación del almidón por glucoamilasa. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ningún mecanismo o teoría particular, se cree que la glucoamilasa de *Rhizopus* tiene una actividad de degradación más fuerte que las preparaciones de glucoamilasa de *Aspergillus niger* que también contienen α -amilasa (véase Yamamoto y col., Denpun Kagaku, 37:129-136 [1990]). Una preparación comercial que se usa en la presente invención es la preparación de glucoamilasa derivada del cultivo de carpa de una cepa de *Rhizopus niveus* disponible de Shin Nihon Chemical Co., Ltd. Otra preparación comercial que se usa en la presente invención es la composición hidrolizante de almidón comercial M1 que está disponible de Biocon India, de Bangalore, India.
- 10 **[0087]** Como es entendido por aquellos expertos en la materia, la cantidad de glucoamilasa usada en los procedimientos de la presente invención depende de la actividad enzimática de la glucoamilasa (por ejemplo, DISTILLASE® L-400). Generalmente, una cantidad entre 0,001 y 2,0 ml de una disolución de la glucoamilasa se añade a 450 g de una suspensión ajustada al 20-35% de sólidos secos, siendo la suspensión el mosto licuado durante la sacarificación y/o en el almidón hidrolizado y los azúcares durante la fermentación. En algunas realizaciones, la glucoamilasa se añade en una cantidad entre 0,005 y 1,5 ml de una disolución tal. En algunas realizaciones preferidas, la enzima se añade a una cantidad entre 0,01 y 1,0 ml de una disolución tal.
- 15 **[0088]** Como se indica anteriormente, las pululanazas también se usan en los procedimientos de la presente invención. Estas enzimas hidrolizan enlaces alfa-1,6-glucosídicos. Por tanto, durante la sacarificación del almidón licuado, las pululanazas eliminan unidades de glucosa sucesivas de los extremos no reductores del almidón. Esta enzima puede hidrolizar tanto los enlaces glucosídicos lineales como ramificados de almidón, amilosa y amilopectina.
- 20 **[0089]** Enzimas adicionales que se usan en la presente invención incluyen enzimas hidrolizantes de almidón (RSH) incluyendo la preparación de enzima glucoamilasa RSH de *Humicola* (véase la patente de EE.UU. nº 4.618.579). Esta preparación de enzima RSH de *Humicola* presenta la máxima actividad dentro del intervalo de pH de 5,0 a 7,0 y particularmente en el intervalo de 5,5 a 6,0. Además, esta preparación de enzima presenta la máxima actividad en el intervalo de temperatura de 50°C a 60°C. Por tanto, en cada una de las etapas de la presente invención en las que se usa esta enzima la solubilización enzimática del almidón se lleva a cabo preferentemente dentro de estos intervalos de pH y temperatura.
- 30 **[0090]** En algunas realizaciones, las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH de *Humicola* obtenidas de la cepa de organismos fúngicos de *Humicola grisea* var. *thermoidea* se usan en los procedimientos de la presente invención. En algunas realizaciones particularmente preferidas, estas enzimas RSH de *Humicola* se seleccionan del grupo que consiste en ATCC (Colección americana de cultivos tipo) 16453, NRRL (USDA Northern Regional Research Laboratory) 15219, NRRL 15220, NRRL 15221, NRRL 15222, NRRL 15223, NRRL 15224, y NRRL 15225, además de cepas genéticamente alteradas derivadas de estas enzimas.
- 35 **[0091]** Glucoamilasas RSH adicionales que se usan en los procedimientos de la presente invención incluyen preparaciones de enzima glucoamilasa RSH de *Rhizopus*. En algunas realizaciones se usa la enzima obtenida a partir de la cepa de carpa de *Rhizopus niveus* disponible de Shin Nihon Chemical Co., Ltd., Ahjyo, Japón, bajo la marca registrada "CU CONC". Otra preparación de enzima útil es una digestiva comercial de *Rhizopus* disponible de Amano Pharmaceutical bajo la marca registrada "GLUCZYME" (véase Takahashi y col., J. Biochem., 98:663-671 [1985]). Enzimas adicionales incluyen tres formas de glucoamilasa (EC 3.2.1.3) de una *Rhizopus* sp., concretamente "Gluc1" (MW 74.000), "Gluc2" (MW 58.600) y "Gluc 3" (MW 61.400). Se encontró que Gluc1 era 22-25 veces más eficaz que Gluc2 o Gluc3. Por tanto, aunque Gluc2 y Gluc3 se usan en la presente invención, debido a que Gluc1 se une fuertemente al almidón y tiene un pH óptimo de 4,5, la Gluc1 se usa particularmente en la presente invención. Una preparación de enzima glucoamilasa RSH adicional para uso en la presente invención incluye preparaciones de enzima comercializada con la designación "M1" disponibles de Biocon India, Ltd., Bangalore, India (M1 es una composición o mezcla de enzimas multifacética).
- 40 **[0092]** Como se observa anteriormente, en la mayoría de las realizaciones las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH de *Humicola* contienen actividad de glucoamilasa, además de un factor potenciador que solubiliza almidón. Las proporciones relativas de factor potenciador y actividad de glucoamilasa en otras preparaciones de enzima RSH pueden variar algo. Sin embargo, con las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH que se usan en la presente invención normalmente hay un amplio factor potenciador producido junto con la fracción de glucoamilasa. Por consiguiente, la actividad de las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH se define en términos de su actividad de glucoamilasa.
- 45 **[0092]** Como se observa anteriormente, en la mayoría de las realizaciones las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH de *Humicola* contienen actividad de glucoamilasa, además de un factor potenciador que solubiliza almidón. Las proporciones relativas de factor potenciador y actividad de glucoamilasa en otras preparaciones de enzima RSH pueden variar algo. Sin embargo, con las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH que se usan en la presente invención normalmente hay un amplio factor potenciador producido junto con la fracción de glucoamilasa. Por consiguiente, la actividad de las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH se define en términos de su actividad de glucoamilasa.
- 50 **[0092]** Como se observa anteriormente, en la mayoría de las realizaciones las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH de *Humicola* contienen actividad de glucoamilasa, además de un factor potenciador que solubiliza almidón. Las proporciones relativas de factor potenciador y actividad de glucoamilasa en otras preparaciones de enzima RSH pueden variar algo. Sin embargo, con las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH que se usan en la presente invención normalmente hay un amplio factor potenciador producido junto con la fracción de glucoamilasa. Por consiguiente, la actividad de las preparaciones de enzima glucoamilasa RSH se define en términos de su actividad de glucoamilasa.

