

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 932**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12P 13/08** (2006.01)

**C12P 13/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06819766 .4**

96 Fecha de presentación: **27.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1957658**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54 Título: **PRODUCCIÓN FERMENTATIVA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS MEDIANTE EMPLEO DE MEDIOS QUE CONTIENEN DEXTRINA.**

30 Prioridad:  
**28.11.2005 DE 102005056669**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.12.2011**

73 Titular/es:  
**BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:  
**BOY, Matthias y**  
**FREYER, Stephan**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

ES 2 369 932 T3

## DESCRIPCIÓN

Producción fermentativa de compuestos orgánicos mediante empleo de medios que contienen dextrina

La presente invención se refiere a la producción fermentativa de compuestos orgánicos con por lo menos 3 átomos de C o con por lo menos 2 átomos de C y por lo menos 1 átomo de N para el cultivo de microorganismos, mediante  
5 empleo de un medio que contiene dextrina, el cual incluye por lo menos una parte del componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón.

Los medios líquidos que contienen azúcar son una fuente básica de nutrientes para muchos métodos de fermentación; las fracciones de azúcar presentes en los medios son metabolizadas por los microorganismos empleados, con lo que se obtienen productos orgánicos valiosos. La gama de tales productos metabólicos  
10 producidos por microbios, es decir compuestos orgánicos, incluye con esto por ejemplo productos volátiles de bajo peso molecular como etanol, productos metabólicos no volátiles como aminoácidos, vitaminas y carotenoides así como una multiplicidad de otras sustancias.

Para tales métodos de fermentación microbiana generalmente conocidos se emplean diferentes fuentes de carbono dependiendo de las diferentes condiciones del método. Éstas abarcan desde sacarosa pura de melaza de nabos y  
15 caña de azúcar, denominadas "melazas de alta prueba" (melaza invertida de caña de azúcar) hasta glucosa de hidrolizados de almidón. Además para la producción biotecnológica de L-lisina se mencionan ácido acético y etanol como co-sustratos que pueden ser utilizados a escala industrial (Pfefferle et al., Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 79 (2003), 59-112).

En base a las mencionadas fuentes de carbono se establecen diferentes métodos y procedimientos para la  
20 producción fermentativa de productos metabólicos microbianos basada en azúcar. En el ejemplo de la L-lisina se describen estos por ejemplo por Pfefferle et al. (a.a.O.) respecto al desarrollo de cepas, desarrollo de procesos y producción a escala industrial.

Una fuente importante de carbono para la producción fermentativa de productos metabólicos microbianos facilitada por microorganismos, es el almidón. Antes de que éste pueda ser usado como fuente de carbono en una  
25 fermentación, tiene que primero ser licuado y sacarificado en las etapas previas de reacción. Para esto comúnmente se obtiene el almidón en forma previamente purificada de una fuente natural como patatas, yuca, cereales, por ejemplo trigo, maíz, cebada, centeno, tritical o arroz y a continuación se licúa y sacarifica enzimáticamente, para ser empleado luego en la verdadera fermentación para la producción del producto metabólico deseado.

Aparte del empleo de tal fuente de almidón previamente purificada, se ha descrito también el empleo de fuentes de  
30 almidón no purificadas para la producción de fuentes de carbono para la producción fermentativa de productos metabólicos microbianos. En ello, típicamente primero se desmenuzan las fuentes de almidón mediante molienda. El producto de molienda es sometido entonces a una licuefacción y sacarificación. Puesto que este producto de molienda contiene naturalmente, aparte de almidón, aún una serie de componentes que no contienen almidón, los cuales pueden influir de manera desventajosa en la fermentación, comúnmente estos componentes son separados  
35 antes de ésta. La eliminación puede ocurrir bien sea directamente después de la molienda (WO 02/077252; JP 2001-072701; JP 56-169594; CN 1218111), después de la licuefacción (WO 02/077252; CN 1173541) o a continuación de la sacarificación (CN 1266102; Beukema et al.: Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potatoe saccharification to give culture medium (Conference Abstract), Symp. Biotechnol. Res. Neth. (1983), 6; NL8302229). En todas las variantes, sin embargo se emplea en la fermentación un hidrolizado  
40 de almidón altamente puro.

Los nuevos métodos para la producción fermentativa de compuestos orgánicos incluyen en particular una purificación de la fuente de almidón antes de la fermentación, por ejemplo la purificación de las soluciones de almidón licuadas y sacarificadas (JP 57159500), o la puesta a disposición de métodos que deberían hacer posible la  
producción de medios de fermentación, a partir de recursos renovables (EP 1205557).

Por el contrario, las fuentes de almidón no purificadas son empleadas en gran extensión para la producción  
45 fermentativa bioetanol. Con esto, las fuentes de almidón, comúnmente granos enteros de cereales, son primero molidas en seco y a continuación el componente de almidón de la fuente de almidón se hidroliza bajo la acción de enzimas. En esto, la hidrólisis puede ejecutarse tanto en forma discontinua, por ejemplo en recipientes con agitación, como también de modo continuo por ejemplo en cocción por inyección. Por ejemplo las correspondientes  
50 condiciones de proceso se encuentran en "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Jaques et al. (Hg.), Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735, capítulo 2, p. 7 a 23, y en McAloon et al., "Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks", NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory, octubre 2000.

Puesto que en la producción fermentativa de bioetanol se obtiene el producto valioso mediante destilación, el empleo de la fuente de almidón a partir del proceso de molienda en seco en forma no purificada no representa un problema importante. Sin embargo, en la aplicación de un método de molienda en seco para la producción de otros metabolitos microbianos, es un problema la corriente de sustancia sólida alimentada a la solución de azúcar en la fermentación, puesto que esto puede afectar tanto negativamente la fermentación como por ejemplo respecto a la tasa de transferencia de oxígeno o bien la necesidad de oxígeno de los microorganismos empleados (ver aquí Mersmann, A. et al.: Selection and Design of Aerobic Bioreactors, Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357-3701, como puede también hacer más difícil de un modo no despreciable la subsiguiente elaboración.

Además, ya en la producción de la suspensión que contiene almidón la viscosidad de ésta puede alcanzar un valor crítico por la alimentación de sustancia sólida, por lo que por ejemplo una suspensión con más de 30 % en peso de harina de maíz ya no es miscible de modo homogéneo en agua (Industrial Enzymology, 2ª ed., T. Godfrey, S. West, 1996). Con ello en el procedimiento convencional, se limita la concentración de glucosa. En este sentido esto no es relevante respecto a la producción fermentativa de bioetanol, puesto que de todos modos debido a la toxicidad del producto para las levaduras empleadas en la fermentación, de forma insensata podrían hacerse reaccionar elevadas concentraciones.

En la producción fermentativa de otros metabolitos orgánicos como etanol es una desventaja principalmente añadir a la fermentación medios que contienen azúcar con bajas concentraciones de esta porque esto conduce a una desproporcionada dilución del caldo de fermentación y se disminuye por ello la concentración final que se puede alcanzar en el producto valioso, lo cual por un lado causa costos elevados en su extracción del medio de fermentación y reduce el rendimiento espacio-tiempo. Estas consideraciones son significativas en particular para el caso en que un hidrolizado de almidón, el cual tradicionalmente exhibe pequeñas concentraciones de azúcar o bien glucosa de hasta aproximadamente 30 o 33 % en peso, fabricado para una producción de bioetanol de alto volumen deba alimentarse parcialmente a una fermentación secundaria de pequeño volumen para la producción de otros productos químicos.

Por otro lado, elevadas concentraciones de monosacáridos metabolizables en el medio de fermentación puede conducir a una inhibición de ésta o del crecimiento de microorganismos o tener como consecuencia un cambio en el metabolismo de los microorganismos empleados. Con E.coli por ejemplo una concentración muy alta de glucosa libre conduce a la formación de ácidos orgánicos (acetato), mientras que Saccharomyces cerevisiae en este caso por ejemplo cambia a fermentación alcohólica, aunque en fermenteras aireadas este presente suficiente oxígeno (efecto de Crabtree). De allí que elevadas concentraciones de monosacáridos que pueden ser metabolizados, en los medios que contienen azúcar alimentados a la fermentación durante la fase de alimentación suplementaria, puede afectar de modo desventajoso la fermentación. También plantea un problema en el empleo de medios altamente concentrados en la fase de lote, es decir durante la fase de crecimiento de los microorganismos en la carga de fermentación, antes de que la fermentación sea alimentada con más azúcar a través de la corriente de suministro, puesto que para su crecimiento muchas cepas requieren concentraciones de glucosa inferiores a 6 % en peso.

Debido a las dificultades y restricciones representadas, los métodos de molienda en seco, como se emplean para la producción de bioetanol en amplia extensión, hasta ahora permanecen sin esencial significado económico en la producción fermentativa de otros metabolitos microbianos diferentes al etanol.

Hasta ahora se habían descrito pruebas para la transferencia del concepto de molienda en seco y de las principales ventajas ligadas con este método en la producción a escala industrial de productos metabólicos microbianos, solamente mediante el empleo de yuca como fuente de almidón. Así, la JP 2001/275693 describe un método para la producción fermentativa de aminoácidos, en el cual se emplea como fuente de almidón bulbos pelados de yuca, que fueron molidos en seco. Sin embargo, para la ejecución del método es necesario ajustar un tamaño de partícula del producto de molienda de  $\leq 150 \mu\text{m}$ . En la filtración empleada para esto se separa una parte del producto de molienda, incluyendo componentes que no contienen almidón, antes de la licuefacción-sacarificación del almidón obtenido y de la subsiguiente fermentación. Con este método se alcanzan concentraciones moderadas de azúcar. Un método similar es descrito en la JP 2001/309751 para la producción de un suplemento alimentario que contiene aminoácidos.

Pueden alcanzarse elevadas concentraciones de azúcar en el medio líquido empleado para la fermentación, mediante el empleo de un producto de molienda para la sacarificación, el cual contiene de manera sustancial los componentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón, mediante el método descrito por quien inscribió la patente WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728). En ello, de modo sorprendente ha demostrado no ser necesaria una separación del componente sólido que no contiene almidón obtenido en la fuente de almidón antes de la fermentación. El método descrito puede ser ejecutado mediante sacarificación insitu de la fuente licuada de almidón. En la PCT/EP2006/066057 (la antigua inscripción de patente DE 10 2005 042 541.0) describe quien inscribió en la patente, un método similar mediante empleo de fuentes de almidón elegidas de entre granos de cereales.

De allí que fue objetivo de la presente invención poner a disposición otro método para la producción de compuestos orgánicos mediante fermentación, el cual no requiere ninguna o requiere por lo menos parcialmente una separación previa del componente sólido que no contiene almidón presente en la fuente de almidón. El método debería requerir en particular un gasto en equipamiento comparativamente bajo y hacer posible el empleo de medios con elevadas concentraciones de azúcar. Además, debe distinguirse por una fácil capacidad de manipulación de los medios empleados y su uso sin problemas en la fermentación. En particular el método debería permitir el empleo de cereales como fuentes de almidón.

Se encontró de modo sorprendente que, a pesar de la inherentemente elevada alimentación de sustancias sólidas, puede ejecutarse de modo eficiente un método fermentativo para la producción de compuestos orgánicos, en el cual mediante molienda y licuefacción de las fuentes de almidón, sin previa separación completa del componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón, se produce un medio (1) que contiene dextrina y se emplea este en una fermentación sin adición de enzima sacarificadora.

Con ello, es un objetivo de la invención un método para la producción de por lo menos un compuesto orgánico con por lo menos 3 átomos de C o con por lo menos 2 átomos de C y por lo menos 1 átomo de N, mediante fermentación, que incluye las siguientes etapas:

a1) molienda de una fuente de almidón, donde se obtiene un material molido el cual contiene por lo menos una parte del componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón;

a2) suspensión del material molido con un líquido acuoso y licuefacción del material molido presente en el líquido acuoso en presencia de por lo menos una enzima que licúa el almidón, donde se obtiene un medio (1) acuoso que contiene dextrina, el cual incluye por lo menos una parte del componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón; y

b) empleo del medio acuoso (1) que contiene dextrina en una fermentación para el cultivo de un microorganismo, el cual es capaz de hacer sobreproducción del compuesto orgánico y el cual es elegido de entre microorganismos que producen enzimas, las cuales hidrolizan las dextrinas hasta monosacáridos;

donde no se añaden enzimas que hidrolizan las dextrinas hasta monosacáridos, o se añaden en una cantidad inferior a 0,001 % en peso, referida al peso total de la fuente empleada de almidón

El método de fermentación acorde con la invención puede, a pesar del contenido de componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón empleada, ser ejecutado eficientemente en el medio (1) que contiene dextrina, sin requerir la adición de enzima sacarificante. Sin embargo pueden añadirse pequeñas cantidades que no son suficientes para una completa sacarificación, típicamente menores a 0,001 % en peso, en particular menores a 0,0005 % en peso, referidas a peso total de la fuente empleada de almidón.

Debido al empleo de dextrinas para el cultivo del microorganismo puede ajustarse una alta concentración de azúcares metabolizables en el medio de fermentación, tanto en la fase de lote como también en la fase de alimentación suplementaria, sin que esto lleve a una reacción secundaria no deseada, de modo que se evita una dilución indeseada del caldo de fermentación. Además, mediante el método acorde con la invención se evitan ampliamente problemas de viscosidad, como pueden presentarse en la licuefacción de la fuente de almidón a elevadas concentraciones de material molido.

Aquí y en lo que sigue se emplean como sinónimos las expresiones "medio que contiene dextrina" y "que contiene dextrina". Para el experto se entiende que el microorganismo empleado en la fermentación tiene que ser capaz de metabolizar las dextrinas presentes en el medio (1) acuoso que contiene dextrina, sin que éstas tengan que ser hidrolizadas en di- y/o monosacáridos, mediante la adición externa de enzimas sacarificantes. En ello, las dextrinas son metabolizadas por los microorganismos, presumiblemente después de que ellas fueron hidrolizadas mediante enzimas sacarificantes de cepa propia, por ejemplo glucoamilasas de cepa propia. En último caso, es particularmente ventajoso en el método acorde con la invención, que durante la fermentación la velocidad de sacarificación, en particular una liberación de glucosa, se adapta automáticamente a la necesidad de los microorganismos, por un lado por la cantidad de biomasa y por otro lado por el nivel de expresión de la enzima sacarificante de cepa propia.

Aquí y en lo que sigue, el concepto "licuefacción" significa la degradación hidrolítica de almidón hasta oligosacáridos, en particular hasta dextrinas.

Aquí y en lo que sigue, el concepto "sacarificación" o bien "sacarificar" significa la hidrólisis de dextrinas hasta monosacáridos, en particular hasta monosacáridos como glucosa. Por consiguiente, se entiende por una "enzima sacarificante" una enzima que hidroliza las dextrinas hasta monosacáridos.

Aquí y en lo que sigue, se entiende por el concepto "dextrina" a los oligosacáridos obtenidos por la degradación hidrolítica de almidón, las cuales por regla general consisten en 3 a 18, en particular 6 a 12 unidades de monosacáridos, en particular unidades de glucosa.

El concepto "contenido de equivalentes de glucosa" y "concentración de azúcar" define la concentración total de mono-, di- y oligosacáridos en el medio, que existen potencialmente para hacer una fermentación. El concepto "equivalentes de glucosa" incluye también los azúcares o bien unidades de azúcar metabolizables diferentes de glucosa.

Aquí y en lo que sigue, los conceptos "sobrepredador" o bien "sobrepredación" son empleados en referencia a un microorganismo, para definir su propiedad de producir uno o varios de sus productos metabólicos en una cantidad que sale sobre la cantidad requerida para la multiplicación del microorganismo, mediante lo cual está en el medio de fermentación para el enriquecimiento, donde puede ocurrir el enriquecimiento extra- o intracelularmente.

Para el método acorde con la invención entran en consideración como fuentes de almidón sobre todo frutos con pepa o semillas secos, los cuales en estado seco exhiben por lo menos 40 % en peso y preferiblemente por lo menos 50 % en peso de fracción de almidón. Estos se encuentran en muchas de las plantas de cereales cultivadas hoy en día en gran escala, como maíz, trigo, avena, cebada, centeno, tritical, arroz así como en remolacha azucarera, patatas, yuca y diferentes tipos de mijo, por ejemplo sorgo y milo. Preferiblemente la fuente de almidón se elige de entre cereales y especialmente entre granos de maíz, centeno, tritical y trigo. Básicamente, el método acorde con la invención se ejecuta también con fuentes análogas de almidón, como por ejemplo una mezcla de diferentes semillas o frutas de pepa que contienen almidón.

Para la producción del líquido que contiene dextrina en la etapa a1) se muelen la respectiva fuente de almidón con o sin adición de líquido, por ejemplo agua, preferiblemente sin adición de líquido. Pueden combinarse también una molienda en seco con una subsiguiente molienda en húmedo.

