

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 969**

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/02** (2006.01)  
**C13K 1/06** (2006.01)  
**C07K 14/415** (2006.01)  
**A23K 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08774787 .9**  
96 Fecha de presentación: **04.07.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2164975**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2010**

54 Título: **Proceso para la producción de una solución de glucosa acuosa a partir de maíz**

30 Prioridad:  
**06.07.2007 EP 07111976**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.05.2012**

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

72 Inventor/es:  
**BOY, Matthias;**  
**CHOI, Jong-Kyu;**  
**CHUNG, Jin Won;**  
**LOHSCHIEDT, Markus;**  
**CHOI, Jong In;**  
**SEO, Jae Yeol;**  
**BRAUN, Jörg;**  
**KIM, Mo Se;**  
**KIM, Sung Hyun y**  
**KOCHNER, Arno**

74 Agente/Representante:  
**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 2 379 969 T3

## DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción de una solución de glucosa acuosa a partir de maíz

La presente invención se refiere a un proceso para la producción de una solución de glucosa acuosa a partir de maíz o granos de maíz.

5 La glucosa, principalmente las soluciones de glucosa acuosa, es una fuente de carbono básica para muchos procesos químicos y de fermentación para la preparación de productos orgánicos. Por ejemplo, durante la fermentación las moléculas de glucosa se metabolizan por los microorganismos empleados y de esta manera se convierten en el producto orgánico deseado. La gama de productos orgánicos preparados de esta manera comprende, por ejemplo, compuestos volátiles de bajo peso molecular, tales como etanol, ácidos carboxílicos alifáticos, aminoácidos, vitaminas, carotenoides, alcoholes de azúcar, ácidos de azúcar y polioles, pero también enzimas y polímeros orgánicos.

10 Para tales procesos de fermentación conocidos a nivel general se utilizan diferentes fuentes de carbono, dependiendo de las condiciones del proceso y de los productos que van a producirse. Estas fuentes de carbono van desde la sacarosa pura a través de melazas de remolacha y melazas de caña de azúcar, glucosa de hidrolizados de almidón, hasta glicerina.

En la producción convencional de glucosa a partir de almidón, el almidón se obtiene primero a partir de una fuente natural de almidón, como patatas, yuca, cereales, por ejemplo, trigo, maíz, cebada, centeno, tritical o arroz, y posteriormente se hidroliza, por lo regular a través de licuefacción enzimática, seguida de una sacarificación enzimática.

20 En la producción de glucosa a través de la licuefacción y sacarificación de almidón, por lo regular se parte de un almidón prepurificado, es decir, las fuentes naturales de almidón como patatas, yuca, y cereales, por ejemplo, trigo, maíz, cebada, centeno, tritical o arroz, se descomponen en constituyentes de almidón y no constituyentes de almidón.

25 En los cereales, principalmente en el caso del maíz, la obtención del almidón prepurificado se efectúa a través de un procedimiento de molienda húmeda de múltiples etapas. Para esto, en un primer paso los granos de cereal se hinchan en agua. En una segunda etapa, los granos hinchados se trituran con la adición de agua, con la que se retira el germen. Después de retirar el germen, se efectúa una molienda fina de los constituyentes restantes, es decir del almidón del gluten y del salvado (constituyentes de fibra). En etapas adicionales, se retiran el salvado y el gluten de tal modo que, al final, se obtiene una suspensión de almidón acuosa que para producir glucosa a continuación se introduce a una licuefacción/sacarificación. De esta manera se obtiene glucosa altamente pura.

30 No obstante, la molienda húmeda de granos de cereal es comparativamente engorrosa. Puesto que los granos de cereal se remojan primero en agua, los productos secundarios y los productos de desecho que se generan en la producción del almidón, tales como proteínas (gluten), componentes de germen y componentes de fibra, deben secarse antes de seguir procesando o ante de eliminarlos, lo cual está ligado con un gasto de energía considerable. Además, el despliegue de aparatos es alto y, por lo tanto, las plantas correspondientes implican una inversión de capital muy alta. Por otro lado, dado que los cereales y, en particular, el maíz, son fuentes importantes de almidón, se han realizado varios intentos para proporcionar alternativas más favorables para recuperar glucosa a partir de estas fuentes de almidón.