[0093] *Lactobacillus amylovorus* (ATCC 33621) es una bacteria productora de ácido láctico aislada de enriquecimientos de maíz de estiércol de ganado (véase Nkamura, Int. J. Syst. Bacteriol., 31:56-63 [1981]). Esta cepa produce una amilasa extracelular que permite que hidrolice almidón (soluble) licuado en glucosa, que entonces puede fermentarse a ácido láctico (véase Xiaodong y col., Biotechnol. Lett., 19:841-843 [1997]).

[0094] De hecho, las alfa-amilasas y las glucoamilasas comercialmente disponibles se usan en los procedimientos de la presente invención en concentraciones de enzima económicamente razonables. Aunque las condiciones de fermentación comúnmente usadas no utilizan temperaturas óptimas, las condiciones de pH para la fermentación se corresponden fielmente con el pH óptimo para enzimas de sacarificación comercialmente disponibles (es decir, las glucoamilasas). En algunas realizaciones de la presente invención, la sacarificación completa a glucosa se favorece por la solubilización gradual de almidón granular. Supuestamente, la enzima siempre está expuesta a bajas concentraciones de dextrina. Además, la eliminación de glucosa mediante la fermentación mantiene un bajo contenido de glucosa en el medio de fermentación. Por tanto, la glucoamilasa se expone a baja concentración de glucosa. En consecuencia, la glucoamilasa se usa tan eficazmente que niveles de dosificación económicamente viables de glucoamilasa (UGA) son adecuados para uso en los procedimientos de la presente invención (es decir, dosificación de glucoamilasa de 0,05-10,0 UGA/g de almidón; y preferentemente 0,2-2,0 UGA/g de almidón).

[0095] Las dosificaciones proporcionadas anteriormente para glucoamilasa sólo se aproximan a la concentración eficaz de la actividad de sacarificación enzimática en el caldo de fermentación, ya que una proporción adicional de la actividad de sacarificación es contribuida por la alfa-amilasa. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ningún mecanismo o teoría particular, se cree que la alfa-amilasa ensancha adicionalmente los orificios perforados sobre los gránulos de almidón (véase Yamamoto y col., anteriormente). Normalmente, el uso de alfa-amilasas comercialmente disponibles produce la producción de cantidades significativas de azúcares tales como glucosa y maltosa.