Para la molienda en seco se emplean típicamente molinos de martillos, molinos de rotor o molinos de rodillos para grano partido; para la molienda en húmedo son adecuados los mezcladores con agitación, molinos de esferas con sistema de agitación, molinos de circulación, molinos de discos, molinos de cámara de anillo, molinos oscilantes o molinos planetarios. Básicamente entran en consideración también otros molinos. El experto puede determinar en experimentos de rutina la cantidad del líquido necesario para la molienda en húmedo. Comúnmente se ajusta ella de modo que el contenido de sustancia seca está en el rango de de 10 a 20 % en peso.

Mediante la molienda se ajusta un tamaño adecuado de las etapas adicionales del método. Así, ha probado ser ventajoso cuando en la molienda, en particular en la molienda en seco, el tamaño de harina del material molido obtenido en la etapa a1), es decir el componente en forma de partículas exhibe un tamaño de grano en el rango de de 100 a 630 µm en una fracción de 30 a 100 % en peso, preferiblemente 40 a 95 % en peso. y en particular preferiblemente 50 a 90 % en peso. El material molido contiene preferiblemente 50 % en peso de partículas de harina con un tamaño de grano superior a 100 µm. Por regla general por lo menos 95 % en peso de la partícula de harina molida exhibe un tamaño de grano inferior a 2 mm. La medición del tamaño de grano ocurre en ello por medio de análisis de tamizaje empleando un equipo de análisis por vibración. Es básicamente ventajoso un pequeño tamaño de grano para alcanzar un elevado rendimiento de producto. Sin embargo, un tamaño de partícula muy pequeño puede conducir a problemas, en particular por la formación de grumos/aglomeración, en el macerado del material molido durante la licuefacción o bien durante la elaboración, por ejemplo en el secado de la materia seca después de la etapa de fermentación.

Comúnmente, las harinas se caracterizan por el grado de finura o bien por el tipo de harina, donde esto se correlaciona mutuamente con que con un creciente grado de finura también se incrementa el índice del tipo de harina. El grado de finura corresponde a la cantidad en peso de harina obtenida referido a 100 partes en peso del material empleado molido. Durante el molido precipita primero la harina más fina y más pura por ejemplo del interior del grano de cereal, con el molido adicional, por consiguiente con un aumento del grado de finura, aumenta la fracción de contenido de fibra cruda y cáscara en la harina, en ello la fracción de almidón es menor. De allí que el grado de finura se refleja también en el denominado tipo de harina, el cual es empleado como información numérica para clasificar las harinas, en particular de harinas de cereales y el cual descansa en el contenido de cenizas de harina (denominada escala de ceniza). El tipo de harina o bien el tipo numérico indica la cantidad de cenizas (materia mineral) en mg, que permanece en la calcinación de 100 g de sustancia seca de harina. Para harina de cereales, un tipo numérico elevado significa un alto grado de finura, puesto que el núcleo del grano de cereal contiene aproximadamente 0,4 % en peso, mientras que la cáscara contiene aproximadamente 5 % en peso de cenizas. En los grados de finura bajos la harina de cereales consiste por consiguiente de modo predominante en el cuerpo de la harina desmenuzado, es decir el componente de almidón de grano de cereal; en los grados de finura altos la harina de cereal contiene también la capa de aleurona que contiene proteína del grano de cereal, en el grano partido también los componentes del germen que contienen proteínas y grasas, así como la fibra cruda y cáscaras de semilla que contienen cenizas. Para el propósito acorde con la invención se prefieren básicamente harinas con

un elevado grado de finura o bien un elevado tipo numérico. Si se emplean cereales como fuente de almidón entonces preferiblemente se muelen los granos enteros con cáscara y se procesan de nuevo dado el caso después de una previa separación mecánica del germen y cáscara.

- 5 De acuerdo con la invención, el material molido empleado contiene por lo menos una parte, preferiblemente por lo menos 20 % en peso, en particular por lo menos 50 % en peso, especialmente por lo menos 90 % en peso y muy especialmente por lo menos 99 % en peso del componente sólido que no contiene almidón presente en los granos molinos de cereal, correspondiente al grado de finura. Referido al componente que contiene almidón del material molido (y con ello a la cantidad de azúcar metabolizable en el medio que contiene dextrina (1)) la fracción del componente sólido que no contiene almidón en el material molido asciende a preferiblemente por lo menos 10 % en peso y en particular por lo menos 15 % en peso, por ejemplo en el rango de 15 a 75 % en peso y especialmente en el rango de 20 a 60 % en peso.

- 15 El material molido suministrado para la licuefacción es mezclado en la etapa a2) de acuerdo con la invención con un líquido acuoso, por ejemplo agua fresca, agua de proceso recirculada, por ejemplo de una fermentación subsiguiente o con una mezcla de éstos líquidos. Con esto, se obtiene por regla general una suspensión acuosa. Por regla general se mezcla una cantidad tal de la fuente de almidón o bien del material molido con el líquido acuoso y se licúa en éste de modo que el líquido acuoso (1) obtenido que contiene dextrina exhibe una concentración de equivalentes de glucosa de por lo menos 40 % en peso, referido al peso total del medio (1). El contenido de masa seca del medio (1) así obtenido es típicamente de por lo menos 50 % en peso, referido al peso total del medio (1).

- 20 Para la ejecución del método acorde con la intención es posible atemperar previamente el líquido acuoso empleado para la suspensión del material sólido molido, a una temperatura ligeramente elevada, por ejemplo en el rango de 40 a 60 °C. Sin embargo, preferiblemente se emplean los líquidos a temperatura ambiente.

- 25 Para la ejecución de la licuefacción de la fracción de almidón en el material molido según la etapa a2) ha probado ser ventajoso mezclar con el líquido acuoso sólo antes del comienzo de la licuefacción una cantidad parcial del material total molido y añadir al líquido acuoso el material molido restante en el curso de la licuefacción, de modo continuo o discontinuo.

La licuefacción del material molido según la etapa a2) puede ocurrir según métodos comunes conocidos por los expertos, por ejemplo según los métodos descritos en el citado al comienzo "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", capítulo 2, pp. 7 a 23.

- 30 De acuerdo con la invención, la licuefacción ocurre en la etapa a2) en presencia de por lo menos una enzima que hace la licuefacción. Con esto pueden emplearse básicamente todas las enzimas que licúan el almidón, en particular  $\alpha$ -amilasas (clase de enzima EC 3.2.1.1), por ejemplo  $\alpha$ -amilasas, que fueron obtenidas a partir de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus stearothermophilus* y especialmente aquellos que son empleadas para la licuefacción de materiales obtenidos mediante el método de molienda en seco en el marco de la producción de bioetanol. Las  $\alpha$ -amilasas adecuadas para la licuefacción son obtenibles también comercialmente por ejemplo de Novozymes bajo la denominación Termamyl 120 L, tipo L; o de Genencor bajo la denominación Spezyme. También puede emplearse para la licuefacción una combinación de diferentes  $\alpha$ -amilasas.

- 40 Con esto se obtiene un líquido acuoso el cual contiene la fracción licuada de almidón del material molido, típicamente dextrinas con por regla general 3 a 18, en particular 6 a 12 unidades de monosacáridos, dado el caso otros oligosacáridos, dado el caso pequeñas cantidades de mono- y/o disacáridos (por regla general < 30 % en peso, frecuentemente < 25 % en peso, < 20 % en peso, en particular < 10 % en peso, referido a la cantidad total de mono-, di- y oligosacáridos) así como el componente que no contiene almidón del material molido, en particular el componente sólido que no contiene almidón del material molido empleado para la licuefacción.

- 45 De modo ventajoso se eligen las cantidades de enzima que va a licuar el almidón y de material molido de modo que la viscosidad durante el procedimiento de gelificación se reduce suficientemente, para hacer posible una mezcla efectiva de la suspensión, por ejemplo mediante agitación. Preferiblemente durante la gelificación la viscosidad de la mezcla de reacción es de máximo 20 Pas, de modo particular preferiblemente máximo 15 Pas y muy particularmente preferiblemente máximo 8 Pas. La medición de la viscosidad ocurre por regla general con un viscosímetro Haake tipo Roto Visko RV20 con sistema de medida M5 y equipo de medición MVDIN a una temperatura de 50 °C y una velocidad de corte de 200 s<sup>-1</sup>.

- 50 La  $\alpha$ -amilasa (o bien la enzima empleada para licuar el almidón) puede ser colocada en un recipiente de reacción o ser añadida el curso de la etapa a2). Preferiblemente se añade una cantidad parcial  $\alpha$ -amilasa requerida en la etapa a2) al comienzo de la etapa a2) o se coloca esta cantidad parcial en el reactor. La cantidad parcial de  $\alpha$ -amilasa está comúnmente en el rango de 0,002 a 3,0 % en peso, preferiblemente de 0,01 a 1,5 % en peso, y de modo particular preferiblemente de 0,02 a 0,5 % en peso, referido la cantidad total de la fuente empleada de almidón.

Esta licuefacción puede ser ejecutada por encima o por debajo de la temperatura de gelificación. La licuefacción ocurre preferiblemente en la etapa a2) por lo menos a veces por encima de la temperatura de gelificación o bien temperatura de gelatinización del almidón empleado (denominado proceso de cocción). La temperatura requerida para esto para cada almidón es conocida por los expertos (ver el citado al principio "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", capítulo 2, p. 11) o puede ser determinada en experimentos de rutina. Por regla general se elige una temperatura en el rango de 80 a 165 °C, preferiblemente en el rango de 90 a 150 °C y de modo particular preferiblemente en el rango de 100 a 140 °C, donde por regla general la temperatura está por lo menos 5 K, preferiblemente por lo menos 10 K, y de modo particular preferiblemente por lo menos 20 K, por ejemplo 10 a 100 K, en particular 20 a 80 K por encima de la temperatura de gelificación. A estas temperaturas se destruye la estructura granular del almidón (gelificación), con lo cual se hace posible la degradación enzimática.

Para un efecto óptimo de la  $\alpha$ -amilasa (o bien de la enzima empleada para licuar el almidón) se ejecuta la etapa a2) preferiblemente por lo menos a veces en el pH óptimo de la enzima que licúa el almidón, frecuentemente un valor de pH en el rango ácido débil, preferiblemente entre 4,0 y 7,0, de modo particular preferiblemente entre 5,0 a 6,5, donde comúnmente el ajuste del pH se hace antes del comienzo de la etapa a2); preferiblemente se controla este valor del pH durante la licuefacción y dado el caso se ajusta posteriormente. El ajuste del valor de pH ocurre preferiblemente con ácidos minerales diluidos como  $H_2SO_4$  o  $H_3PO_4$  o bien con lejías alcalinas diluidas como NaOH o KOH.

En una forma preferida de operar en la licuefacción de la fracción de almidón en el material molido según la etapa a2), se añade al líquido acuoso de modo continuo o discontinuo, por lo menos una cantidad parcial del material molido. Para esto se añade preferiblemente al reactor en el curso de la licuefacción por lo menos 40 % en peso, en particular por lo menos 50 % en peso y muy particularmente preferiblemente por lo menos 55 % en peso. Frecuentemente la cantidad añadida no supera 90 % en peso, en particular 85 % en peso y de modo particular preferiblemente 80 % en peso. Preferiblemente se alimenta al reactor la cantidad parcial añadida en la corrida de material molido, bajo condiciones como las que están presentes en la licuefacción. La adición puede ocurrir de modo discontinuo, es decir por porciones en varias fracciones parciales, las cuales en cada caso preferiblemente no equivalen a más de 30 % en peso, de modo particular preferiblemente no más de 20 % en peso, por ejemplo 1 a 30 % en peso y en particular 2 a 20 % en peso de la cantidad total del material molido que va a ser licuado, o puede ocurrir de modo continuo. Para esta forma de operar es esencial que al comienzo de la licuefacción en el reactor esté presente sólo una parte del material molido, preferiblemente no más de 60 % en peso, en particular no más de 50 % en peso y de modo particular preferiblemente no más de 45 % en peso del material molido y la cantidad restante del material molido sea añadida durante la licuefacción.

La licuefacción puede también ser ejecutada de modo continuo, por ejemplo en una cascada de reacción de varias etapas.

En una forma preferida de operar se ejecuta la etapa a2) del método acorde con la invención de modo que primero se suspende en el líquido acuoso una cantidad parcial de como máximo 60 % en peso, preferiblemente como máximo 50 % en peso y de modo particular preferiblemente como máximo 45 % en peso, por ejemplo 10 a 60 % en peso, en particular 15 a 50 % en peso y de modo particular preferiblemente 20 a 45 % en peso, referido a la cantidad total de material molido y se ejecuta a continuación la licuefacción.

En una forma de operar la adición de una cantidad parcial del material molido ocurre de modo continuo o discontinuo, en particular por porciones en presencia de la por lo menos una  $\alpha$ -amilasa de modo que la viscosidad del medio líquido es de máximo 20 Pas, preferiblemente máximo 15 Pas y de modo particular preferiblemente máximo 8 Pas. Para apoyar el control de la viscosidad ha probado ser ventajoso, cuando se añade por lo menos 25 % en peso, preferiblemente por lo menos 35 % en peso y de modo particular preferiblemente por lo menos 50 % en peso de la cantidad total de material molido añadido, a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización del almidón presente en el material molido. Además, los controles de la viscosidad pueden ser influenciados mediante la adición por porciones de por lo menos una enzima que licúa el almidón, preferiblemente una  $\alpha$ -amilasa, o/y la por lo menos una enzima sacarificante, preferiblemente una glucoamilasa.

Para la ejecución del método acorde con la invención es posible atemperar previamente el líquido acuoso empleado para suspender el material sólido molido a una temperatura ligeramente elevada, por ejemplo en el rango de 40 a 60 °C. sin embargo, se prefiere emplear los líquidos a temperatura ambiente.

A la suspensión del material molido se añade entonces la por lo menos una enzima que licúa el almidón, preferiblemente una  $\alpha$ -amilasa. Si se alimenta una cantidad parcial del material molido en el transcurso de la licuefacción, entonces se añade al comienzo de modo ventajoso sólo una cantidad parcial de la  $\alpha$ -amilasa, por ejemplo 10 a 70 % en peso y en particular 20 a 65 % en peso, referida a la totalidad de la  $\alpha$ -amilasa empleada en la etapa a2). La cantidad de  $\alpha$ -amilasa añadida hasta este punto de tiempo se acomoda en este caso a la actividad de la respectiva  $\alpha$ -amilasa respecto a la fuente empleada de almidón bajo las condiciones de reacción y está

comúnmente en el rango de 0,0004 a 2,0 % en peso, preferiblemente de 0,001 a 1,0 % en peso y de modo particular preferiblemente de 0,02 a 0,3 % en peso, referido a la cantidad total de la fuente empleada de almidón. Con esto, de modo alternativo puede mezclarse la cantidad parcial de la  $\alpha$ -amilasa con el líquido empleado antes de la preparación de la suspensión.

- 5 Preferiblemente se añade a la suspensión la cantidad empleada a la cantidad parcial de  $\alpha$ -amilasa antes del comienzo del calentamiento a la temperatura aplicada para la licuefacción, en particular a temperatura ambiente o temperatura sólo ligeramente elevada, por ejemplo en el rango de 20 a 30 °C.

- 10 Se calienta la suspensión así preparada entonces preferiblemente a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación del almidón empleado. Por regla general se elige una temperatura en el rango de 80 a 165 °C, preferiblemente en el rango de 90 a 150 °C, y de modo particular preferiblemente en el rango de 100 a 140 °C, en donde por regla general la temperatura está por lo menos 5 K, preferiblemente por lo menos 10 K y de modo particular preferiblemente por lo menos 20 K, por ejemplo 10 a 100 K, en particular 20 a 80 K por encima de la temperatura de gelificación. Bajo vigilancia de la viscosidad se añaden a la suspensión que contiene almidón dado el caso poco a poco otras cantidades parciales de la fuente del almidón, por ejemplo en cada caso 1 a 30 % en peso y en particular 2 a 20 % en peso referido a la cantidad total empleada de material molido. En este caso se añade a la mezcla de reacción preferiblemente la cantidad parcial que se va a añadir en el curso de la licuefacción, de material molido en por lo menos 2, preferiblemente por lo menos 4 y de modo particular preferiblemente por lo menos 6 porciones parciales. De modo alternativo, en esta forma de operar la adición de la cantidad parcial no empleada en la preparación de la suspensión del material molido, puede ocurrir de modo continuo durante la licuefacción. De modo ventajoso, la temperatura durante la adición debería mantenerse por encima de la temperatura de gelificación del almidón.