35 Un método más económico para aprovechar los componentes de almidón de los cereales, principalmente maíz, es moler en seco los granos de cereal. Para esto se muelen los granos de cereal, opcionalmente después de haber sido humectados con pequeñas cantidades de agua para mejorar la suavidad del germen y el material molido obtenido se conduce en su totalidad, a una licuefacción/sacarificación enzimática. De esta manera se obtiene una glucosa acuosa que contiene grandes cantidades de sólidos insolubles que resultan de los componentes del cereal que no son de almidón, a saber: fibras de las cáscaras, aceite de germen y proteínas, es decir, gluten. Los procesos para la preparación de glucosa mediante la molienda en seco de cereales seguidos por licuefacción/sacarificación se conocen y describen, por ejemplo, en "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Jaques et al. (editor), Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735, capítulo 2, páginas 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, October 2000.

40 La glucosa que se ha obtenido a través de procesos de molienda en seco a escala industrial hasta ahora sólo se ha utilizado para la producción de bioetanol. La razón para ello son varias desventajas inherentes a este proceso: en primer lugar, la consecuencia de la alta participación de componentes no solubles en la glucosa acuosa producida de esta manera es que la viscosidad de la solución de glucosa acuosa es elevada, incluso en bajas concentraciones de glucosa y, además, la solución de glucosa acuosa es pseudoplástica. Por lo tanto, la concentración de glucosa

máxima en una glucosa acuosa producida de esta manera por lo regular permanece restringida a 30 a 33% en peso. Mientras que no sean necesarias altas concentraciones de glucosa para la producción fermentativa de bioetanol o incluso problemáticas debido a la toxicidad del etanol formado durante la fermentación, una baja concentración de glucosa en la producción de otras sustancias químicas conduce a un incremento no deseado de la corriente de volumen. Además, los componentes no solubles pueden tener un efecto negativo en una fermentación, por ejemplo, con respecto al índice de transferencia de oxígeno o a la demanda de oxígeno de los microorganismos empleados para la fermentación. Además, estos sólidos pueden dificultar de manera no considerable el procesamiento subsiguiente y el aislamiento del producto obtenido por fermentación. Estos problemas sólo desempeñan un papel menor en la producción de bioetanol por fermentación anaeróbica seguida de separación mediante destilación.

En años recientes, se reportó de diferentes maneras sobre el empleo de una glucosa, producida mediante un proceso de molienda en seco, en la producción fermentativa de sustancias químicas (véanse WO 2005/116228 y WO2007/028804). El proceso descrito en estas solicitudes de moler en seco con la licuefacción/sacarificación subsiguiente permite la producción de una glucosa acuosa con una alta concentración de azúcar sin que se necesite una separación de los sólidos insolubles contenidos en la fuente de almidón. Sin embargo, en algunos casos el empleo de una glucosa preparada de esta manera conduce a una inhibición o a un retraso en la multiplicación de los microorganismos.

Como ya se ha explicado arriba, la glucosa acuosa producida por un proceso de molienda en seco con la licuefacción/sacarificación subsiguiente además de los componentes de azúcar fermentables, contiene también grandes cantidades de sólidos insolubles que no pueden fermentarse. Al emplear tal glucosa acuosa en una fermentación, ya sea para producción de bioetanol o para la producción de sustancias químicas refinadas, estos sólidos pasan a través de un proceso de fermentación e incrementan así la corriente de volumen. Después de la separación del producto de fermentación, éste permanece como sólido, el cual debe desecharse o en el mejor de los casos puede utilizarse como pienso. Sin embargo, puesto que los mismos componentes no fermentables representan parcialmente sustancias valiosas, se reportó de manera diferente la separación de una parte o de todos estos componentes antes de la fermentación.