[0096] Además, algunas glucoamilasas comercialmente disponibles contienen alguna actividad de alfa-amilasa. Por tanto, es posible (aunque normalmente no es práctico) fermentar almidón particulado sólo en presencia de glucoamilasa. Sin embargo, no se pretende que tales realizaciones sean excluidas de la presente invención.

[0097] En la mayoría de las realizaciones de los procedimientos de la presente invención se añade una cantidad eficaz de alfa-amilasa a una suspensión de almidón particulado. Aquellos expertos en la materia entienden que, además de la incierta cantidad de actividad de alfa-amilasa contribuida por glucoamilasa, la actividad eficaz de la alfa-amilasa puede ser bastante diferente de los valores de actividad unitarios facilitados por el proveedor. La actividad de la alfa-amilasa depende del pH, y puede ser diferente en el intervalo de pH seleccionado para la fermentación (es decir, en comparación con las condiciones de prueba empleadas por los proveedores para sus valores de actividad unitaria informados). Por tanto, se contemplan algunos experimentos preliminares ya que algunas veces son necesarios con el fin de establecer las dosificaciones más eficaces para las alfa-amilasas, que incluyen aquellas no explícitamente descritas en este documento, pero que se usan en los procedimientos de la presente invención.

[0098] En algunas de las realizaciones más preferidas, el intervalo de dosificación de alfa-amilasa para alfa-amilasas fúngicas es de 0,02 UAAF/g (unidades de alfa-amilasa fúngica) a 2,0 UAAF/g de almidón, aunque en algunas realizaciones particularmente preferidas el intervalo es 0,05-0,6 UAAF/g. Una "UAAF" es como se conoce en la técnica (véase Cerial Chem., 16:712-723 [1939]). En la mayoría de las realizaciones que utilizan alfa-amilasas de *Bacillus* el intervalo es 0,01 UL/g a 0,6 UL/g, preferentemente 0,05 a 0,15 UL/g. Se contempla que la incertidumbre sobre la actividad real de tanto la glucoamilasa como la alfa-amilasa en la suspensión de fermentación requerirá algo de investigación preliminar en la práctica de algunas realizaciones. Las consideraciones de optimización incluyen el hecho de que aumentar la dosificación de alfa-amilasa con un contenido de glucoamilasa constante aumenta la velocidad de fermentación. Además, el aumentar la dosificación de glucoamilasa con un contenido de alfa-amilasa constante aumenta la velocidad de fermentación. El mantener la dosificación de enzima constante y/o aumentar el contenido de almidón en la suspensión también aumentan la velocidad de fermentación. De hecho, se contempla que en algunas realizaciones la dosificación de alfa-amilasa óptima supere bastante las dosificaciones recomendadas hasta este momento para licuar el almidón; la glucoamilasa óptima puede superar bastante las dosificaciones recomendadas para sacarificar jarabes. Sin embargo, los niveles de dosificación de enzimas no deberá confundirse con el uso de enzimas. Proporciones sustanciales de las enzimas dosificadas a la suspensión de almidón están disponibles para la recuperación del caldo de fermentación para usar de nuevo para fermentar almidón granular.

[0099] Otra consideración que surge del empleo de las enzimas a las temperaturas de fermentación es que, aunque las enzimas presenten una baja actividad relativa (por ejemplo, la actividad de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* a las temperaturas de fermentación no es superior a aproximadamente el 25% de la actividad máxima), la baja actividad relativa es contrarrestada por la prolongada duración de las 48-120 horas de fermentación, y por la prolongada semivida de las enzimas que no se han sometido a temperaturas elevadas. De hecho, se ha determinado que más del 90% de la actividad de enzimas permanece después de 72 horas de fermentación.

[0100] La alfa-amilasa de *B. licheniformis* (enzimas SPEZYME® AA y SPEZYME® FRED; Genencor International Inc.) es suficientemente estable para resistir las breves exposiciones a temperaturas del matraz balón. Por tanto, la recirculación de las descargas puede usarse como una forma para recircular alfa-amilasa.

[0101] Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, están disponibles algunas glucoamilasas RSH (por ejemplo, la enzima obtenida a partir de *Rhizopus*) que convierten almidón en glucosa a temperaturas de no cocción, reduciendo la necesidad de exponer la composición enzimática a temperaturas del matraz balón. Esto reduce los costes de energía de convertir el sustrato de carbono en el producto final deseado, reduciéndose así los costes globales de fabricación. Por tanto, estas enzimas se usan particularmente en los procedimientos de la presente invención.