- 25 Después de alcanzar la temperatura deseada o bien dado el caso después de la completa adición de la harina, se mantiene la mezcla de reacción comúnmente aún por un tiempo, por ejemplo 10 a 60 minutos o más en tanto sea necesario, a la temperatura ajustada por encima de la temperatura de gelificación del almidón, es decir se cocina. Entonces se enfría la mezcla de reacción, por regla general a una temperatura ligeramente inferior, sin embargo preferiblemente superior a la temperatura de gelificación, por ejemplo a 70 a 90 °C. A continuación se añade dado el caso otras cantidades parciales de  $\alpha$ -amilasa, preferiblemente la cantidad principal. En este caso la cantidad de  $\alpha$ -amilasa que se va a añadir en este punto tiempo, dependiendo de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa empleada bajo las condiciones de reacción, es preferiblemente 0,002 a 2,0 % en peso, de modo particular preferiblemente de 0,01 a 1,0 % en peso y de modo muy particular preferiblemente de 0,02 a 0,4 % en peso, referido a la cantidad total de la fuente empleada de almidón.

- 35 Para la degradación total del almidón hasta dextrinas se mantiene la mezcla de reacción por el tiempo necesario a la temperatura ajustada o dado el caso se calienta nuevamente, hasta que la evidencia de almidón con yodo o dado el caso con otra prueba para evidenciar el almidón se vuelve negativa o por lo menos esencialmente negativa. Con esto, dado el caso pueden añadirse a la mezcla de reacción aún una o más cantidades parciales adicionales que  $\alpha$ -amilasa, por ejemplo en el rango de 0,001 a 0,5 % en peso y preferiblemente 0,002 a 0,2 % en peso, referido a la cantidad total de la fuente empleada de almidón.

- 40 De modo alternativo puede calentarse la suspensión acuosa que contiene el material molido para la licuefacción de la fracción de almidón primero mediante introducción del vapor de agua a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización del almidón presente en la fuente de almidón o bien en el material molido. Típicamente se calienta a una temperatura que esta por lo menos 10 K y en particular por lo menos 20 K, por ejemplo 10 a 100 K, en particular 20 a 80 K, por encima de la respectiva temperatura de gelatinización. En particular se calienta la suspensión a temperaturas en el rango de 90 a 150 °C, y especialmente en el rango de 100 a 140 °C.

- 45 El vapor de agua empleado para el calentamiento es típicamente vapor de agua sobrecalentado, el cual exhibe una temperatura de por lo menos 105 °C, en particular por lo menos 110 °C, por ejemplo 110 a 210 °C. Preferiblemente se aplica a la suspensión el vapor con sobrepresión. De acuerdo con ello, el vapor exhibe preferiblemente una presión de por lo menos 1,5 bar, por ejemplo 1,5 a 16 bar, en particular 2 a 12 bar.

- 50 Por regla general, la introducción del vapor de agua a la suspensión ocurre de modo que a la suspensión se alimenta el vapor con sobrepresión, preferiblemente una sobrepresión de 1 a 10 o 11 bar, en particular 1,5 a 5 bar y preferiblemente con elevada velocidad. Mediante la alimentación del vapor se calienta la suspensión inmediatamente a temperaturas por encima de 90 °C, por consiguiente a temperaturas superiores a la temperatura de gelatinización.

- 55 Preferiblemente el calentamiento ocurre con vapor de agua en un dispositivo que trabaja de modo continuo en el cual se inyecta la suspensión de modo continuo con una presión de elevación determinada, la cual resulta de la viscosidad de la suspensión, de la velocidad de transporte y de la geometría del dispositivo y en el ámbito de la inyección de la suspensión se inyecta con el vapor caliente con sobrepresión, referido a la presión de transporte,

mediante una tobera ajustable. Mediante la inyección del vapor con sobrepresión no sólo se calienta la suspensión sino que se aplica también energía mecánica en el sistema la cual promueve una desintegración adicional de las partículas del material molido, provoca una introducción simultánea de energía particular, y con ello tiene como consecuencia una particular y simultánea gelatinización de las partículas granulares de almidón en el material molido. Típicamente, estos dispositivos tienen una geometría tubular. Preferiblemente la alimentación del vapor ocurre en dirección del eje longitudinal del dispositivo tubular. El suministro de la suspensión ocurre por regla general en un ángulo de por lo menos 45° o perpendicular a él. La tobera ajustable exhibe típicamente una geometría cónica, la cual tiene la reducción de diámetro en la dirección del flujo del vapor. En esta tobera está dispuesta una aguja o un bolo dispuesto sobre una vara que se desplaza en dirección longitudinal. La aguja o bien el bolo forman con el cono de la tobera una rendija. Mediante el desplazamiento de la aguja o bien de la vara en dirección longitudinal se ajusta fácilmente el tamaño de la rendija y con ello la superficie de sección transversal de apertura de la tobera con lo cual puede regularse fácilmente la velocidad de alimentación del vapor.

Típicamente, este dispositivo exhibe además un tubo de mezcla en el cual se transporta la suspensión después de la alimentación de vapor y es descargada del dispositivo. Comúnmente este tubo de mezcla está dispuesto en dirección de la alimentación de vapor y perpendicular al suministro. Típicamente el tubo de mezcla forma con la tobera una rendija, a través de la cual se transporta la suspensión. Mediante esta rendija se ejerce en el transporte adicional fuerza de corte sobre la suspensión y se eleva con ello la entrada de energía mecánica en la suspensión. El tubo de mezcla puede estar dispuesto de modo que se pueda desplazar en dirección longitudinal. Mediante el desplazamiento del tubo de mezcla se ajusta de manera fácil el tamaño de la apertura de la rendija y con ello el gradiente de presión en el dispositivo.

En el estado de la técnica se conocen tales dispositivos bajo la denominación de hervidor de inyección, por ejemplo el dispositivo representado en "The Alcohol Textbook", capítulo 2, loc. cit., Figura 13 y obtenible comercialmente por ejemplo bajo la denominación HYDROHEATER® de la compañía Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, USA.

En la conducción continua de la reacción se transporta la suspensión tratada con vapor por regla general a continuación de ello a una zona de postreacción, para continuar la gelificación del componente de almidón. En la zona de postreacción prevalece típicamente sobrepresión, típicamente una presión absoluta en el rango de 2 a 8 bar. Típicamente las temperaturas en la zona de postreacción están en el rango de 90 a 150 °C. El tiempo de residencia en esta zona de postreacción puede estar, dependiendo de la temperatura de la suspensión, en el rango de 1 min a 4 h. Las zonas de postreacción exhiben típicamente una geometría tubular o de columna. En una forma de operar la zona de postreacción exhibe la geometría de una columna dispuesta perpendicularmente. Con esto, después de abandonar el dispositivo para el tratamiento con vapor, se aplica la suspensión en la zona superior de la columna y se saca por la zona inferior. En otra forma de operar de la invención, la zona de postreacción exhibe una geometría tubular.

Por regla general después de abandonar la zona de postreacción, se alivia la presión de la suspensión y se ejecuta entonces una licuefacción. Preferiblemente se ejecuta el alivio de presión como una evaporación repentina, para enfriar la suspensión, preferiblemente a temperaturas por debajo de 100 °C, en particular por debajo de 85 °C. Por regla general ocurre entonces una licuefacción del almidón así convertido en soluble, en recipientes separados de reacción. La licuefacción puede ser ejecutada de la forma descrita arriba.

En una forma preferida de operar de la invención se coloca en la suspensión del material molido en el líquido acuoso por lo menos una parte o la cantidad total, por regla general por lo menos 50 %, en particular por lo menos 80 % de la cantidad total o la cantidad total de la enzima que licúa el almidón antes del calentamiento con vapor de agua. De esta forma ocurre la licuefacción y ya durante el calentamiento a temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización. De modo correspondiente, se ejecutan el calentamiento con vapor de agua y la fase de postreacción. Puede omitirse una subsiguiente licuefacción en un recipiente separado de reacción. Sin embargo, preferiblemente se ejecuta una licuefacción así para completar la degradación del almidón hasta dextrinas.

Para la estabilización de la enzima empleada puede ajustarse dado el caso la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , por ejemplo con  $\text{CaCl}_2$ , a un valor óptimo específico de la enzima. A partir de experimentos de rutina los expertos pueden determinar los valores de concentración adecuados. Por ejemplo, si se emplea Termamyl como  $\beta$  amilasa, entonces es ventajoso por ejemplo ajustar una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de por ejemplo 10 a 100 ppm, preferiblemente 20 a 80 ppm y de modo particularmente preferiblemente aproximadamente 30 a 70 ppm en el medio líquido, donde la información es ppm referido al peso y significa g/1000kg.

Para la degradación completa del almidón hasta dextrinas se mantiene la mezcla de reacción a la temperatura ajustada por el tiempo necesario, hasta que la evidencia de almidón con yodo o dado el caso otra prueba se vuelve negativa o por lo menos esencialmente negativa. Con esto pueden añadirse a la mezcla de reacción dado el caso aún una o varias cantidades parciales adicionales de  $\alpha$ -amilasa, por ejemplo en el rango de 0,001 a 0,5 % en peso y preferiblemente 0,002 a 0,2 % en peso, referida a la cantidad total de la fuente empleada de almidón.

- Puesto que para la producción de líquido (1) que contiene dextrina se emplea por regla general material molido, el cual contiene esencialmente todos o casi todos los componentes de la fuente de almidón, o por lo menos parte del almidón, también una parte de componentes sólidos que no contienen almidón (es decir no se ha hecho una separación completa de los componentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón), el líquido
- 5 obtenido (1) que contiene dextrina incluye también una parte o la cantidad total de los componentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón. Esto determina frecuentemente la contaminación con una fracción no despreciable de fitato, por ejemplo del cereal. Para evitar el efecto inhibidor resultante de ello, se añade ventajosamente en la etapa a2) al medio (1) por lo menos una fitasa, antes de que se alimente a una etapa de fermentación. La adición de la fitasa puede ocurrir antes, durante o después de la licuefacción, en tanto ella exhiba
- 10 en cada caso la estabilidad requerida al calor. Puede emplearse cualquier fitasa en tanto en todo caso respectivamente su actividad no sea esencialmente limitada bajo las condiciones de reacción. Se prefieren las fitasas con un estabilidad a la temperatura (T50) > 50 °C y de modo particular preferiblemente > 60 °C. La cantidad de fitasa es comúnmente de 1 a 10000 unidades/kg de fuente de almidón y en particular 10 a 4000 unidades/kg de fuente de almidón.
- 15 Ha probado ser ventajoso añadir durante la producción al líquido (1) que contiene dextrina además otras enzimas, por ejemplo pullulasas, celulasas, hemicelulasas, glucanasas, xilanasas o proteasas. La adición de estas enzimas pueden influir positivamente en la viscosidad, es decir reducir (por ejemplo mediante escisión de glucanos y/o de (arabino) xilanos) de cadena larga (también definidos como cadenas largas), causar la liberación de glucósidos metabolizables y la eliminación de almidón (residual). El empleo de proteasas tiene efectos positivos análogos,
- 20 donde adicionalmente pueden liberarse aminoácidos como factores de crecimiento para la fermentación.
- El líquido (1) que contiene dextrina obtenido en la etapa a2) exhibe por regla general una concentración de equivalentes de glucosa de por lo menos 20 % en peso (= 200 g/kg), en particular por lo menos 40 % en peso y especialmente por lo menos 50 % en peso, frecuentemente en el rango de 30 a 75 % en peso, preferiblemente en el rango de 40 a 70 % en peso, en particular en el rango de 50 a 65 % en peso, referido en cada caso al peso total del
- 25 medio (1).
- El contenido de masa seca en el líquido (1) así obtenido es típicamente de por lo menos 25 % en peso, preferiblemente por lo menos 40 % en peso, en particular por lo menos 50 % en peso, especialmente por lo menos 60 % en peso, y por regla general no supera 80 % en peso, referido en cada caso al peso total del medio (1).
- 30 Los equivalentes de glucosa presentes en el líquido (1) así obtenido que contiene dextrina están esencialmente en forma de oligosacáridos, en particular dextrinas. Típicamente, el componente principal de estos oligosacáridos o bien dextrinas es glucosa, donde el medio también puede contener pequeñas cantidades de mono- y/o disacáridos y unidades de oligosacáridos constituidos de otras unidades de monosacáridos. Típicamente los componentes que contienen azúcar en el medio (1) que contiene dextrina, es decir los mono-, di- y oligosacáridos, incluyen una fracción de oligosacáridos, en particular dextrinas de por lo menos 70 % en peso, frecuentemente por lo menos 75 %
- 35 en peso en particular por lo menos 80 % en peso, en especial por lo menos 90 % en peso, es decir la fracción de mono- y disacáridos es menor a 30 % en peso, frecuentemente menor a 25 % en peso, en particular menor a 20 % en peso y en especial menor a 10 % en peso. Comúnmente la fracción de glucosa, en forma libre o enlazada, bajo equivalentes de glucosa del medio (1) está en el rango de 50 a 99 % en peso, en particular de 75 a 97 % en peso y especialmente de 80 a 95 % en peso, referido a la cantidad total de equivalentes de glucosa.
- 40 El líquido acuoso (1) que contiene dextrina obtenido en la etapa a2) es, de acuerdo con la invención, empleado en la etapa b) para la producción fermentativa del compuesto orgánico deseado. Para esto se suministra el líquido (1) que contiene dextrina a una fermentación, lo que sirve para el cultivo de los microorganismos empleados. Con esto se obtiene como producto metabólico microbiano el respectivo compuesto orgánico volátil o no volátil.
- 45 Por regla general se emplea el líquido acuoso (1) obtenido que contiene dextrina bajo omisión de un tanque separado de sacarificación, directamente a una fermentación según la etapa b). Por regla general se enfría el líquido (1) que contiene dextrina a la temperatura de fermentación comúnmente en el rango de 32 a 37 °C, antes de suministrarlo a la fermentación.
- Dado el caso, el líquido acuoso (1) que contiene dextrina puede ser esterilizado antes de la fermentación, donde se matan los microorganismos comúnmente mediante métodos térmicos o químicos. Con esto por ejemplo se calienta el líquido (1) acuoso que contiene dextrina a temperaturas comúnmente superiores a 80 °C. La muerte o bien lisis de las células pueden ocurrir inmediatamente antes de la fermentación. Para esto se suministra la totalidad del líquido
- 50 (1) que contiene dextrina a la lisis o bien muerte. Estas pueden ocurrir térmica, mecánica o químicamente. Sin embargo, en el marco del método acorde con la invención ha probado no ser necesario, ejecutar antes de la fermentación una etapa de esterilización como se describe aquí, sino que más bien ha probado ser ventajoso no
- 55 ejecutar tal etapa de esterilización. Por consiguiente una forma preferida de operar de la invención se refiere a un método, en el cual el medio (1) obtenido en la etapa a2) es suministrado inmediatamente, es decir sin esterilización previa, a la fermentación.

De acuerdo con la invención, en la fermentación ocurre el metabolismo de las dextrinas esencialmente sin adición de enzima sacarificante. Con esto las dextrinas son metabolizadas por los microorganismos, presumiblemente después de que ellas fueron hidrolizadas mediante enzimas sacarificantes de la cepa propia, por ejemplo glucoamilasas de género propio. Presumiblemente mediante los microorganismos ocurre una sacarificación de los componentes

De allí que los microorganismos empleados para la fermentación son elegidos de entre microorganismos que expresan o bien producen la enzima que hidroliza dextrinas hasta monosacáridos, en particular por aquellas que expresan o bien producen glucoamilasas. Tales microorganismos son conocidos por los expertos, o pueden ser determinados mediante experimentos de rutina, por ejemplo métodos de tamizaje, por ejemplo mediante tamizaje de glucoamilasa, por ejemplo mediante absorción del microorganismo en el recipiente de prueba de agitación con subsiguiente prueba de actividad enzimática para glucoamilasa, o mediante tamizaje con ayuda de cebador/sondas según el método de tamizaje descrito en la parte de ejemplos, así como por investigación en bancos de datos en bancos de datos de enzimas,

- Brenda [Schomburg I., Chang A., Hofmann O., Ebeling C., Ehrentreich F., Schomburg D. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. Trends Biochem Sci. 2002 Jan;27(1):54-6.],

- Swissprot [Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.-C., Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O'Donovan C., Phan L., Pilbout S., Schneider M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL en 2003 Nucleic Acids Res. 31:365-370(2003)],

- ERGO-WIT [Overbeek R, Larsen N, Walunas T, D'Souza M, Pusch G, Selkov E Jr, Liolios K, Joukov V, Kaznadzey D, Anderson I, Bhattacharyya A, Burd H, Gardner W, Hanke P, Kapatral V, Mikhailova N, Vasieva O, Osterman A, mVonstein V, Fonstein M, Ivanova N, Kypides N. The ERGO(TM) genome analysis and discovery system. Nucleic Acids Res 2003 Jan 1;31(1): 164-71; Overbeek R, Larsen N, Pusch GD, D'Souza M, Selkov E Jr, Kypides N, Fonstein M, Maltsev N, Selkov E. WIT: integrated system for high-throughput genome sequence analysis and metabolic reconstruction. Nucleic Acids Research, 2000; Vol. 28, No.1: 123-125],

- CAZY [Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afnib.cnrs-mrs.fr/CAZY/>; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. en "Recent Advances en Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12] und

- PIR [Cathy H. Wu, Lai-Su L. Yeh, Hongzhan Huang, Leslie Arminski, Jorge Castro-Alvear, Yongxing Chen, Zhang-Zhi Hu, Robert S. Ledley, Panagiotis Kourtesis, Baris E. Suzek, C. R. Vinayaka, Jian Zhang, and Winona C. Barker. The Protein Information Resource. Nucleic Acids Research, 31: 345-347, 2003.]

según el método descrito en la parte de los ejemplos.