De esta manera, en el contexto de la producción de bioetanol, las US 2005/0233030 y US 2005/0239181, así como N. Jakel in Biofuels Journal ([http://www.renessen.com/news\\_release/Renessen\\_ethanol\\_art.pdf](http://www.renessen.com/news_release/Renessen_ethanol_art.pdf)) describen una molienda en seco de maíz en la que el material molido se separa en una fracción de endosperma rica en almidón y una fracción de germen/fibra pobre en almidón y esencialmente sólo la fracción de endosperma se introduce a una licuefacción/sacarificación. De esta manera, puede reducirse la cantidad del subproducto que se genera en la producción fermentativa de etanol. Además, la fracción de germen/fibra puede utilizarse para la producción de aceite vegetal

En la US 4,287,304 se describe un proceso para la producción de una solución acuosa de glucosa a partir de maíz molido en seco. En este proceso, durante la molienda en seco primero se hace una separación en una fracción de germen/fibra y una fracción de endosperma rica en almidón que contiene, además del almidón, también componentes proteínicos (gluten) y partes del aceite contenido en los granos. La fracción de endosperma se alimenta a continuación a una licuefacción. Del hidrolizado parcial de almidón acuoso obtenido en este caso se separan los componentes insolubles, es decir proteína y componentes de aceite. A continuación, el almidón licuado, es decir, el hidrolizado de almidón parcial acuoso se alimenta a una sacarificación. Investigaciones propias de la solicitante han mostrado que la separación de los componentes insolubles es problemática y costosa en la etapa de almidón licuado y está ligada con pérdidas de glucosa. Además, de esta manera se obtiene una glucosa acuosa con una concentración comparativamente baja de glucosa.

En la CN 1173541 se describe un proceso para la producción de ácido láctico por fermentación en el cual una glucosa recuperada de maíz o arroz se emplea como fuente de azúcar. En el proceso allí descrito el maíz o el arroz se muelen en seco y el material molido obtenido en tal caso se lleva primero a una licuefacción. La lechada obtenida en tal caso se separa en una fase líquida, que contiene los componentes de almidón parcialmente hidrolizado, y una fase sólida que contiene componentes sólidos insolubles, no fermentables, del material molido. La fase líquida se alimenta a continuación a una sacarificación. Este proceso tiene desventajas similares como el proceso descrito en US 4,287,304. La separación de los componentes sólidos no fermentables antes de la fermentación sirve para su aprovechamiento como pienso.

Los documentos patentes WO 2006/004748 A (GRAINVALUE, LLC, 12. enero 2006) y US 4 448 881 A (MULLER, W.C. & MILLER, F.D., 15 de mayo de 1984) divulgan procesos para la producción de soluciones acuosas de glucosa a partir de maíz, que comprenden:

a) molienda en seco, fraccionante, de granos de maíz, en cuyo caso se separan los granos de maíz en una fracción de endosperma que contiene almidón de maíz y una fracción de germen rica en aceite y opcionalmente una fracción de salvado,

b) licuefacción y sacarificación enzimática de una parte del almidón de maíz en una suspensión acuosa de la fracción de endosperma, en cuyo caso se obtiene una solución acuosa de glucosa que contiene gluten de maíz,

c) empobrecimiento del gluten de maíz y opcionalmente del salvado presente de la solución acuosa de glucosa, en cuyo caso se determinan las soluciones de glucosa para la fermentación de etanol.

5 El documento patente WO 2005/116228 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT, 8 de diciembre de 2005) divulga un proceso para la producción de una solución acuosa concentrada de glucosa con un contenido de monosacárido de más de 20 % en peso a partir de maíz, el cual comprende:

a) molienda en seco de granos de maíz

10 b) licuefacción y sacarificación enzimática del almidón de maíz en una suspensión acuosa, en cuyo caso se obtiene una solución acuosa de glucosa, que contiene gluten de maíz, y la solución de glucosa se determina para la producción fermentativa de productos de la química fina.