Condiciones de cultivo

[0102] Normalmente, las células se cultivan a aproximadamente 30°C en medios apropiados. Los medios de crecimiento preferidos utilizados en la presente invención incluyen medios comunes comercialmente preparados tales como caldo Luria Bertani (LB), caldo dextrosa Sabouraud (SD) o caldo de extracto levadura y malta (YM). Sin embargo, también pueden usarse otros medios de crecimiento definidos o sintéticos, según convenga. Las condiciones de cultivo apropiadas son muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

[0103] En algunas realizaciones, en los medios de reacción se incorporan agentes conocidos por modular la represión de catabolitos directamente o indirectamente (por ejemplo, adenosina 2',3'-monofosfato cíclico o adenosina 2',5'-monofosfato cíclico). Similarmente, el uso de agentes conocidos por modular actividades enzimáticas (por ejemplo, sulfitos, bisulfitos y álcalis) que conducen al potenciamiento de la producción de glicerol también se usan conjuntamente con o como una alternativa a las manipulaciones genéticas. Intervalos de pH adecuados para la fermentación son entre pH 5,0 y pH 9,0; aunque el intervalo de pH 6,0 a pH 8,0 es particularmente preferido para las condiciones iniciales del sistema de reacción. Además, las reacciones pueden realizarse bajo condiciones aerobias, microaerófilas o anaerobias, según sea apto para el organismo utilizado.

Fermentaciones discontinuas y continuas

[0104] En algunas realizaciones preferidas, el presente procedimiento usa un procedimiento discontinuo de fermentación. Una fermentación discontinua clásica es un sistema cerrado en el que la composición de los medios se fija al principio de la fermentación y no está sometida a alteraciones artificiales durante la fermentación. Por tanto, al principio de la fermentación el medio se inocula con el (los) organismo(s) deseado(s). En este procedimiento se permite que la fermentación se produzca sin la adición de ningún componente al sistema. Normalmente, una fermentación discontinua se clasifica como un "lote" con respecto a la adición de la fuente de carbono y frecuentemente se hacen intentos por controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. Las composiciones de metabolitos y de biomasa del sistema discontinuo cambian constantemente hasta que se detiene el tiempo la fermentación. Dentro de los cultivos discontinuos, las células median mediante una fase de latencia estática en una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente en una fase estacionaria en la que la velocidad de crecimiento disminuye o se detiene. Si están sin tratar, las células mueren eventualmente en la fase estacionaria. En general, las células en la fase logarítmica son responsables de la masa de producción de producto final o producto intermedio.

[0105] Una variación en el sistema discontinuo estándar es el sistema de "fermentación alimentada discontinua" que también se usa con la presente invención. En esta variación de un sistema discontinuo típico, el sustrato se añade en incrementos a medida que la fermentación progresa. Los sistemas alimentados discontinuos son útiles cuando la represión de catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y cuando se desea tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medición de la concentración de sustrato real en sistemas alimentados discontinuos es difícil y por tanto se estima basándose en los cambios de factores medibles tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales tales como CO₂. Las fermentaciones discontinuas y alimentadas discontinuas son comunes y muy conocidas en la técnica.

[0106] También se contempla que los procedimientos de la presente invención sean adaptables a procedimientos de fermentación continua. La fermentación continua es un sistema abierto en el que un medio de fermentación definido se añade continuamente a un bioreactor y simultáneamente se saca una cantidad igual de medios acondicionados para el procesamiento. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una densidad alta constante en los que las células están principalmente en crecimiento de fase logarítmica.

[0107] La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afecten el crecimiento celular y/o la concentración de producto final. Por ejemplo, en una realización, un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno se mantiene a una velocidad fijada y se permite que se moderen todos los otros parámetros. En otros sistemas pueden alterarse continuamente varios factores que afectan el crecimiento, mientras que la concentración de células, medida por turbidimetría del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento de estado estacionario. Por tanto, la pérdida de células debida a medios que se sacan debe equilibrar la velocidad de crecimiento celular en la fermentación. Los procedimientos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para los procedimientos de fermentación continua, además de técnicas para maximizar la tasa de formación de producto, son muy conocidos en la técnica de la microbiología industrial.