Son ejemplos de microorganismos adecuados con actividad de glucoamilasa *Agrobacterium tumefaciens*, *Arxula adenivorans*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus kawachi*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus shirousami*, *Aspergillus terreus*, *Athelia rolfsii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Beta vulgaris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida glabrata*, *Candida tsukubaensis*, *Caulobacter crescentus*, *Cephalosporium charticola*, *Cephalosporium eichhorniae*, *Ceratocystis paradoxa*, *Chaetomium thermophilum*, *Chlorobium tepidum*, *Chromobacterium violaceum*, *Cladosporium resinae*, *Clostridium* sp., *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Coniophora puteana*, *Corticium rolfsii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Emericella nidulans*, *Endomyces* sp., *Endomycopsis fibuligera*, *Fusarium venenatum*, *Haloarcula marismortui*, *Hormoconis resinae*, *Humicola grisea*, *Humicola lanuginosa*, *Hypocrea lixii*, *Kluyveromyces lactis*, *Lentinula edodes*, *Lipomyces kononenkoae*, *Magnaporthe grisea*, *Mesorhizobium loti*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Monascus rubiginosus*, *Monascus* sp., *Mucor rouxianus*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Myrothecium* sp., *Neurospora crassa*, *Nostoc punctiforme*, *Oryza sativa*, *Paecilomyces variotii*, *Penaeus japonicus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxalicum*, *Picrophilus torridus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, *Rana japonica*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizopus deleamar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Shewanella oneidensis*, *Sphingomonas aromaticivorans*, *Streptomyces coelicolor*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Talaromyces emersonii*,

*Termitomyces clypeatus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoproteus tenax*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* y *Trichosporon adeninovorans*.

- 5 En tanto los microorganismos empleados para la fermentación expresen glucoamilasas de cepa propia, puede ajustarse el pH del medio de fermentación a un valor en el rango óptimo de acción para la glucoamilasa, por ejemplo a un valor en el rango entre 3,5 y 6,0. Frecuentemente se ajusta el valor del pH a un valor óptimo para la fermentación, el cual puede estar fuera del rango mencionado, por ejemplo en el rango de 6,0 a 8,0. A pesar de la limitada actividad de muchas glucoamilasas, en la fermentación esto puede ser necesario o en total ventajoso, en este rango de pH debido a las condiciones de fermentación que se van a ajustar, las cuales son acomodadas en particular al respectivo microorganismo. El rango de valor de pH óptimo para la fermentación puede ser determinado por el experto mediante experimentos de rutina.

- 15 Para alcanzar una transformación amplia de la dextrina aplicada al medio (1) en el medio de fermentación, se mantiene el medio de fermentación a la temperatura ajustada comúnmente por un periodo de tiempo de por ejemplo 2 a 72 horas o dado el caso más, por ejemplo 2 a 96 horas, en particular de 5 a 48 horas. Típicamente, los monosacáridos obtenidos mediante hidrólisis a partir de las dextrinas, en particular glucosa, son metabolizados muy rápidamente por los microorganismos, de modo que por regla general no se puede evidenciar una alta concentración de monosacáridos o bien glucosa.

La ejecución de la fermentación puede ocurrir de manera y formas conocidas por el experto. Para esto por regla general se cultiva el respectivo microorganismo deseado en el medio líquido obtenido según el método descrito aquí.

- 20 El método de fermentación puede ser operado tanto en forma discontinua (forma de lote), también de modo semicontinuo (métodos de operación de alimentación en lote, inclusive alimentación en lote con recogida intermedia), donde se prefiere el método de operación semicontinua.

- 25 Por ejemplo puede inocularse con el microorganismo deseado el medio (1) obtenido según el método acorde con la invención, dado el caso junto con una fuente convencional de azúcar, es decir mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables o medios metabolizables que contienen mono-, di- y/u oligosacáridos, dado el caso después de dilución con agua y adición de componentes comunes del medio como tampones, sales nutritivas, fuentes de nitrógeno como sulfato de amonio, urea, etc., componentes complejos nutritivos del medio que contienen aminoácidos como extracto de levadura, peptona, CSL y similares, y multiplicar el microorganismo bajo condiciones de fermentación hasta que la concentración de microorganismos alcanza el estado estacionario deseado para la fermentación. Con esto se metabolizan las dextrinas presentes en el medio de fermentación y se forma el metabolito deseado (denominada forma de operar en lote o fase en lote)

En la forma de alimentación en lote, a continuación de la fase de lote, por ejemplo cuando la concentración total de azúcar desciende por debajo de un valor determinado, se añade el medio (1) al medio de fermentación en forma continua o discontinua.

- 35 Una modificación típica del método acorde con la invención es la forma de operar de alimentación por lote, la cual incluye las siguientes etapas:

b1) cultivo del microorganismo que tiene la capacidad de hacer la sobreproducción del compuesto orgánico en un medio acuoso de fermentación (2); y

- 40 b2) adición del medio (1) que contiene dextrina, dado el caso junto con una fuente convencional de azúcar, al medio de fermentación (2), en el cual las dextrinas contenidas en el medio (1) son metabolizadas por los microorganismos que realizan la sobreproducción del compuesto orgánico, dado el caso después de una sacarificación previa.

- 45 En la etapa b1) puede ajustarse primero por ejemplo un medio que contiene azúcar común, por regla general una solución de glucosa, o un medio líquido (1) acorde con la invención o una mezcla de (1) con una fuente convencional de azúcar, mediante dilución con un líquido acuoso, en particular agua, a una concentración adecuada de azúcar y añadir componentes comunes del medio como tampones, sales nutritivas, fuentes de nitrógeno como sulfato de amonio, urea, etc., componentes complejos nutritivos del medio que contienen aminoácidos como extracto de levadura, peptona, CSL y similares. Con esto por regla general preferiblemente se elige la relación de cantidad de azúcar a líquido de modo que la concentración total de monosacáridos en el medio de fermentación (2) es menor a 6 % en peso, por ejemplo en el rango de  $\geq 0$  a 5 % en peso, calculada como equivalente de glucosa y referida al peso total del medio de fermentación (2). El medio de lote que contiene azúcar así ajustado se inocula con el microorganismo deseado y se multiplica el microorganismo en el medio de lote (medio de fermentación (2)) bajo condiciones de fermentación hasta que la concentración de microorganismos alcanza un estado estacionario

deseado para la fermentación. Con esto se metaboliza el azúcar colocado en el medio de fermentación (2) y se forma el metabolito deseado.

En la siguiente fase de alimentación en lote se sostiene el proceso de fermentación mediante adición del medio (1) que contiene dextrina al medio de fermentación (2) y el metabolito obtenido por sobreproducción por el microorganismo se enriquece en el caldo de fermentación, donde el enriquecimiento puede ser intracelular como también extracelular. Con esto la relación de volumen del medio (1) suministrado al medio de lote (medio de fermentación (2)) que contiene los microorganismos que está presente está en general en el rango de aproximadamente 1:10 a 10:1, por ejemplo en el rango de 1:5 a 5:1 y en particular en el rango de 1:1 a 5:1. En particular mediante la velocidad de adición del medio (1) puede regularse la concentración de azúcar en el medio de fermentación (2). Por regla general se ajusta la velocidad de adición de modo que la concentración total de azúcar, es decir la suma de oligosacáridos y monosacáridos no supera un valor de 30 % en peso, en particular 20 % en peso. La concentración de monosacárido en el caldo de fermentación está preferiblemente en el rango de > 0 % en peso a aproximadamente 5 % en peso y es en particular no mayor a 3 % en peso.

En una forma preferida de operar en medio de fermentación (2) incluye en la etapa b1) (es decir aquí el medio de lote) esencialmente el medio (1) que contiene dextrina, el microorganismo capaz de hacer sobreproducción del compuesto orgánico, componentes comunes del medio como tampones, sales nutritivas, fuentes de nitrógeno como sulfato de amonio, urea, etc., componentes complejos nutritivos del medio que contienen aminoácidos como extracto de levadura, peptona, CSL y similares y dado el caso agua para la dilución. Con esto se diluye un medio (1) que contiene dextrina dado el caso hasta el contenido deseado del dextrina, por ejemplo en el rango de 15 a 30 % en peso, calculado como equivalente de glucosa referido al peso total del medio (1) que contiene dextrina, y se emplea este directamente para el ajuste del medio de fermentación (2) (medio de lote).

El contenido del dextrina del medio empleado que contiene dextrina para el sostenimiento de la fermentación según la etapa b2), es comúnmente mayor, por ejemplo a los rangos arriba mencionados, para minimizar la dilución del medio de fermentación (2).

Preferiblemente se procede de modo que se produce un medio (1) que contiene dextrina con un contenido elevado de dextrinas, por ejemplo por lo menos 30 % en peso, en especial por lo menos 40 % en peso y muy especialmente por lo menos 50 % en peso, calculado como equivalente de glucosa y referido al peso total del medio (1) que contiene dextrina. Se emplea este medio (1) entonces por un lado según la etapa b1) después de la dilución con agua para el ajuste de medio de lote (medio de fermentación (2)) y por el otro lado según la etapa b2) para la adición del medio de fermentación (2).

Mediante el empleo del medio (1) que contiene dextrina pueden producirse por vía fermentativa metabolitos volátiles y no volátiles, en particular metabolitos microbianos no volátiles con por lo menos 3 átomos de C o con por lo menos 2 átomos de C y 1 átomo de N.

Con esto se entiende por productos no volátiles aquellos compuestos, que se obtienen sin descomponerse mediante destilación del caldo de fermentación. Estos compuestos exhiben por regla general un punto de ebullición superior al punto de ebullición del agua, frecuentemente por encima de 150 °C y en particular por encima de 200 °C a presión normal. Por regla general son compuestos que en condiciones normales (298 K, 101,3 kPa) están presentes en estado sólido.

Sin embargo, también es posible emplear el medio (1) acuoso que contiene dextrina en una fermentación para la producción de metabolitos microbianos no volátiles, los cuales a presión normal exhiben un punto de fusión por debajo del punto de ebullición del agua y/o una consistencia aceitosa.

Aquí el concepto de producto metabólico microbiano no volátil incluye en particular ácidos orgánicos mono-, di- y tricarboxílicos, que dado el caso que portan 1 o varios, por ejemplo 1, 2, 3 o 4 grupos hidroxilo con preferiblemente 3 a 10 átomos de C, por ejemplo ácido tartárico, ácido itacónico, ácido succínico, ácido propiónico, ácido láctico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido 2,5-furanodicarboxílico, ácido glutárico, ácido levulínico, ácido glucónico, ácido aconítico y ácido diaminopimélico, ácido cítrico; aminoácidos proteinógenos y no-proteinógenos, por ejemplo lisina, glutamato, metionina, fenilalanina, ácido asparagínico, triptofano y treonina; bases de purina y pirimidina; nucleósidos y nucleótidos, por ejemplo nicotinamidadenindinucleótido (NAD) y adenosin-5'-monofosfato (AMP); lípidos; ácidos grasos saturados e insaturados con preferiblemente 10 a 22 átomos de C, por ejemplo ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico; dioles con preferiblemente 3 a 8 átomos de C, por ejemplo propanodiol y butanodiol; alcoholes polivalentes (también definidos como de alta valencia) con 3 o más, por ejemplo 3, 4, 5 o 6 grupos OH, por ejemplo glicerina, sorbitol, manitol, xilitol y arabitol; alcoholes de cadena larga (también definidos como cadenas largas) con por lo menos 4 átomos de C, por ejemplo con 4 a 22 átomos de C, por ejemplo butanol; hidratos de carbono, por ejemplo ácido hialurónico y trealosa; compuestos aromáticos, por ejemplo aminas aromáticas, vainillina e indigo; vitaminas y provitaminas, por ejemplo ácido ascórbico, vitamina B6, vitamina B12 y riboflavina, cofactores y los

- denominados nutracéuticos; proteínas, por ejemplo enzimas como amilasas, pectinasas, ácidos, celulasas híbridas o neutras, esterasas como lipasas, pancreasas, proteasas, xilanasas y oxidoreductasas como lactasa, catalasa y peroxidasa, glucanasas, fitasas; carotenoides, por ejemplo licopeno,  $\beta$ -caroteno, astaxantina, zeaxantina y cantaxantina; cetonas con preferiblemente 3 a 10 átomos de C y dado el caso 1 o varios grupos hidroxilo, por ejemplo acetona y acetoina; lactonas, por ejemplo  $\gamma$ -butirolactona, ciclodextrinas, biopolímeros, por ejemplo polihidroxiacetato, poliésteres, por ejemplo polilactida, polisacáridos, poliisoprenoides, poliamidas; así como precursores y derivados de los compuestos antes mencionados. Otros compuestos que entran en consideración como productos metabólicos microbianos no volátiles son descritos por Gutcho en Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086.
- 5
- 10 El concepto "cofactor" incluye compuestos no proteínicos, que son necesarios para la ocurrencia de una actividad enzimática normal. Estos compuestos pueden ser orgánicos o inorgánicos; preferiblemente las moléculas de cofactor acordes con la invención son orgánicas. Son ejemplos de tales moléculas NAD y nicotinamidadenindinucleotidofosfato (NADP); el precursor de estos cofactores es niacina.
- 15 El concepto "nutraceutico" incluye aditivos nutricionales, que son promotores de la salud en plantas y animales, en particular en los seres humanos. Son ejemplos de tales moléculas las vitaminas, antioxidantes y determinados lípidos, por ejemplo ácidos grasos poliinsaturados.
- En particular los productos metabólicos producidos son elegidos de entre enzimas, aminoácidos, vitaminas, disacáridos, ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos con 3 a 10 átomos de C, ácidos alifáticos hidroxycarboxílicos con 3 a 10 átomos de C, cetonas con 3 a 10 átomos de C, alcoholes con 4 a 10 átomos de C y alcanodíoles con 3 a 10 y en particular 3 a 8 átomos de C.
- 20 Los expertos entienden que los compuestos producidos por tal vía fermentativa son obtenidos en cada caso en la forma de enantiómeros producidos por los microorganismos empleados (en tanto existan diferentes enantiómeros). De este modo por ejemplo por regla general se obtiene de los aminoácidos el respectivo enantiómero L.
- 25 Los microorganismos empleados en la fermentación se acomodan de manera conocida a los respectivos productos metabólicos microbianos, como ilustra en detalle abajo. Ellos pueden ser de origen natural o genéticamente modificados. Ejemplos de microorganismos adecuados y métodos de fermentación se indican por ejemplo en la tabla A.