15 El objetivo fundamental de la presente invención consiste en proporcionar un proceso para la producción de una glucosa acuosa a partir de maíz, el cual no presenta las desventajas del estado de la técnica. Principalmente, la glucosa obtenida en este caso debe ser adecuada no solo para la producción de bioetanol, sino también para la producción de productos de química fina distintos del mismo.

Este objetivo se logra mediante el proceso descrito a continuación. De esta manera, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de una solución acuosa de glucosa a partir de maíz, el cual comprende

20 a) molienda en seco, fraccionante, de granos de maíz, en cuyo caso se separan los granos de maíz en una fracción de endosperma que contiene almidón de maíz y una fracción de germen rica en aceite y opcionalmente una fracción de salvado;

b) licuefacción y sacarificación enzimáticas del almidón de maíz en una suspensión acuosa de la fracción de endosperma, en cuyo caso se obtiene una solución acuosa de glucosa, la cual contiene gluten de maíz; y

25 c) empobrecimiento del gluten de maíz y de salvado opcionalmente presente de la solución acuosa de glucosa, en cuyo caso en el paso b) se emplea una suspensión acuosa de la harina de maíz obtenida en el paso a), la cual contiene la fracción de endosperma y opcionalmente la fracción de salvado, en cuyo caso la cantidad de la harina de maíz se selecciona de tal manera que la suspensión acuosa contiene 30 a 45 % en peso de almidón, respecto del peso total de la suspensión.

30 El proceso de la invención está ligado con una serie de ventajas. Por un lado, el despliegue de aparatos, pero también el gasto de energía para la producción de una solución acuosa de glucosa según el proceso de la invención son mucho más bajos que según el proceso convencional de la molienda en mojado. Además, la glucosa que puede obtenerse según el método de la invención es adecuada de manera particular como fuente de carbono para procesos fermentativos para la producción de productos químicos. Su aptitud no solo es ostensiblemente mejor que la de una solución de glucosa que puede obtenerse de una harina de maíz preparada por molienda en seco mediante licuefacción/sacarificación, sino que en comparación con la glucosa pura o con una glucosa obtenida en un proceso de molienda en mojado, en una serie de microorganismos conduce a un crecimiento mejor de los microorganismos empleados para la fermentación y/o a rendimientos más altos, respecto de la glucosa empleada. Además, mediante el proceso de la invención pueden producirse soluciones de glucosa con concentración de glucosa más alta. Las propiedades de viscosidad de una glucosa que puede obtenerse según la invención son ostensiblemente superiores a aquellas de una glucosa que se ha producido por licuefacción/sacarificación de una harina de maíz preparada mediante molienda en seco convencional sin fraccionamiento.

40 Por los términos "salvado" o "cáscara" ha de entenderse la envoltura dura externa del grano de maíz, el pericarpio (por lo regular < 2 % en peso del grano de maíz). "Componentes de salvado" o "componentes de cáscara" son trozos o partes del mismo. La "fracción de salvado" o "fracción de cáscaras" se compone en su contenido esencial del salvado o de las cáscaras pero también puede contener otros componentes del grano de maíz, principalmente partes del endosperma.

45 Por el término "germen" o "brote" ha de entenderse el embrión del grano de maíz (por lo regular 8 a 10 % en peso del grano de maíz). "Componentes de brote" o "componentes de germen" son trozos o partes de los mismos. La "fracción de germen" o "fracción de brotes" se compone esencialmente de fracciones del germen o del brote, pero también puede contener otros componentes del grano de maíz como, por ejemplo partes de la endosperma o del salvado.

50

Por el término "endosperma" ha de entenderse la parte primaria del grano maíz que contiene almidón (por lo regular 80 a 85 % en peso del grano maíz). La "fracción de endosperma" se compone en partes esenciales de la endosperma, pero también puede contener otros componentes, por ejemplo partes del germen o del salvado.