[0108] En algunas realizaciones, la presente invención se pone en práctica usando procedimientos discontinuos, mientras que en otras realizaciones se usan procedimientos alimentados discontinuos o continuos, además de usarse cualquier otro modo de fermentación adecuado. Adicionalmente, en algunas realizaciones, las células se inmovilizan sobre un sustrato como catalizadores de células completas y se someten a condiciones de fermentación para la producción de producto final apropiado.

25 Identificación y purificación del producto final

[0109] Los procedimientos para la purificación del producto final de medios de fermentación son conocidos en la técnica.

[0110] En algunas realizaciones, el producto final se identifica directamente sometiendo los medios a análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Un procedimiento de la presente invención implica el análisis de los medios de fermentación en una columna de intercambio iónico analítica usando una fase móvil de ácido sulfúrico 0,01 N de un modo isocrático.

35 Consideraciones del procedimiento

[0111] Como se indica anteriormente, la fermentación de la suspensión de almidón granular tiene características completamente diferentes de la fermentación de un jarabe. Generalmente, una concentración de aproximadamente el 20% sólidos en disolución se considera el contenido máximo de azúcar en un medio de fermentación, ya que concentraciones mayores crean dificultades al principio y al final de la fermentación. Sin embargo, no existen límites similares en la fermentación de una suspensión de almidón. La concentración de almidón en la suspensión puede variar del 10 - 35 % sin consecuencias apreciables al inicio de la fermentación. El aumentar la concentración de almidón (por ejemplo, a dosificaciones de enzima constante) acelera la velocidad de bioconversión o, en cambio, permite reducir las dosificaciones de enzima requeridas para lograr una velocidad de bioconversión dada. El almidón granular en exceso (es decir, residual) puede recuperarse junto con cantidades sustanciales de enzimas y someterse a una nueva fermentación. Por tanto, el control de la concentración de almidón es un parámetro de procedimiento importante para la práctica de la presente invención.

[0112] En una realización preferida se proporcionan medios para la bioconversión y la fermentación de una suspensión de almidón granular que tiene 10-35% en peso de almidón. La reacción depende del microorganismo y las condiciones de bioprocesamiento usadas y, por tanto, la recirculación de las enzimas sobre las partículas de almidón se produce cuando el almidón residual se fermenta de nuevo. Sin embargo, incluso cuando se fermenta una suspensión de 25-35% de almidón, en realizaciones preferidas la fermentación se detiene antes de la completa desaparición del almidón granular, para la nueva fermentación. Por tanto, la recirculación de almidón es una forma fácil de recuperar enzimas para reutilizarlas.

[0113] En una realización preferida de la presente invención, el almidón (granular) y los microorganismos se eliminan juntos (por ejemplo, por centrifugación o filtración). Este almidón eliminado y los microorganismos se mezclan con almidón granular fresco y alícuota(s) de enzima(s) adicional(es) según se necesite para producir una

carga de fermentación para otra ejecución de la fermentación.

[0114] Como es sabido por aquellos expertos en la materia, los compromisos de ingeniería se contemplan para llegar a detalles de procedimiento óptimos; se contempla que estos compromisos varíen dependiendo de cada situación particular. Sin embargo, los procedimientos proporcionados en este documento proporcionan las enseñanzas necesarias para concertar tales compromisos para obtener procedimientos óptimos. Por ejemplo, para lograr la fermentación más rápida razonable se indican alto contenido de almidón y alta dosificación de enzimas. Pero la rápida fermentación resultante decae en la generación de un nivel de nutrientes en el caldo de fermentación cuando se dicta la recuperación de los nutrientes, o, alternativamente esa fermentación se detiene a un contenido de producto final relativamente bajo. Sin embargo, en situaciones en las que son aceptables velocidades de fermentación relativamente bajas, entonces la dosificación de enzimas (con suspensiones de alto contenido de almidón) es relativamente baja y las pérdidas de nutrientes se mantienen a niveles hasta ahora aceptados por las ciencias de la fermentación. En los casos en los que el rendimiento de producto final máximo sea un objetivo principal las suspensiones de bajo contenido de almidón moderan la dosificación de alfa-amilasa, y se usa alta dosificación de glucoamilasa en la presente invención. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a ningún diseño de procedimiento particular.