Tabla A:

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Ácido tartárico	<i>Lactobacilli</i> , (por ejemplo <i>Lactobacillus delbrueckii</i> )	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido itacónico	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus itaenicus</i> and	Jakubowska, en Smith u. Pateman (Hrsg.), Genetics Physiology of <i>Aspergillus</i> , London: Academic Press 1977; Miall, en Rose (Hrsg.), Economic Microbiology, Vol. 2, S. 47 -119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
Ácido succínico	<i>Actinobacillus</i> sp. 130Z, <i>Anaerobiospirillum succiniproducens</i> , <i>Actinobacillus succinogenes</i> , <i>E. coli</i>	Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498 -504 (1976); EP 249773 (1987), Erf.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), Erf.: Guettler, Jain u. Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 -342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., <i>Actinobacillus succinogenes</i> sp. nov., a novel succinic acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:207-16; US5723322, US5573931, US5521075, WO99/06532, US5869301, US 5770435

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Ácido hidroxipropiónico	<i>Lactobacillus delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> <i>od.</i> <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Ácido propiónico	<i>Propionibacterium</i> , <i>por ejemplo P. arabinosum</i> , <i>P. schermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>Clostridium propionicum</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido diaminopimélico	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 -373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996).
Ácido aconítico	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 -373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996).; Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995;
Ácido málico	<i>Aspergilli</i> , <i>por ejemplo Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Corynebacterium</i>	US 3063910
Ácido glucónico	<i>Aspergilli</i> , <i>por ejemplo A. niger</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido butírico	<i>Clostridium</i> ( <i>por ejemplo Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i> )	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995;
Ácido láctico	<i>Lactobacillus</i> <i>por ejemplo L. delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995;
Lisina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Glutamato	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Metionina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Fenilalanina	<i>Corynebacterium glutamicum E.coli</i>	Trends Biotechnol. 3, 64 -68 (1985); J. Ferment. Bioeng. 70, 253-260 (1990).
Treonina	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Ácido asparagínico	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35+dort. lit. cit., Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Bases purina y pirimidina	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Nicotinamidadenindinucleótido (NAD)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Adenosin-5'-monofosfato (AMP)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido $\gamma$ -linolénico	<i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends en Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido dihomo $\gamma$ -linolénico	<i>Mortierella</i> , <i>Conidiobolus</i> , <i>Saprolegnia spp.</i>	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends en Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido araquidónico	<i>Mortierella</i> , <i>Pythium spp.</i>	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends en Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Ácido eicosapentaenóico	<i>Mortierella</i> , <i>Phytium</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i>  spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends en Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido docosaheptaenóico	<i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> ,  <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends en Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Propanodiol	<i>E. coli</i>	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309
Butanodiol	<i>Enterobacter aerogenes</i> ," <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella</i> <i>oxytoca</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973); H. G. SCHLEGEL and H. W. JANNASCH, 1981; Afschar et al.: Mikrobielle Produktion de 2,3-Butandiol. CIT 64 (6), 2004, 570-571
Butanol	<i>Clostridium</i> (por ejemplo <i>Clostridium</i>  <i>acetobutylicum</i> , C. <i>propionicum</i> )	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Glicerina	<i>Levaduras</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>rouxii</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Manitol	<i>Aspergillus candida</i> , <i>Torulopsis</i>  <i>mannitofaciens</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Arabitol	<i>Saccharomyces rouxii</i> , <i>S.</i> <i>mellis</i> ,  <i>Sclerotium glucanicum</i> , <i>Pichia</i>  <i>ohmeri</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation,  Noyes Data Corporation (1973),
Xilitol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido hialurónico	<i>Streptococcus</i> sp.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995;

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Trealose	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> <i>spp.</i> , <i>Pleurotus</i> genus , <i>Filobasidium floriforme</i>	JP 05099974, JP 06311891, FR 2671099, EP 0555540, JP 3053791, Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: Trehalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, <i>Filobasidium floriforme</i> . Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
Ácido ascórbico	<i>Gluconobacter melanogenes</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Vitamina B <sub>12</sub>	<i>Propionibacterium</i> spp., <i>Pseudomonas denitrificans</i>	Chem. Ber. 1994, 923 -927; RÖMPP Online Version 2.2
Riboflavina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Ashbya</i> <i>gossypii</i>	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. <i>Fragrance Journal</i> (2003), 31 (3), 44-48.
Vitamina B <sub>6</sub>	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>R. meliloti</i>	EP0765939
Enzimas	<i>Aspergilli</i> (por ejemplo <i>Aspergillus niger</i> A.  <i>oryzae</i> ), <i>Trichoderma</i> , <i>E.coli</i> ,  <i>Hansenula</i> o <i>Pichia</i> (por ejemplo <i>Pichia</i>  <i>pastoris</i> ), <i>Bacillus</i> (por ejemplo <i>Bacillus</i>  <i>licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i> ) entre muchos otros	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Zeaxantina	<i>Dunaliella salina</i>	Jin et al (2003) <i>Biotech.Bioeng.</i> 81: 115-124
Cantaxantina	<i>Brevibacterium</i>	Nelis et al (1991) <i>J Appl Bacteriol</i> 70: 181-191
Licopeno	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida</i> <i>utilis</i>	WO 03/056028, EP 01/201762, WO 01/12832, WO 00/77234, Miura et al (1998) <i>Appl Environ Microbiol</i> 64: 1226-1229
β-Caroteno	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida</i> <i>utilis</i>	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene from <i>Blakeslea trispora</i> with Span 20, <i>Biotechnology Letters</i> , Vol 19, No 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and morphology of <i>Blakeslea trispora</i> in a stirred tank reactor: mathematical modelling, <i>Biochemical Engineering Journal</i> 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura et al (1998) <i>Appl Environ Microbiol</i> 64: 1226-1229

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Astaxantina	<i>Phaffia rhodozyma</i> ; <i>Candida utilis</i>	US 5,599,711; WO 91/02060, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64: 1226-1229
Poliéster de Polihidroxiálcanoato,	<i>Escherchia coli</i> , <i>Alcaligenes latus</i> ,  <i>entre muchos otros</i>	S. Y. Lee, Plastic Bacteria, Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, Bd. 14, (1996), p. 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (Hg.), Biopolymers, 1ª ed, 2003, Wiley-VCH, Weinheim y literatura allí citada
Polisacáridos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L.</i>  <i>dextranicum</i> , <i>Xanthomonas</i>  <i>campestris</i> , <i>entre muchos otros</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Poliisoprenoides	<i>Lactarius</i> sp., <i>Hygrophorus</i> sp.,  <i>Russula</i> sp.	Steinbüchel (Hg.), Biopolymers, 1ª ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim y literatura allí citada
Acetona	<i>Clostridium</i> (por ejemplo <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i> )	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Acetoina	<i>Enterobacter aerogenes</i> ,  <i>Clostridium acetobutylicum</i> ,  <i>Lactococcus lactis</i>	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Hrsg., Biology of the Prokaryotes, Thieme, Stuttgart (1999), p.307; RÖMPP edición online
Vainillina	<i>Pseudomonas putida</i> ,  <i>Amycolatopsis</i> sp.	Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296-314 (2001)
Turigenina	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Jian-Zhong Jong et al.: Fed-batch culture of <i>Bacillus thuringiensis</i> for thuringensin production in a tower type bioreactor. Biotechnology and Bioengineering 48 (3) (2004), 207-213.
Policétidos	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i>	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. Pure & Appl. Chem. 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle et al.: Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of <i>Sorangium cellulosum</i> So ce26 in <i>Streptomyces lividans</i> . Microbiology 150 (8), (2004), 2761-74.
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hollmann et al.: Extraktiv-Fermentation von Gibberellinsäure mit <i>Gibberella fujikuroi</i> . CIT 7 (1995), 892-895.

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Indigo	<i>Escherichia coli</i>	JB 102 Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28 (2002), 127-133.

5 En formas preferidas de operar de la invención se elige el compuesto orgánico producido entre ácidos mono-, di- y tricarboxílicos con 3 a 10 átomos de C que portan, dado el caso, grupos hidroxilo, aminoácidos proteinógenos y no proteinógenos, bases purínicas, bases pirimídicas; nucleósidos, nucleótidos, lípidos; ácidos grasos saturados e insaturados; dioles con 4 a 10 átomos de C, alcoholes polivalentes con 3 o más grupos hidroxilo, alcoholes de cadena larga con por lo menos 4 átomos de C, hidratos de carbono, compuestos aromáticos, vitaminas, provitaminas, cofactores, nutracéuticos, proteínas, carotenoides, cetonas con 3 a 10 átomos de C, lactonas, biopolímeros y ciclodextrinas.

10 Una primera forma preferida de operar de la invención se refiere al empleo del medio líquido que contiene azúcar obtenible de acuerdo con la invención en una producción fermentativa de enzimas como fitasas, xilanasas o glucanasas.

15 Una segunda forma preferida de operar de la invención se refiere al empleo del medio líquido que contiene azúcar obtenible de acuerdo con la invención en una producción fermentativa de aminoácidos como lisina, metionina, treonina y glutamato

Otra forma preferida de operar de la invención se refiere al empleo del medio líquido que contiene azúcar obtenible de acuerdo con la invención en una producción fermentativa de vitaminas como ácido pantoténico y riboflavina, precursores y productos de reacción de ellos.

Una forma particularmente preferida de operar de la invención se refiere a la producción fermentativa de

20 - ácidos mono-, di- y tricarboxílicos, en particular ácidos mono-, di- y tricarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C como ácido propiónico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido itacónico, ácido cítrico y ácido dimetilmalónico,

- ácidos hidroxicarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C como ácido láctico y ácido 3-hidroxipropiónico;

25 - alcoholes de cadena larga como se mencionó antes, en particular alcoholes con 4 a 10 átomos de C como butanol;

- dioles como se mencionó antes, en particular alcanodioles con 3 a 10 y en particular 3 a 8 átomos de C como propanodiol;

- cetonas como se mencionó antes, en particular cetonas con 3 a 10 átomos de C como acetona; e

30 - hidratos de carbono como se mencionó antes, en particular disacáridos como trealosa.

35 En otra forma particularmente preferida de operar los productos metabólicos producidos por los microorganismos en la fermentación son polihidroxicanoatos como poli-3-hidroxibutirato y copoliésteres con otros ácidos orgánicos hidroxicarboxílicos como ácido 3-hidroxivalerianoico, ácido 4-hidroxibutírico y otros, que son descritos en Steinbüchel (a.a.O.), por ejemplo también ácidos hidroxicarboxílicos de cadena larga (también definidos como cadenas largas) como ácido 3-hidroxioctanoico, ácido 3-hidroxidecanoico y ácido 3-hidroxitetradecanoico, así como mezclas de ellos. Para la ejecución de la fermentación pueden emplearse aquí también condiciones y formas de proceder análogas, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en S. Y. Lee, Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, vol. 14, (1996), p. 431-438.

40 En una forma preferida de operar se eligen los microorganismos empleados en la fermentación entre microorganismos naturales o recombinantes, que hacen la sobreproducción de por lo menos uno de los siguientes productos metabólicos:

- enzimas como fitasa, xilanasa o glucanasa, en particular fitasa;
- aminoácidos como lisina, treonina o metionina, en particular lisina y metionina;
- vitaminas como ácido pantoténico y riboflavina; precursores y/o productos de reacción de ellos;
- disacáridos como trealosa;

- 5
- ácidos mono-, di- y tricarbónicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C como ácido propiónico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido itacónico, ácido cítrico y ácido dimetilmalónico;
  - polihidroxicarboxilatos, poli-3-hidroxibutirato y copoliésteres del ácido 3-hidroxibutírico;
  - ácidos hidroxicarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C como ácido láctico y ácido 3-hidroxipropiónico;
  - cetonas con 3 a 10 átomos de C como acetona;
- 10
- alcoholes con 4 a 10 átomos de C como butanol; y
  - alcanodiolos con 3 a 8 átomos de C como propanodiol.

Los microorganismos adecuados son elegidos comúnmente de entre los géneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* y *Clostridium*, en particular entre cepas de *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* o *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhizopus arrhizus* y *Rhizopus oryzae*.

- 15
- 20
- En una forma preferida de operar el microorganismo empleado en la fermentación es una cepa del género *Corynebacterium*, en particular es una cepa del *Corynebacterium glutamicum*. En particular es una cepa del género *Corynebacterium*, especialmente de *Corynebacterium glutamicum*, el cual hace la sobreproducción de un aminoácido, especialmente lisina, metionina o glutamato.

- 25
- En otra forma preferida de operar el microorganismo empleado en la fermentación es una cepa del género *Escherichia*, en particular una cepa de *Escherichia coli*. En particular es una cepa del género *Escherichia*, especialmente de *Escherichia coli*, la cual hace la sobreproducción de un aminoácido, especialmente lisina, metionina o treonina.

- 30
- En una forma especialmente preferida de operar el metabolito producido por el microorganismo en la fermentación es lisina. Para la realización de la fermentación pueden emplearse aquí condiciones y modos de operar análogos, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Pfefferle et al., a.a.O., y US 3,708,395. En principio entran en consideración tanto una forma de operar continua como también una discontinua (lote o alimentación en lote), se prefiere la forma de operar de alimentación en lote.

En otra forma particularmente preferida de operar el metabolito producido por el microorganismo en la fermentación es metionina. Para la realización de la fermentación pueden emplearse aquí condiciones y modos de operar análogos, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en WO 03/087386 y WO 03/100072.

- 35
- En otra forma particularmente preferida de operar el metabolito producido por el microorganismo en la fermentación es ácido pantoténico. Para la realización de la fermentación pueden emplearse aquí condiciones y métodos de operación análogos, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en la WO 01/021772.

- 40
- En otra forma particularmente preferida de operar el metabolito producido por el microorganismo en la fermentación es riboflavina. Para la realización de la fermentación pueden emplearse aquí condiciones y métodos de operación análogos, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 y Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. *Fragrance Journal* (2003), 31 (3), 44-48.

En otra forma particularmente preferida de operar, el metabolito producido por el microorganismo en la fermentación es ácido fumárico. Para la realización de la fermentación pueden emplearse aquí condiciones y métodos de

operación análogos, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Rhodes et al, Production of Fumaric Acid en 20-L Fermentors, Applied Microbiology, 1962, 10 (1), 9-15.

En otra forma particularmente preferida de operar, el metabolito producido por el microorganismo en la fermentación es ácido succínico. Para la realización de la fermentación pueden emplearse aquí condiciones y métodos de operación análogos, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498-504 (1976); EP 249773 (1987), Erf.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), Erf.: Guettler, Jain u. Soni; Arch. Microbiol. 167, 332-342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan; 49 Pt 1:207-16; US 5,723,322, US 5,573,31, US 5,521,075, WO99/06532, US 5,869,301 o US 5,770,435.

- 10 En otra forma particularmente preferida de operar, el metabolito producido por el microorganismo en la fermentación es una fitasa. Para la realización de la fermentación pueden emplearse aquí condiciones y métodos de operación análogos, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en la WO 98/55599.

- 15 En la fermentación resulta un caldo de fermentación el cual, aparte de los metabolitos microbianos deseados contiene esencialmente la biomasa generada durante la fermentación, la cual contiene los componentes no metabolizados de la solución licuada de almidón y en particular los componentes sólidos de la fuente de almidón que no contienen almidón, como por ejemplo fibras y azúcar no utilizada, así como sales tampón y nutritivas no utilizadas. En la presente inscripción este medio líquido es definido como caldo de fermentación, donde el caldo de fermentación también incluye el medio (1) añadido que contiene dextrina, en el cual ocurre primero una parcial o incompleta transformación fermentativa del azúcar allí contenido, es decir un metabolismo microbiano parcial o incompleto del azúcar utilizable (por ejemplo mono- y disacáridos).

Antes del aislamiento o disminución en la concentración de un producto metabólico microbiano o de la separación de los componentes volátiles del caldo de fermentación, se lleva a cabo dado el caso una etapa de esterilización de la forma descrita arriba.

- 25 Una forma especial de operar (I) de la invención se refiere a un método en el cual se aísla o baja la concentración del caldo de fermentación de por lo menos un producto metabólico microbiano. A continuación se eliminan ampliamente los componentes volátiles del caldo de fermentación, donde se obtiene una preparación de proteína sólida o semisólida. Una descripción exacta de la ejecución del tal método y de la preparación de proteína allí obtenida es objetivo de la WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) de quien hizo esta inscripción, a lo cual se hace referencia aquí para más detalles.

- 30 El aislamiento o reducción en la concentración del producto metabólico del caldo de fermentación ocurre por regla general de modo que se aísla o reduce la concentración en el caldo de fermentación de por lo menos un producto metabólico, de modo que el contenido de este producto metabólico en el caldo de fermentación remanente es como máximo de 20 % en peso, en particular como máximo 10 % en peso, especialmente como máximo 5 % en peso y muy especialmente como máximo 2,5 % en peso, referido en cada caso al peso total del caldo de fermentación remanente.

- 40 El aislamiento o reducción en la concentración de sustancias químicas pequeñas (es decir del producto metabólico microbiano) del caldo de fermentación puede ocurrir en una o varias etapas. En ello una etapa esencial es la separación de los componentes sólidos del caldo de fermentación. Esto puede ser ejecutado bien sea antes o después del aislamiento del producto de valor. Tanto para el aislamiento de los productos de valor como también para la separación de las sustancias sólidas, es decir separación en fases sólido-líquido, se conocen métodos comunes en el área de estudio, los cuales incluyen también etapas para la purificación gruesa y fina de las sustancias de valor así como para el acondicionamiento (descritos por ejemplo en Belter, P. A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988), y Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. Ed. en CD-ROM, Wiley-VCH).

- 45 Para el aislamiento del producto de valor puede procederse ventajosamente de modo que primero se elimina el componente sólido del caldo de fermentación, por ejemplo por medio del centrifugación o filtración, y a continuación se aísla el producto de valor de la fase líquida, por ejemplo mediante cristalización, precipitación, adsorción o destilación. De modo alternativo puede aislarse también el producto de valor directamente del caldo de fermentación, por ejemplo mediante el empleo de métodos cromatográficos o de métodos de extracción. Como métodos cromatográficos se mencionan en particular la cromatografía de intercambio iónico, en la cual puede aislarse de manera selectiva el producto de valor en la columna de cromatografía. En este caso la separación de la materia sólida del caldo de fermentación remanente ocurre ventajosamente por ejemplo mediante decantación, evaporación y/o secado.

- 55 En el caso de compuestos volátiles u oleosos se requiere por regla general un control de la temperatura máxima durante la elaboración, en particular durante el secado. De modo ventajoso pueden producirse estos compuestos

también mediante su formulación en forma quasisólida (forma pseudosólida) sobre adsorbentes. Por ejemplo quien hace esta inscripción indica en WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) los adsorbentes adecuados para este propósito. Son ejemplos de compuestos que pueden ser producidos de modo ventajoso de este modo ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico, además

5 ácido propiónico, ácido láctico, propanodiol, butanol y acetona. También, en el sentido de la presente invención, estos compuestos en formulación pseudosólida son entendidos como metabolitos microbianos no volátiles en forma sólida.

Otra forma especial de operar (II) se refiere a un método, en la cual se eliminan ampliamente los componentes volátiles del caldo de fermentación sin previos aislamiento o descenso en la concentración de un metabolito microbiano no volátil, y dado el caso sin separación previa de los componentes sólidos, donde se obtiene una

10 formulación sólida de un metabolito microbiano no volátil. En la PCT/EP2006/066057 (la antigua inscripción de patente DE 10 2005 042 541.0) de quien hace esta inscripción, se encuentra una exacta descripción de la ejecución de tal método.

Ampliamente significa que después de la eliminación del componente volátil queda un residuo sólido o por lo menos semisólido, al cual dado el caso mediante adición de materiales sólidos se transforma en un producto sólido. Por

15 regla general esto significa eliminar el componente volátil hasta un contenido de humedad residual no mayor a 30 % en peso, frecuentemente no más de 20 % en peso y en particular no más de 15 % en peso. Por regla general se eliminan del caldo de fermentación ventajosamente los componentes volátiles del caldo de fermentación hasta un contenido residual de humedad en el rango de 0,2 a 30 % en peso, preferiblemente 1 a 20 % en peso, de modo

20 particular preferiblemente 2 a 15 % en peso y muy particularmente preferidos de 5 a 15 % en peso, referido al peso total de componente sólido determinado después del secado. El contenido residual de humedad puede ser determinado mediante métodos comunes conocidos por los expertos, por ejemplo por medio de análisis termogravimétrico (Hemminger et al., Methoden der thermischen Analyse, editorial Springer, Berlin, Heidelberg, 1989).

La obtención del(los) producto metabólico (metabolitos) no volátiles en forma sólida a partir del caldo de fermentación puede ocurrir en 1, 2 o varias etapas, en particular en un procedimiento de una o dos etapas. Por regla

25 general incluye por lo menos una etapa de secado, en particular subsiguiente a la etapa para la obtención del producto metabólico en forma sólida.

En el modo de proceder de una etapa se eliminan los componentes volátiles del caldo de fermentación, dado el caso

30 después de la antes mencionada separación previa, hasta que se alcanza el contenido deseado de humedad residual.

En la forma de proceder de dos o más etapas se concentra primero el caldo de fermentación, por ejemplo por medio de (micro-, ultra-) filtración o térmicamente mediante evaporación de una parte de los componentes volátiles. La

35 fracción de los componentes volátiles que es eliminada en esta etapa es por regla general de 10 a 80 % en peso y en particular 20 a 70 % en peso, referido al peso total de los componentes volátiles del caldo de fermentación. En una o varias de las subsiguientes etapas se eliminan los componentes volátiles remanentes del caldo de fermentación, hasta que se alcanza el contenido deseado de humedad residual.

Según esta forma de operar (II), la eliminación de los componentes volátiles del medio líquido ocurre esencialmente sin un descenso previo la concentración o incluso aislamiento del producto de valor. Por consiguiente en la

40 eliminación de los componentes volátiles del caldo de fermentación, esencialmente no se elimina el producto metabólico no volátil junto con los componentes volátiles del medio líquido, sino que permanece en el residuo así obtenido por lo menos una parte, comúnmente con la parte principal y en particular con la parte total de los otros componentes sólidos del caldo de fermentación. De acuerdo con esto, en la eliminación de los componentes volátiles del caldo de fermentación junto con éstos pueden eliminarse también fracciones - preferiblemente

45 pequeñas- del producto metabólico microbiano no volátil deseado, por regla general máximo 20 % en peso, por ejemplo 0,1 a 20 % en peso, preferiblemente no más de 10, en particular no más de 5 % en peso, de modo particular preferiblemente no más de 2,5 % en peso y de modo muy particular preferiblemente máximo 1 % en peso, referido al peso total del producto metabólico. En una forma muy particularmente preferida, el producto metabólico microbiano no volátil deseado permanece hasta en por lo menos 90 % en peso, en particular por lo menos 95 % en peso,

50 especialmente 99 % en peso y muy especialmente aproximadamente 100 % en peso, referido en cada caso al peso total seco del producto metabólico, como materia sólida en mezcla con la fracción obtenida después de eliminar los componentes volátiles o con la totalidad de los componentes volátiles del medio de fermentación.

En tanto se desee, antes de la eliminación de los componentes volátiles, puede separarse una parte, por ejemplo 5 a

55 80 % en peso y en particular 30 a 70 % en peso, de los componentes sólidos del caldo de fermentación que no contienen almidón, por ejemplo mediante centrifugación o filtración. Dado el caso se ejecuta tal separación previa para eliminar las partículas sólidas grandes, las cuales no contienen o contienen solo pequeñas fracciones de producto metabólico microbiano no volátil. Para la filtración previa pueden aplicarse métodos comunes conocidos

por los expertos, por ejemplo mediante empleo de tamices de escala industrial, redes, láminas perforadas o similares. Dado el caso puede ocurrir una separación de partículas sólidas grandes también en un ciclón. Los equipos y empleados como decantadores, centrífugas, sedimentadores-decantadores y separadores, son conocidos así mismo por los expertos. De esta forma se obtiene un residuo sólido o semisólido, por ejemplo pastoso el cual

5 contiene producto metabólico no volátil y los componentes no volátiles de la fuente de almidón, por regla general sólidos que no contienen almidón, por lo menos una gran parte de ellos, frecuentemente por lo menos 90 % en peso o la cantidad total de los componentes sólidos que no contienen almidón.

Mediante adición de agentes auxiliares de formulación como materiales de soporte y materiales de cobertura, agentes ligantes así como otros aditivos pueden perfeccionarse en forma de por si conocida las propiedades del

10 producto metabólico seco junto con los componentes sólidos de la fermentación presentes, enfocadas respecto a diferentes parámetros, como contenido de principio activo, tamaño de grano, forma de la partícula, tendencia a la pulverulencia, higroscopicidad, estabilidad, en particular estabilidad al almacenamiento, color, olor, comportamiento de fluidez, tendencia a la aglomeración, carga electrostática, sensibilidad a la luz y a la temperatura, estabilidad mecánica, y capacidad de ser redispersado.

A los agentes auxiliares de formulación comunes empleados pertenecen por ejemplo agentes ligantes, materiales de soporte, agentes auxiliares para el polvo/fluidez, además pigmentos colorantes, biocidas, agentes dispersantes, agentes antiespumantes, agentes reguladores de viscosidad, ácidos, lejías, antioxidantes, estabilizadores de enzimas, inhibidores de enzimas, adsorbatos, grasas, ácidos grasos, aceites o mezclas de ellos. Tales sustancias auxiliares de formulación son empleadas ventajosamente como sustancias auxiliares de secado en particular en

15 aplicación de métodos de formulación y secado como secado por atomización, lecho fluido, y congelación. Para mayores detalles se remite a la PCT/EP2006/066057 (antigua inscripción DE 10 2005 042 541.0).

La fracción de los aditivos antes mencionados y dado el caso otros aditivos como materiales de cobertura puede variar fuertemente dependiendo de los requerimientos especiales del respectivo producto metabólico así como dependiendo de las propiedades del aditivo empleado y estar por ejemplo en el rango de 0,1 a 80 % en peso y en particular en el rango de 1 a 30 % en peso, referido en cada caso al peso total del producto formulado listo o bien de la mezcla de sustancias.

25

La adición de agentes auxiliares de formulación puede ocurrir antes, durante o después de la elaboración del caldo de fermentación (también definido como formulación de producto o diseño de sustancia) y en particular durante el secado. En particular puede ser ventajosa una adición de agente auxiliar de formulación antes de la elaboración del

30 caldo de fermentación o bien del producto metabólico, para mejorar la capacidad para ser procesado de la sustancia o bien productos que van a ser trabajados. Los agentes auxiliares de formulación pueden ser añadidos antes de la etapa final de secado, tanto al producto metabólico obtenido en forma sólida como también a una solución o suspensión que contiene a este, por ejemplo después de la fermentación cerrada, directamente al caldo de fermentación o a una solución o suspensión obtenida en el curso de la elaboración.

De este modo las sustancias auxiliares pueden ser mezcladas por ejemplo en una suspensión del producto metabólico microbiano; tal suspensión puede ser también añadida sobre un material de soporte, por ejemplo mediante atomización o mezclado. La adición de sustancias auxiliares de formulación puede tener importancia por ejemplo cuando se atomiza una solución o suspensión que contiene el producto metabólico. En particular, después del secado ocurre una adición del agente auxiliar de formulación por ejemplo en la aplicación de revestimientos o

35 bien coberturas/capas de coberturas sobre partículas secas. Tanto después del secado como también después de una eventual etapa de cobertura pueden añadirse al producto otras sustancias auxiliares.

La eliminación de los componentes volátiles del caldo de fermentación ocurre de manera de por si conocida mediante métodos comunes para la separación de la fase sólida de la fase líquida, incluyendo métodos de filtración y métodos para la evaporación de componentes volátiles de la fase líquida. Tales métodos que también pueden

45 incluir etapas para la limpieza preliminar de las sustancias de valor así como etapas para el perfeccionamiento son por ejemplo descritos en Belter, P. A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988), y Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5ª ed. en Auf CD-ROM, Wiley-VCH. En el marco de la formulación del producto o bien de la aplicación según fermentación cerrada, en EP 1038 527, EP 0648 076, EP 835613, EP 0219 276, EP 0394 022, EP 0547 422, EP 1088 486, WO 98/55599, EP 0758 018 y WO 92/12645 se describen además métodos, equipos, sustancias auxiliares o bien formas de operación generales y especiales conocidos que pueden ser utilizadas por los expertos.

50

En una primera variante de esta forma de operación (II) se lleva el producto metabólico microbiano no volátil, en tanto esté presente disuelto en la fase líquida, desde la fase líquida hasta fase sólida, por ejemplo mediante cristalización o precipitación. A continuación ocurre una separación de los componentes sólidos no volátiles,

55 incluyendo el producto metabólico, por ejemplo mediante centrifugación, decantación o filtración. De un modo similar pueden separarse también productos metabólicos oleosos, donde los respectivos productos oleosos de

fermentación son llevados a una forma sólida mediante adición de adsorbentes, por ejemplo ácido silícico, gel de sílice, lodo, arcilla y carbón activado.

5 En una segunda variante de esta forma de operación (II) se eliminan los componentes volátiles mediante evaporación. La evaporación puede ocurrir en forma de por sí conocida. Son ejemplos de métodos adecuados para la evaporación de componentes volátiles el secado por atomización, secado o aglomeración en lecho fluido, secado por congelación, secado en corriente y por contacto así como secado por extrusión. También se hace una combinación de los métodos mencionados previamente con métodos que dan forma como extrusión, peletizado o granulación. En estos métodos mencionados últimamente se emplean preferiblemente de modo parcial o amplio mezcla de sustancias secadas previamente que contienen el producto metabólico.

10 En una forma preferida de operar, la eliminación de los componentes volátiles del caldo de fermentación incluye un método para el secado por atomización o un método de secado en lecho fluido, incluyendo la granulación en lecho fluido. Para esto se alimenta el caldo de fermentación, dado el caso después de una separación previa para la eliminación de partículas sólidas grandes, el cual no contiene o contiene sólo pequeñas fracciones de productos metabólicos microbianos no volátiles, a uno o varios equipos de secado por atomización o por lecho fluido. El  
15 transporte o bien alimentación del caldo de fermentación cargado con materia sólida ocurre de modo conveniente por medio de dispositivos comunes de transporte de líquidos que contienen materia sólida como por ejemplo bombas como bombas de tornillo excéntrico (por ejemplo de la compañía Delasco PCM) o bombas de alta presión (por ejemplo de la compañía LEWA Herbert Ott GmbH).

20 La realización de una fermentación mediante el empleo de medios líquidos que contienen azúcar, de acuerdo con la invención puede ocurrir también de modo que

(i) se saca el medio (1) que contiene dextrina obtenido en la etapa a2), el cual contiene el componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón, una cantidad parcial no superior a 50 % en peso, por ejemplo en el rango de 5 a 45 % en peso, referida al peso total, y se alimenta la cantidad restante a una fermentación para la producción de un primer producto metabólico (A), por ejemplo de un producto  
25 metabólico no volátil (A) en forma sólida o un producto metabólico volátil (A); y

(ii) se alimenta esta cantidad parcial, dado el caso después de una separación previa completa o parcial de los componentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón, a una fermentación para la producción de un segundo producto metabólico (B), el cual es idéntico o diferente al producto metabólico (A).

30 En el caso de la separación de los componentes sólidos que no contienen almidón según (ii), el contenido de sólidos de la fracción remanente del medio líquido que contiene azúcar es de preferiblemente máximo 50 % en peso, en particular máximo 30 % en peso, de modo particularmente preferido máximo 10 % en peso y de modo muy particular preferiblemente máximo 5 % en peso. En particular en este caso se prefiere separar la totalidad de la materia sólida antes de la fermentación para la producción del segundo producto metabólico (B).

35 Esta forma de operar hace posible emplear microorganismos en la fermentación separada según (ii), para lo cual tienen que satisfacerse determinados requerimientos mínimos, por ejemplo respecto a la tasa de transferencia de oxígeno. Para tales microorganismos empleados en la fermentación separada según (ii) entran en consideración por ejemplo especies de *Bacillus*, preferiblemente *Bacillus subtilis*. Los compuestos producidos mediante tales microorganismos en la fermentación separada son elegidos en particular de entre vitaminas, cofactores,  
40 nutracéuticos, bases de purina y pirimidina, nucleósidos y nucleótidos, lípidos, ácidos grasos saturados e insaturados, compuestos aromáticos, proteínas, carotenoides, especialmente vitaminas, cofactores y nutracéuticos, proteínas y carotenoides y de modo muy especial riboflavina y pantotenato de calcio.

Una modificación preferida de esta forma de operar se refiere a la producción operada de modo paralelo de productos metabólicos (A) y (B) iguales en dos fermentaciones separadas. Esto es entonces ventajoso en particular  
45 cuando se fijan diferentes requisitos de pureza para diferentes aplicaciones del mismo producto metabólico. Así, se produce el primer producto metabólico (A) como por ejemplo un aminoácido que va a ser empleado como aditivo alimentario, por ejemplo lisina, metionina, treonina o glutamato, mediante empleo del caldo de fermentación que contiene materia sólida y el mismo segundo producto metabólico (B), por ejemplo el mismo aminoácido que se va a ser empleado como aditivo nutritivo mediante uso del caldo de fermentación reducido en materia sólida según ii).  
50 Mediante la separación completa o parcial de los componentes sólidos que no contienen almidón puede reducirse el costo de purificación en la elaboración del producto metabólico, cuyo rango de aplicación requiere una elevada pureza, por ejemplo como aditivo nutritivo.

En otra forma preferida de operar de este modo de proceder pueda actuarse por ejemplo como sigue. Se implementa preferiblemente una fermentación de gran volumen para la producción del producto metabólico A, por  
55 ejemplo de aminoácidos como lisina, metionina, glutamato o treonina, de ácido cítrico o de etanol, por ejemplo

correspondiente a los métodos descritos en las WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) o PCT/EP2006/066057 (la antigua inscripción de patente DE 10 2005 042 541.0) o correspondiente a los métodos conocidos para la producción fermentativa de bioetanol. Según i) se toma una parte del medio (1) obtenido según la etapa a2). La parte tomada según i) puede ser liberada total o parcialmente de la materia seca según ii) mediante métodos  
5 comunes, por ejemplo centrifugación o filtración, dependiendo de los requerimientos de la fermentación para la producción de B. El medio (1) así obtenido, dado el caso liberado total o parcialmente de la materia seca es alimentado según ii) a una fermentación para la producción de un producto metabólico B. Una corriente de materia seca separada según i) es devuelta ventajosamente a la corriente del medio (1) de la fermentación de gran volumen.

10 Cuando el producto metabólico microbiano (A) producido en la fermentación de gran volumen es etanol, entonces el medio (1) producido según la etapa ii) exhibe concentraciones de oligosacáridos, como son comunes en la producción fermentativa de etanol (bioetanol), por ejemplo en el rango de 20 a 33 % en peso. La ejecución de una separación de materia seca según la etapa ii) se adapta también aquí a los requerimientos de la fermentación para la producción del respectivo producto metabólico B.