[0115] Como se indica en este documento, la presente invención ahorra considerable energía térmica. Sin embargo, como el sustrato de almidón de partida nunca está sometido a las condiciones térmicas usadas para las licuefacciones, el sustrato no está térmicamente esterilizado. Por tanto, se contempla que en algunas realizaciones el sustrato de almidón granular pueda añadir microorganismos contaminantes al medio de fermentación. Por tanto, en algunas realizaciones es ventajoso sembrar el medio de fermentación con un gran número de microorganismos productores de producto que estén asociados al sustrato recirculado (por ejemplo, almidón). Al superarse enormemente el número de contaminantes, los microorganismos recirculados arrollan cualquier microorganismo contaminante, dominando así la fermentación, produciendo la producción del producto final deseado.

[0116] En algunas realizaciones, las cantidades de microorganismos y/o enzimas inicialmente cargadas en el tanque de fermentación o bioreactor están de acuerdo con las prácticas de la técnica anterior para la fermentación y/o bioconversión de diversos productos. Estas cantidades variarán, ya que las células microbianas se multiplican durante el transcurso de la fermentación, mientras que las enzimas usadas para la bioconversión tendrán una semivida limitada. Aunque en algunas realizaciones se utiliza la recirculación de microorganismos, en muchas realizaciones no se requiere para la práctica de la presente invención. A diferencia, en realizaciones particularmente preferidas se desea recircular las enzimas (aunque no se pretende que la presente invención se limite a procedimientos que requieren la recirculación de enzimas).

[0117] Por tanto, en algunas realizaciones se contempla la eliminación de los microbios de las partículas de almidón residual antes de la recirculación del almidón residual. Sin embargo, de nuevo se observa que la práctica de la presente invención no requiere necesariamente el tratamiento térmico del sustrato de partida. Por tanto, en algunas realizaciones, el sustrato de partida se esteriliza por calor, mientras que en otras realizaciones no. Por tanto, en algunas realizaciones, la fermentación/bioconversión se realiza en presencia de una proporción relativamente grande de microorganismos con el fin de vencer los efectos de cualquier contaminación. En realizaciones alternativas se añaden antimicrobianos al medio de fermentación para suprimir el crecimiento de microorganismos contaminantes. En realizaciones adicionales se usan técnicas de esterilización en frío, radiación UV, pasteurización a 65°C para esterilizar los materiales de partida (por ejemplo, el sustrato). Sin embargo, la biomasa no posee problemas en lo referente a la esterilización de tanques de fermentación o bioreactores.

[0118] Como se describe en este documento, la presente invención proporciona medios para controlar la velocidad de fermentación liberando azúcares metabolizables a los microbios a una velocidad controlada. Los procedimientos de la presente invención son muy diferentes de los que se ha hecho hasta ahora. La técnica anterior enseña el tratamiento de almidón sólido con enzimas antes de la fermentación e/o inclusión de enzimas en el medio de fermentación para conservar energía y/o para mejorar la eficiencia de fermentación. Sin embargo, una diferencia de la presente invención es que no hay enseñanza en la materia para alterar el carácter de la fermentación de manera que se logre una velocidad de fermentación próxima a la lineal. La presente invención proporciona medios para conservar eficientemente la energía, particularmente con respecto a la licuefacción del almidón a alta temperatura. De hecho, en realizaciones preferidas se conserva más energía térmica. Los procedimientos de la presente invención operan con alta eficiencia de fermentación, en parte debido a que se reducen las pérdidas de producto debidas a la retrogradación del almidón, sacarificación incompleta y fermentación incompleta de fermentables. Además, la capacidad para adaptar la velocidad de fermentación mediante el control de la concentración de almidón o biomasa, además de controlar el contenido y las proporciones de enzima, como se

proporciona por la presente invención, facilita la producción de los productos finales deseados con un mínimo contenido de hidratos de carbono.

Parte experimental

5 **[0119]** Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma. De hecho, se contempla que estas enseñanzas se usen en optimizar adicionalmente los sistemas de procedimiento descritos en este documento.

10 **[0120]** En la siguiente divulgación experimental se aplican las siguientes abreviaturas: % en peso (porcentaje en peso); °C (grados centígrados); rpm (revoluciones por minuto); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); pb (par de bases); kb (par de kilobases); kD (kilodalton); g (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); ng (nanogramos); µl (microlitros); ml (mililitros); mm (milímetros); nm (nanómetros); µm (micrómetro); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); V (voltios); MW (peso molecular); psi (libras por pulgada cuadrada); s (segundos); min (minuto/minutos); h (hora/horas); c.s.p. (cantidad suficiente); DO (densidad óptica); DO₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm); PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida); OD (oxígeno disuelto); Di (desionizado); tampón ftalato (ftalato de sodio en agua, 20 mM, pH 5,0); PBS (solución salina tamponada con fosfato [NaCl 150 mM, tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2]); almidón granular Cerestar (almidón granular Cargill Foods PFP2200); Cerestar (Cerestar, Inc., a Cargill Inc., empresa, Minneapolis, MN); AVICELL® (FMC Corporation); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); peso/volumen (peso con respecto al volumen); v/v (volumen con respecto al volumen); lnpm (litros normalizados por minuto); ATCC (Colección americana de cultivos tipo, Rockville, MD); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Genencor (Genencor International, Inc., Palo Alto, CA); Shin Nihon (Shin Nihon, Japón).