15 En una forma preferida de operar del modo de proceder descrito previamente, el producto metabólico B producido por los microorganismos en la fermentación es riboflavina. Para la realización de la fermentación pueden aplicarse aquí modos de operar y condiciones análogas, como se describió por ejemplo para otras fuentes de carbono en las WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 y Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31 (3), 44-48.

20 Para la realización de esta variante del método se implementa preferiblemente una fermentación de gran volumen para la producción del producto metabólico A, por ejemplo de aminoácidos como lisina, metionina, glutamato o, de ácido cítrico o de etanol, como se describe arriba. Según i) se saca una parte del medio (1) obtenido según la etapa a2) y se libera total o parcialmente de materia seca según ii) mediante métodos comunes, por ejemplo centrifugación o filtración. El medio (1) obtenido de allí, esencialmente liberado total o parcialmente de la materia seca es alimentado según ii) a una fermentación para la producción del producto metabólico B, aquí riboflavina. La corriente  
25 de materia seca separada según ii) es retornada ventajosamente a la corriente del medio (1) de la fermentación de gran volumen.

El caldo de fermentación que contiene riboflavina generado de esta forma y modo puede ser procesado según formas de operar y condiciones análogas, como se describió para otras fuentes de carbono, por ejemplo en DE 4037441, EP 464582, EP 438767 y DE 3819745. Después de la lisis de la masa celular ocurre la separación de la  
30 riboflavina que esta presente en forma cristalina, preferiblemente mediante decantación. Así mismo son posibles otros tipos de separación de materia seca, por ejemplo filtración. A continuación se seca la riboflavina, preferiblemente por medio de secadores por atomización y lecho fluido. Para ello, de modo alternativo puede procesarse la mezcla de fermentación que contiene riboflavina generada según ii) según formas de operar y condiciones análogas, como se describe por ejemplo en las EP 1048668 y EP 730034. Después de pasteurizar se centrifuga aquí el caldo de fermentación y se trata la fracción remanente que contiene materia seca con un ácido mineral. La riboflavina formada es filtrada del medio acuoso ácido, dado el caso lavada y a continuación secada.  
35

En otra forma preferida de operar de este modo de proceder el producto metabólico B producido por los microorganismos en la fermentación es ácido pantoténico. Para la realización de la fermentación pueden aplicarse aquí condiciones y formas de proceder análogos, como se describió para otras fuentes de carbono por ejemplo en la  
40 WO 01/021772.

Para la realización de esta variante del método puede procederse por ejemplo como se describió arriba para riboflavina. El medio (1) purificado previamente según i) preferiblemente esencialmente libre de materia sólida es alimentado a una fermentación según ii) para la producción de ácido pantoténico. En ello, es particularmente  
45 ventajosa la viscosidad reducida en comparación con el medio líquido que contiene materia sólida. La corriente de materia seca separada es retornada preferiblemente a la corriente del medio líquido (1) que contiene azúcar de la fermentación de gran volumen.

El caldo de fermentación que contiene ácido pantoténico producido según ii) puede ser procesado según condiciones y modos de proceder análogos, como se describieron para otras fuentes de carbono, por ejemplo en las EP 1050219 y WO 01/83799. Después de la pasteurización de la totalidad del caldo de fermentación se separa la  
50 materia seca remanente por ejemplo mediante centrifugación por filtración. La corriente clara de la separación de materia seca es evaporada parcialmente, dado el caso se añade cloruro de calcio y se seca, en particular se seca por atomización.

En el marco del método de fermentación de gran volumen operado de modo paralelo, la materia seca separada puede ser obtenida junto con el respectivo producto metabólico microbiano deseado (A).

Después del secado y/o formulación o bien perfeccionamiento pueden añadirse a la formulación de producto o bien a la preparación de proteína, granos de cereales total o parcialmente molidos, preferiblemente maíz, trigo, cebada, mijo, triticale y/o centeno.

- 5 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar aspectos individuales de la presente invención, sin embargo no deben entenderse de ningún modo como limitantes.

### Ejemplos

#### 1. Molienda de la fuente de almidón

- 10 Los productos molidos empleados a continuación fueron producidos como sigue. Se molieron completamente granos enteros de maíz usando un molino de rotor. Mediante el empleo de diferentes elementos de percusión, pistas de molienda o bien componentes para tamizado se alcanzaron tres diferentes grados de finura. Un análisis de tamizaje de material molido por medio de un tamiz de vibración de laboratorio (equipo de análisis por vibración: Retsch Vibrotronic Typ VE1; tiempo de tamizaje 5 min; amplitud: 1,5 mm) arrojó los resultados enumerados en la tabla 1.

Tabla 1

Número de ensayo	T 70/03	T 71/03	T 72/03
< 2 mm / %	99,4	100	100
< 0,8 mm / %	66	100	99
< 0,63 mm / %	58,6	98,5	91
< 0,315 mm / %	48,8	89	65
< 0,1 mm / %		25	9,6
< 0,04 mm / %		8	3,2
Material molido total	20 kg	11,45 kg	13,75 kg

- 15 II. Licuefacción y sacarificación enzimática del almidón

#### 11.1. Sin fitasa en la etapa de sacarificación

##### II.1a) Licuefacción enzimática del almidón

- 20 A partir de 320 g de harina seca molida de maíz (T71/03) se preparó bajo agitación regular una suspensión en 480 g de agua y se le añadieron 310 mg de cloruro de calcio. Se continuó la agitación durante la totalidad de la ejecución de la prueba. Después de ajustar el valor de pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 6,5 y calentar a 35 °C se añadieron 2,4 g de Ter maryl 120L tipo L (Novozymes A/S). Se calentó la mezcla de reacción por 40 min a una temperatura de 86,5 °C, donde dado el caso se ajustó nuevamente el pH con NaOH al valor ajustado previamente. En un período de 30 min se añadieron otros 400 g de la harina seca molida de maíz (T71/03), donde se elevó la temperatura a 91 °C. Se mantuvo la mezcla de reacción a esta temperatura por aproximadamente 100 min. A continuación se añadieron
- 25 otros 2,4 g de Termamyl 120L y se mantuvo la temperatura por aproximadamente 100 min. Se hizo seguimiento al avance de la licuefacción durante la duración de la ejecución con la reacción yodo-almidón. A continuación se elevó la temperatura a 100 °C y se cocinó la mezcla de reacción por otros 20 min. En este punto de tiempo no se evidenció más almidón. Se enfrió el reactor 35 °C.

#### II.3 Otras instrucciones de trabajo para la licuefacción enzimática del almidón

- 30 II.3a) Harina de maíz

Se colocaron en un recipiente de reacción 360 g de agua desionizada. Se añadieron 1,54 ml de solución madre de CaCl<sub>2</sub> (100 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O / l) hasta una concentración final de aproximadamente 70 ppm de Ca<sup>2+</sup> en el mosto.

Bajo agitación regular se añaden al agua gradual y lentamente 240 g de harina de maíz. Después de ajustar el pH a 6,5 con una solución acuosa de NaOH al 50 % en peso se añadieron 4,0 ml (= 2 % en peso de enzima/masa seca) de Termamyl 120 L tipo L (Novozymes A/S). Después se calentó rápidamente el mosto a 85°C. En esto tuvo que controlarse permanentemente el pH y dado el caso ajustar.

- 5 Después de alcanzar la temperatura definitiva se inició la adición de más harina, de 50 g de harina. Adicionalmente se añadió al mosto 0,13 ml de solución madre de  $\text{CaCl}_2$ , para mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en 70 ppm. Durante la adición se mantuvo la temperatura constante en 85 °C. Se esperó por lo menos 10 min, para garantizar una reacción completa, antes de añadir otra porción (50 g de harina y 0,13 ml de solución madre de  $\text{CaCl}_2$ ). Después de la adición de dos porciones se añadieron 1,67 ml de Termamyl; a continuación se añadieron dos porciones adicionales (en cada caso 50 g de harina y 0,13 ml de solución madre de  $\text{CaCl}_2$ ). Se alcanzó un contenido de masa seca de 55 % en peso. Después de la adición se elevó la temperatura a 100 °C y se cocinó el mosto por 10 min.

- 15 Se sacó una muestra y se la enfrió a temperatura ambiente. Después de la dilución de la muestra con agua desionizada (aproximadamente 1:10) se añadió una gota de solución concentrada de Lugol (mezcla de 5 g de yodo y 10 g de yoduro de potasio por litro). Una coloración azul profunda denotaba un contenido de almidón remanente; un color marrón ocurre cuando el almidón fue hidrolizado totalmente. Cuando la prueba indicó una fracción remanente de almidón, se redujo nuevamente la temperatura a 85 °C y se le mantuvo constante. Se añadieron otros 1,67 ml de Termamyl, hasta que la reacción yodo-almidón fue negativa.

#### II.3b) Harina de centeno (incluyendo tratamiento previo de celulasa/hemicelulasa)

- 20 Se colocaron en un recipiente de reacción 360 g de agua desionizada. Bajo agitación regular se añadieron al agua gradual y lentamente 155 g de harina de centeno. Se mantuvo constante la temperatura a 50 °C. Después de ajustar el pH a 5,5 con solución acuosa de NaOH al 50 % en peso se añadieron 3,21 ml (= 2,5 % en peso de enzima/masa seca) de Viscozyme L (Novozymes A/S). Después de 30 min se inició la adición de más harina, se añadieron primero 55 g de harina. Después de otros 30 min se añadieron nuevamente 50 g de harina; 30 min más tarde una vez más 40 g de harina. 30 min después de la última adición pudo comenzarse con la licuefacción.

- 25 Se añadieron 1,7 ml de solución madre de  $\text{CaCl}_2$  (100 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$  / l). Después del ajuste del pH a 6,5 con solución acuosa de NaOH al 50 % en peso se añadieron 5,0 ml (= 2 % en peso de enzima/masa seca) de Termamyl 120 L tipo L (Novozymes A/S). El mosto fue calentado entonces rápidamente a 85 °C. En esto tuvo que controlarse permanentemente el pH y dado el caso ajustar.

- 30 Después de alcanzar la temperatura definitiva comenzó la adición de más harina, primero de 60 g de harina. Adicionalmente se añadió al mosto 0,13 ml de solución madre de  $\text{CaCl}_2$ , para mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en 70 ppm. Durante la adición se mantuvo la temperatura constante a 85 °C. Se esperó por lo menos 10 min, para garantizar una completa reacción antes de añadir otra porción (40 g de harina y 0,1 ml de solución madre de  $\text{CaCl}_2$ ). Se añadió 1,1 ml de Termamyl; a continuación se añadió otra porción (40 g de harina y 0,1 ml de solución madre de  $\text{CaCl}_2$ ). Se alcanzó un contenido de masa seca de 55 % en peso. Después de la adición se elevó la temperatura a 100 °C y se cocinó el mosto por 10 min.

- 40 Se tomó una muestra de la enfrió a temperatura ambiente. Después de diluir la muestra con agua desionizada (aproximadamente 1:10) se añadió una gota de solución concentrada de Lugol (mezcla de 5 g de yodo y 10 g de yoduro de potasio por litro). Una coloración azul profunda denotó un contenido de almidón remanente; se presentó un color marrón cuando el almidón fue hidrolizado completamente. Cuando la prueba mostró una fracción de almidón remanente, se bajó nuevamente la temperatura a 85 °C y se mantuvo constante. Se añadió otro 1,1 ml de Termamyl, hasta que la reacción de yodo -almidón fue negativa.

#### II.3c) Harina de trigo (incluyendo tratamiento previo con xilanasas)

- 45 Se colocaron 360 g de agua desionizada en un recipiente de reacción. Se calentó el agua a 55 °C y se ajustó a 6,0 el pH con solución acuosa de NaOH al 50 % en peso. Después del ajuste de la temperatura y el pH se añadieron 3,21 ml (= 2,5 % en peso de enzima/masa seca) de Shearzyme 500L (Novozymes A/S). Bajo agitación regular se añadieron a la solución gradual y lentamente 155 g de harina de trigo. Se mantuvieron constantes la temperatura y el pH. Después de 30 min se inició la adición de más harina, primero se añadieron 55 g de harina. Después de otros 30 min se añadieron 50 g de harina; 30 min más tarde una vez más 40 g. 30 min después de la última adición pudo comenzarse la licuefacción.

- 50 La licuefacción se llevó a cabo como se describe en II.3b.

#### III. Ceba

ATCC13032 lysCfbr

En algunos de los siguientes ejemplos se empleó una cepa modificada de *Corynebacterium glutamicum*, la cual se describió bajo la denominación ATCC13032 lyscfbr en la WO 05/059144.

IV: Identificación de cepas que producen/expresan glucoamilasa

#### 5 IVa) Tamizaje en bancos de datos de genes

Una investigación sobre cepas que producen glucoamilasa

1. Glicoamilasa (1,4-alfa-D-glucanoglucohidrolasa) se clasifica mediante el siguiente número EC: EC 3.2.1.3 [1].

10 2. Se realiza una investigación con el requerimiento de búsqueda EC 3.2.1.3 en los siguientes bancos de datos: Brenda, Swissprot, ERGO-WIT, CAZY y PIR, donde se obtuvo en cada caso una lista de proteínas, que exhiben el EC 3.2.1.3.

3. Se combinaron las respectivas listas de resultados, y se filtro según los descriptores de los reinos taxonómicos Archaea, Bacteria y Fungi y se ordenó según los nombres de la especie.

15 4. Las especies que satisfacían el criterio de filtro del párrafo 3 y para las cuales se encontró una entrada para glucoamilasa en por lo menos uno de los bancos de datos mencionados en el párrafo 2, exhibían con alta probabilidad la capacidad de producir glucoamilasa. Con esto, en detalle son las siguientes especies:

20 *Agrobacterium tumefaciens*, *Arxula adeninivorans*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus kawachi*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus shirousami*, *Aspergillus terreus*, *Athelia rolfsii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Beta vulgaris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida glabrata*, *Candida tsukubaensis*, *Caulobacter crescentus*, *Cephalosporium charticola*, *Cephalosporium eichhorniae*, *Ceratocystis paradoxa*, *Chaetomium thermophilum*, *Chlorobium tepidum*, *Chromobacterium violaceum*, *Cladosporium resinae*, *Clostridium* sp.,  
25 *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Coniophora puteana*, *Corticium rolfsii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Emmericella nidulans*, *Endomyces* sp., *Endomycopsis fibuligera*, *Fusarium venenatum*, *Haloarcula marismortui*, *Hormoconis resinae*, *Humicola grisea*, *Humicola lanuginosa*, *Hypocrea lixii*, *Kluyveromyces lactis*, *Lentinula edodes*, *Lipomyces kononenkoae*, *Magnaporthe grisea*, *Mesorhizobium loti*,  
30 *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Monascus rubiginosus*, *Monascus* sp., *Mucor rouxianus*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Myrothecium* sp., *Neurospora crassa*, *Nostoc punctiforme*, *Oryza sativa*, *Paecilomyces variotii*, *Penaeus japonicus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxalicum*, *Picrophilus torridus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia eutropha*, *Ralstonia metallidurans*,  
35 *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Shewanella oneidensis*,  
40 *Sphingomonas aromaticivorans*, *Streptomyces coelicolor*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Talaromyces emersonii*, *Termitomyces clypeatus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoproteus tenax*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* y *Trichosporon adeninivorans*.

IVb) Tamizaje en prueba de matraz agitado con subsiguiente prueba de actividad enzimática

45 Se investiga la actividad de glucoamilasa de diferentes microorganismos en una prueba de matraz agitado. Para ello se puede emplear como medio todo medio convencional que sea adecuado para el crecimiento del organismo y que conduzca a una expresión de la glucoamilasa. Los medios adecuados son obtenibles en el comercio o pueden ser producidos de modo correspondiente con procedimientos publicados (por ejemplo como se describe en catálogos de American Type Culture Collection).

50 Por ejemplo en un medio definido puede emplearse como fuente única de carbono, una mezcla de oligómeros de glucosa de diferente longitud de cadena. Puesto que bajo las condiciones de la fermentación no tiene lugar ninguna

hidrólisis térmica de los oligosacáridos, en este medio pueden crecer solo cepas con una actividad de glucoamilasa y / o maltasa. Como sustrato es adecuado por ejemplo Maldex 150 (grupo amilo). El tamizaje es ejecutado bajo diferentes condiciones de fermentación (pH, temperatura).

- 5 Para diferenciar la actividad de glucoamilasa y maltasa, antes de la prueba se analiza por ejemplo por medio de HPLC la composición de oligosacáridos de la mezcla. De este modo por ejemplo Maldex 150 tiene la siguiente composición (ver tabla 2):

Tabla 2: Composición de Maldex 150 (grupo amilo)

Grado de polimerización	[%]
DP1	1,1
DP2	4,0
DP3	7,4
DP4	5,0
DP5	4,8
DP6	8,4
DP7	9,6
DP8	4,6
DP9	3,5
>DP9	51,6

- 10 De modo correspondiente con este análisis se coloca un medio de control con maltosa y glucosa. El crecimiento y producción de lisina en el medio de oligosacárido que exceden el valor de estos controles, son entonces atribuibles inequívocamente a una actividad de glucoamilasa.

De modo alternativo a una mezcla de maltodextrina pueden emplearse como fuente de carbono para el tamizaje también maltotetrosa, maltopentosa, etc. puras. Después de la terminación del cultivo se separa por centrifugación la biomasa y se filtra el sobrenadante.

- 15 El sobrenadante claro es empleado en una prueba de actividad de glucoamilasa (CHEN et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 51, 175-181 (2005)). Para ello se emplea una mezcla de reacción de 0,2 ml de tampón acetato-acetato de sodio 50mM (pH 5,0) con 0,5 % de almidón soluble y 0,2 ml de sobrenadante. Después de un tiempo de reacción de 10 minutos a 60 °C se detiene la reacción mediante cocción por 10 min a 100 °C. Se determina la cantidad liberada de glucosa con ayuda del método glucosaoxidasa/peroxidasa (Bergmayer y Bernt, 1974). En ello se define 1 unidad de actividad de glucoamilasa como la cantidad de enzima que libera, bajo las condiciones de reacción dadas, 1 µmol de glucosa por minuto, partiendo de almidón soluble.
- 20

#### IVc) Tamizaje con ayuda de cebadores/sondas

Un método alternativo para comprobar si el organismo que va a ser investigado posee secuencia que codifica glucoamilasa, es un tamizaje con ayuda de cebadores o sondas, los cuales son específicos para estas secuencias.

- 25 i) proveniente de rangos conservados de genes conocidos de glucoamilasa se construye una sonda, para identificar y clonar secuencias de ADN de diferentes organismos que codifican polipéptidos con una actividad de glucoamilasa. En particular tales sondas pueden ser empleadas para la hibridación con el ADN genómico o cADN del organismo deseado, seguido por un Southern Blot según el método estándar, para identificar el gen buscado.

El experto encuentra indicaciones para la identificación de secuencias de ADN por medio de hibridación entre otros en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de la compañía Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y por Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260).

- 5 ii) proveniente de rangos conservados de genes conocidos de glucoamilasa se sintetizan cebadores PCR. Estos son empleados en una reacción PCR con el ADN del organismo que va a ser investigado. Si están disponibles los correspondientes sitios de unión para el cebador, es decir genes que codifican glucoamilasa, entonces pueden identificarse los correspondientes oligonucleótidos amplificados con ayuda de una electroforesis en gel ejecutada a continuación. El experto encuentra indicaciones para la amplificación de
- 10 secuencias de ADN con ayuda de reacciones en cadena de polimerasa (PCR) entre otros en el manual de Gait: Oligonucleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) y por Newton y Graham: PCR (editorial Spektrum Akademischer, Heidelberg, Alemania, 1994).

### Ejemplo 1

- 15 Se empleó hidrolizado de harina de maíz licuada en pruebas de matraz con agitación empleando Corynebacterium glutamicum.

#### I) Licuefacción

- Se colocaron 360 g de agua desionizada en un recipiente de reacción. Bajo agitación regular se añadieron al agua gradual y lentamente 240 g de harina de maíz. Después de ajustar el pH a 5,8 con solución acuosa de NaOH al 50 % en peso se añadieron 4,0 ml (= 2 % en peso de enzima/masa seca) de Liquozyme SC (de Novozymes A/S). Se calentó entonces rápidamente el mosto a 85 °C. En esto tuvo que controlarse permanentemente y dado el caso
- 20 ajustar el pH.

- Después de alcanzar la temperatura definitiva comienzo la adición de más harina, primero de 50 g de harina. Durante la adición se mantuvo constante la temperatura a 85 °C. Se esperó por lo menos 10 min, para garantizar una reacción completa, antes de añadir una nueva porción (50 g) de harina. Después de añadir las dos porciones se
- 25 añadieron 1,67 ml de Liquozyme; a continuación se añadieron otras dos porciones (en cada caso 50 g) de harina. Se alcanzó un contenido en masa seca de 55 % en peso. Después de la adición se aumentó la temperatura a 100 °C y se cocinó el mosto por 10 min.

- Se tomó una muestra y se la enfrió a temperatura ambiente. Después de la dilución de la muestra con agua desionizada (aproximadamente 1:10) se añadió una gota de disolución concentrada de Lugol (mezcla de 5 g de yodo y 10 g de yoduro de potasio por litro). Una coloración azul profundo muestra un contenido de almidón
- 30 remanente; un color marrón ocurre cuando el almidón fue hidrolizado completamente. La mezcla que dio resultado negativo para almidón fue envasada en caliente en recipientes estériles y después de enfriamiento a 4 °C fue almacenada.

#### II) Fermentación con Corynebacterium glutamicum

- 35 Cepa

Se emplea un tipo silvestre modificado con Aspartokinasa ATCC13032 lyscfbr desregulada con retroalimentación.

#### Producción del inóculo

- Luego de extender las células sobre agar CM+CaAc estéril (composición: ver tabla 3; 20 min a 121 °C) se incubaron durante la noche a 30 °C. A continuación se rascaron las células en las placas y se resuspendieron en solución
- 40 salina. Se inocularon 25 ml del medio (ver tabla 4) en frascos Erlenmeyer de 250 ml con dos deflectores internos, en cada caso con una cantidad tal de la suspensión de células así producida, de modo que la densidad óptica alcanzó un valor de OD<sub>610</sub> = 0,5 a 610 nm.

Tabla 3: Composición de las placas de der CM+CaAc

Concentración	Aditivo
10,0 g/l	D-Glucosa
2,5 g/l	NaCl
2,0 g/l	Urea
5,0 g/l	Bacto Peptona (Difco)
5,0 g/l	Extracto de levadura (Difco)
5,0 g/l	Extracto de carne (Difco)
20,0 g/l	Casaminoácidos
20,0 g/l	Agar

#### Producción del caldo de fermentación

5 Las composiciones del medio del matraz son enumeradas en la tabla 4. La prueba fue ejecutada en determinación por triplicado.

Tabla 4: Medios del matraz

Hidrolizado de harina de maíz	180 g/l
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	20 g/l
Urea	5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,113 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,138 g/l
ACES	52 g/l
MOPS	21 g/l
Acido cítrico x H <sub>2</sub> O	0,49 g/l
Acido 3,4-dihidroxibenzoico	3,08 mg/l
NaCl	2,5 g/l
KCl	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,3 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	25 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x 4 - 6H <sub>2</sub> O	5 mg/l

(continuación)

Hidrolizado de harina de maíz	180 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	10 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	20 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	150 µg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 µg/l
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	100 µg/l
NiSO <sub>4</sub> x 6H <sub>2</sub> O	100 µg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	25 µg/l
Biotina (Vit. H)	1050 µg/l
Tiamina x HCl (Vit B1)	2100 µg/l
Nicotinamida	2,5 mg/l
Acido pantoténico	125 mg/l
Cianocobalamina (Vit B12)	1 µg/l
Acido 4-aminobenzoico (PABA; Vit. H1)	600 µg/l
Acido fólico	1,1 µg/l
Hidrolizado de harina de maíz	180 g/l
Piridoxina (Vit. B6)	30 µg/l
Riboflavina (Vit. B2)	90 µg/l
CSL	40 ml/l
pH*	6,85
* ajustado con solución acuosa de NaOH diluida	

Después de la inoculación se incubaron los matraces tres días a 30 °C y mediante movimiento (200 rpm) en un armario de agitación humidificado. Después de finalizada la fermentación se determinó un contenido de lisina por HPLC. Los análisis por HPLC fueron ejecutados con equipos de la serie 1100 LC de Agilent. La determinación de la concentración de aminoácidos ocurrió por medio de cromatografía líquida de alta presión en un sistema HPLC de la serie Agilent 1100 LC. Una producción de derivado en columna previa con orto-ftalaldehído permite la cuantificación de los aminoácidos formados, el fraccionamiento de la mezcla de aminoácidos tiene lugar en una columna Hypersil AA (Agilent).

10 Los resultados son resumidos en la tabla 5.

Tabla 5: Producción de lisina (Valor medio)

Tiempo de fermentación	Lisina [g/l]
45 h	11,5
70 h	12,8
Control (45 h)	11,1

5

## Ejemplo 2

Se empleó hidrolizado licuado de harina de maíz en pruebas de matraz con agitación empleando *Aspergillus niger*.

### I) Licuefacción

La licuefacción fue ejecutada como se describe en el ejemplo 1 bajo I).

### 10 II) Fermentación con *Aspergillus niger*

#### Cepa

Se generó una cepa de producción de fitasa de *Aspergillus niger* con 6 copias del gen *phyA* de *Aspergillus ficuum* bajo el control del promotor *glaA* de modo análogo a la producción de NP505-7 descrita en detalle en WO98/46772. Como control se empleó una cepa con 3 amplicones modificados *glaA* (análogo a ISO505), sin embargo sin la cinta de expresión integrada *phyA*.

15

#### Producción del inóculo

Se inocularon 20 ml del medio de cultivo previo (ver tabla 6) en matraces Erlenmeyer de 100 ml con un deflector interior, en cada caso con 100 µl de un cultivo congelado y se incubó por 24 h a 34 °C bajo movimiento (170 rpm) en un armario humidificado con agitación.

20

Tabla 6: Composición del medio de cultivo previo

Aditivo	Concentración
Glucosa	30,0 g/l
Peptona de caseína	10,0 g/l
Extracto de levadura	5,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	30 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	20 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	9 mg/l
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	3 mg/l
Tween 80	3,0 g/l

(continuación)

Penicilina	50000 IU/l
Estreptomicina	50 mg/l
pH*	5,5
* ajustado con ácido sulfúrico diluido	

Se inocularon 50 ml del medio de cultivo principal (ver tabla 7) en matraces Erlenmeyer de 250 ml con deflector interno, en cada caso con 5 ml de cultivo previo.

## 5 Producción del caldo de fermentación

En la tabla 7 se enumeran las composiciones del medio del matraz. De cada muestra se colocaron dos matraces.

Tabla 7: Medio del matraz

Hidrolizado de harina de maíz	200 g/l
Peptona de caseína	25,0 g/l
Extracto de levadura	12,5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
ZnCl <sub>2</sub>	30 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	20 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	9 mg/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3 mg/l
Penicilina	50000 IU/l
Estreptomicina	50 mg/l
pH*	5,6
*ajustado con ácido sulfúrico diluido	

- 10 Después de la inoculación, se incubaron los matraces 6 días 34 °C y bajo movimiento (170 rpm) en un armario de agitación humidificado. Después de finalizada la fermentación se determinó la actividad de fitasa con ácido fítico como sustrato y a un nivel adecuado de actividad de fitasa (estándar: 0,6 U/ml) en tampón 250 mM de ácido acético /acetato de sodio/ Tween 20 (0,1 % en peso), con pH 5,5. Se estandariza la prueba para el empleo en placas de Mikrotiter (MTP). Se mezclaron 10 µl de la solución de enzima con 140 µl de solución de fitato 6,49 mM en tampón de acetato de sodio 250 mM, pH 5,5 (fitato: sal dodecasodio del ácido fítico). Después de una incubación de una hora a 37 °C se detuvo la reacción mediante adición del mismo volumen (150 µl) de ácido tricloroacético. Se transfirió una alícuota de esta mezcla (20 µl) en 280 µl de una solución que contenía H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,32 N, 0,27 % en peso
- 15

molibdato de amonio y 1,08 % en peso de ácido ascórbico. A continuación ocurrió una incubación por 25 a 50 °C. Se midió la absorción de la solución coloreada de azul a 820 nm. Los resultados se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: actividad de fitasa después de terminar la fermentación

	Matraz	Actividad de fitasa [FTU/ml]
5	1	569
	2	696
	Control	393

10

## REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de por lo menos un compuesto orgánico con por lo menos 3 átomos de C o con por lo menos 2 átomos de C y por lo menos 1 átomo de N mediante fermentación, que incluye los siguientes pasos:

5 a1) molienda de una fuente de almidón, donde se obtiene un material molido el cual contiene por lo menos una parte del componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón;

a2) suspensión del material molido con un líquido acuoso y licuefacción del material molido presente, en el líquido acuoso en presencia de por lo menos una enzima que licúa el almidón, donde se obtiene un medio (1) acuoso que contiene dextrina, el cual incluye por lo menos una parte del componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón; y

10 b) empleo del medio acuoso (1) que contiene dextrina en una fermentación para cultivar un microorganismo, el cual es capaz de hacer sobreproducción del compuesto orgánico y el cual es elegido de entre microorganismos que producen enzimas, las cuales hidrolizan las dextrinas hasta monosacáridos

donde no se añaden enzimas que hidrolizan las dextrinas hasta monosacáridos, o se añaden en una cantidad inferior a 0,001 % en peso, referida al peso total de la fuente empleada de almidón.

15 2. Método según la reivindicación 1, donde se calienta la suspensión del material molido en el líquido acuoso a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización del almidón presente en la fuente de almidón.

3. Método según la reivindicación 2, donde el calentamiento ocurre en presencia de una enzima que licúa el almidón.

4. Método según una de las reivindicaciones precedentes donde se añade continuamente o de modo discontinuo al líquido acuoso, por lo menos una cantidad parcial del material molido en el transcurso de la licuefacción.

20 5. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde se suspende el material molido en una cantidad tal del líquido acuoso y se licúa este, de modo que el medio (1) acuoso obtenido que contiene dextrina exhibe un contenido de masa seca de por lo menos 50 % en peso, referido al peso total del medio (1).

25 6. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde se suspende el material molido en una cantidad tal del líquido acuoso y se licúa este, de modo que el medio (1) acuoso obtenido que contiene dextrina exhibe una concentración equivalente de glucosa de por lo menos 40 % en peso, referido al peso total del medio (1).

7. Método según una de las reivindicaciones precedentes, que incluye adicionalmente las siguientes etapas:

b1) cultivo en un medio acuoso de fermentación (2) del microorganismo que es capaz de hacer sobreproducción del compuesto orgánico; y

30 b2) adición del medio (1) que contiene dextrina al medio de fermentación (2), en el cual las dextrinas presentes en el medio (1) son metabolizadas por el microorganismo que hace la sobreproducción del compuesto orgánico.

8. Método según la reivindicación 7, donde el medio de fermentación (2) en la etapa b1) incluye esencialmente el medio (1), los microorganismos capaces de hacer la sobreproducción del compuesto orgánico, componentes comunes del medio y, dado el caso, el agua para la dilución.

35 9. Método según las reivindicaciones 7 u 8, donde en la etapa b1) se emplea una cantidad tal del medio (1) para formular el medio de fermentación (2), de modo que la concentración total de azúcar en el medio de fermentación (2) esta en el rango de 6 a 30 % en peso, calculado como equivalente de glucosa y referido al peso total del medio de fermentación (2).

40 10. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde en la etapa a1) se emplean como fuente de almidón granos de cereales.

11. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde el material molido incluye por lo menos 20 % en peso de la totalidad del componente sólido que no contiene almidón de la fuente de almidón.

12. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde el compuesto orgánico producido es elegido dado el caso de entre ácidos mono-, di- y tricarboxílicos con 3 a 10 átomos de C, que portan grupos hidroxilo, aminoácidos

proteinógenos y no proteinógenos, bases de purina, bases de pirimidina; nucleósidos, nucleótidos, lípidos; ácidos grasos saturados e insaturados; dioles con 4 a 10 átomos de C, alcoholes polivalentes con 3 o más grupos hidroxilo, alcoholes de cadena larga con por lo menos 4 átomos de C, hidratos de carbono, compuestos aromáticos, vitaminas, provitaminas, cofactores, nutracéuticos, proteínas, carotenoides, cetonas con 3 a 10 átomos de C, lactonas, biopolímeros y ciclodextrinas.

5

13. Método según una de las reivindicaciones precedentes, donde por lo menos un compuesto metabólico microbiano se reduce en concentración o se aísla del caldo de fermentación y a continuación se eliminan ampliamente los componentes volátiles del caldo de fermentación, donde se obtiene una composición de proteína sólida o semisólida.

10

14. Método según una de las reivindicaciones 1 a 12, donde por lo menos parcialmente se eliminan los componentes volátiles del caldo de fermentación, sin aislamiento o descenso en la concentración previos de un producto metabólico microbiano no volátil, y donde dado el caso sin separación previa de componentes sólidos, se obtiene una formulación sólida de un producto metabólico microbiano no volátil.