20 **[0121]** En el siguiente ejemplo y trabajo relacionado se usaron diversos medios y tampones adicionales conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen los siguientes:
Medio *Lactobacilli* MRS (para el inóculo): Difco (ref. n° 288130):
30 0.5x medio *Lactobacilli* MRS modificado sin glucosa + formulación de 8% de almidón granular:

Extracto de levadura (Difco)	15,0 g/l
Almidón granular (Cerestar)	80,0 g/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,3 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l
Acetato sódico	0,5 g/l
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,03 g/l
MnSO ₄ *1H ₂ O	0,03 g/l
Mazu DF204 (antiespumante)	1 ml
1000x Tiger Trace Metal	0,2 m/s disolución madre

Formulación TM2 (por litro de medio de fermentación):

35 K₂HPO₄ 13,6 g, KH₂PO₄ 13,6 g, MgSO₄*7H₂O 2 g, ácido cítrico monohidratado 2 g, citrato de amonio férrico 0,3 g, (NH₄)₂SO₄ 3,2 g, extracto de levadura 5 g, 1000X disolución Tiger Trace Metal modificada 1 ml. Todos los componentes se añaden juntos y se disuelven en diH₂O. El pH se ajusta a 6,8 con hidróxido potásico (KOH) y c.s.p. para enrasar. El producto final sólo se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 µ (micrómetros) (no se esteriliza en autoclave).

40 Medio Murphy III (g/l)

45 KH₂PO₄ (12 g), K₂HPO₄ (4 g), MgSO₄*7H₂O (2 g), DIFCO Soytone (2 g), citrato de sodio (0,1 g), fructosa (5 g), (NH₄)₂SO₄ (1 g), ácido nicotínico (0,02 g), 0,4 g/l de FeCl₃*6H₂O (5 ml) y sales Pho (5 ml).
1000X disolución Tiger Trace Metal modificada:
Ácidos cítricos*H₂O 40 g, MnSO₄*H₂O 30 g, NaCl 10 g, FeSO₄*7H₂O 1 g, CoCl₂*6H₂O 1 g, ZnSO₄*7H₂O 1 g, CuSO₄*5H₂O 100 mg, H₃BO₃ 100 mg, NaMoO₄*2H₂O 100 mg. Cada componente se disuelve uno a uno en diH₂O, pH a 3,0 con HCl/NaOH, luego c.s.p. para enrasar y se esteriliza por filtración con un filtro de 0,22 micrómetros.

EJEMPLO 1

Conversión de almidón en ácido láctico

- [0122]** Este experimento se llevó a cabo en un bioreactor de 1 l para monitorizar la formación de lactato a partir de almidón granular usando enzimas con actividad de glucoamilasa a la fermentación deseada a pH 6,4 y temperatura 34°C. En este experimento, el almidón granular en forma de suspensión (concentración final máxima de 80 g/l de glucosa) en 0,5x medio de fermentación medio *Lactobacilli* modificado se pasteurizó (es decir, la mezcla se mantuvo a 34°C durante 30 min durante la germinación de cualquier contaminante presente en la suspensión de almidón, y luego se pasteurizó a 65°C durante 14 h). Éste se añadió al bioreactor de 1 l previamente esterilizado. El pH de la suspensión/caldo se ajustó a 6,4 y se controló a 6,4 con NH₄OH al 28%. Entonces se añadieron las enzimas deseadas (0,4 g de Sumizyme CU CONC™; Shin Nihon) como disolución filtrada en 0,2 micrómetros (20 ml) en agua DI. Entonces se preparó un inóculo de la cepa productora de lactato *Lactobacillus casei* (ATCC 393), tomada de un vial congelado, en medio *Lactobacillus* MRS (Difco). Después de crecer el inóculo hasta DO 2,4, medida a 550 nm, en un bioreactor de 1 l a 34°C con una aspersion de nitrógeno a una velocidad de flujo de 0,6 lpm (litros normalizados por minuto), el contenido del reactor (600 ml) se centrifugó y se resuspendió en 45 ml de sobrenadante para transferir el sedimento de células (42 ml de material de OD22) como inóculo para la bioconversión fermentativa en un bioreactor. Durante la duración de la ejecución de la bioconversión fermentativa, el nitrógeno se pulverizó a 0,6 lpm, la presión de aspiración se mantuvo a 5 psi (34,5 kPa), la temperatura se mantuvo a 34°C, el pH se mantuvo a 6,4 por valoración con base de NH₄OH al 28%.
- 20 **[0123]** Durante la reacción se tomaron muestras del recipiente, se centrifugaron y los sobrenadantes se refrigeraron para terminar la acción enzimática. Entonces, el sobrenadante se sometió a análisis de HPLC. Este experimento monitorizó la bioconversión de almidón granular midiendo la formación glucosa y su conversión en lactato. En 16,3 horas la acumulación de lactato ascendió a 61,75 g/l (Figura 1).
- 25 **[0124]** Además, la bioconversión de almidón granular en lactato se demostró que estaba a un nivel de 3,79 g/l-hora, a una temperatura de 34°C y a pH 6,4.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir ácido láctico que comprende:
 5 poner en contacto una suspensión que comprende almidón granular con una glucoamilasa que puede hidrolizar tanto los enlaces glucosídicos lineales como ramificados de almidón, una alfa-amilasa y un *Lactobacillus* productor de lactato en un procedimiento de sacarificación y fermentación simultáneo; en el que dicho almidón no está sometido a licuefacción ni gelatinización.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el almidón granular se deriva de trigo, cebada,
 10 boniato, tapioca, grano, maíz, mandioca, sorgo, centeno, salvado o arroz.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-amilasa es de la especie *Bacillus*.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la alfa-amilasa es de *Bacillus licheniformis* o
 15 *Aspergillus oryzae*.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la glucoamilasa es de las especies *Humicola* o *Rhizopus*.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho *Lactobacillus* es *Lactobacillus amylovorus*.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la glucoamilasa y la alfa-amilasa son ambas de *Rhizopus*.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la suspensión que comprende el almidón granular se somete a pasteurización a 65°C antes de ponerse en contacto con la enzima hidrolizante de almidón.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el pH del medio es pH 5,0 a 9,0.
- 30 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fermentación tiene lugar a un intervalo de temperatura de 25°C a 35°C.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el almidón granular en la suspensión está en una
 35 concentración del 10% al 35% en peso/volumen.
12. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además recuperar el ácido láctico.

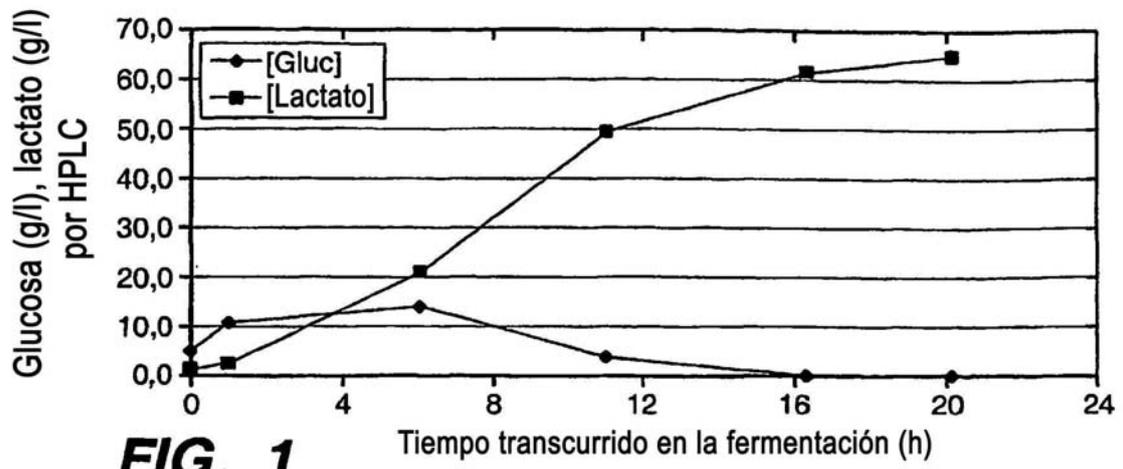


FIG._1