5 Las soluciones de glucosa producidas según el proceso de la invención tienen una composición característica que no tienen las soluciones que fueron producidas de otra manera.

Además, el componente de proteína, gluten de maíz, generado en el paso c) del proceso de la invención, se caracteriza por una calidad particular que lo diferencia de los componentes de gluten generados mediante otros métodos de procesamiento de maíz y lo adecuado para muchas aplicaciones.

Paso a):

10 En el paso a) del proceso de la invención los granos de maíz se someten a una molienda fraccionante en seco. La molienda fraccionante sirve para triturar los granos de maíz y para la separación del grano de maíz en sus componentes, más precisamente germen, endosperma y componentes de cáscara (en lo sucesivo denominados también componentes de salvado).

15 De acuerdo con la invención, en esta etapa la cantidad principal, es decir menos de 70 % en peso, principalmente menos de 80 % en peso, de los gérmenes o componentes de germen contenidos en los granos de maíz, se separa de los demás componentes del grano de maíz como fracción de germen rica en aceite, es decir endosperma y componentes de cáscara. Por lo regular, al moler en seco con fraccionamiento también se efectúa una separación en una fracción de endosperma, la cual contiene esencialmente los componentes de almidón y proteína de los granos de maíz, así como en una fracción de salvado que contiene esencialmente, es decir al menos 60 % en peso, principalmente al menos 80 % en peso, de los componentes de cáscara contenidos en los granos de maíz.

20 Sin embargo, para impedir pérdidas de almidón una parte o toda la cantidad de la fracción de salvado, por ejemplo 10 a 100 % en peso, pueden llevarse a la licuefacción o a la sacarificación en el paso b) junto con la fracción de endosperma. Como alternativa es posible conducir la fracción de salvado para otro uso y conducir a la licuefacción/sacarificación en el paso b) solo la fracción de endosperma y opcionalmente cantidades bajas de salvado, es decir menos de 20 % en peso, respecto de los componentes de salvado contenidos en los granos de maíz.

25 Para la molienda fraccionante en seco de los granos de maíz pueden emplearse los granos de maíz tal como se suministran. Sin embargo, preferentemente se emplean granos de maíz limpios. En la limpieza, de los granos de maíz se retiran tanto las impurezas de partículas gruesas, por ejemplo, viruta, componentes vegetales tales como tallos u hojas, piedras, fragmentos de vidrio, tornillos, etc., como también impurezas de partículas finas, tales como granos de maíz partidos, semillas de otro tipo, guijarros y arena. La remoción puede efectuarse de una manera conocida, por ejemplo mediante tamizado, cribado o combinaciones de estas medidas. Por lo regular aquí se procede de tal modo que de los granos de maíz y de las impurezas de partículas finas primero se retiran las partículas gruesas, y luego se efectúa una remoción de las partículas finas de los granos de maíz. Como partículas gruesas se consideran aquellas cuyo tamaño de partícula se encuentra al menos por encima de un límite de 15 a 20 mm. Como partículas finas se consideran aquellas partículas cuyo tamaño de partícula no sobrepasa un valor de 5 a 6,5 mm.

30 Puesto que las impurezas además de arena y componentes de polvo contienen también granos de maíz partidos, es ventajoso si se someten las impurezas finas nuevamente a un fraccionamiento. Para esto se separan las impurezas finas en una primera fracción con un tamaño de partículas máximo de 3,5 a 4,5 mm, que en esencia contiene arena y otro material en polvo y una fracción algo más gruesa con tamaños de partícula de al menos 3,5 a 4,5 mm, que contiene esencialmente granos de maíz pequeños y partidos. Esta última fracción puede conducirse nuevamente al maíz limpio para reducir pérdidas de almidón. La primera fracción puede adicionarse a la fracción de salvado que resulta del fraccionamiento.

35 El maíz limpiado de esta manera se somete a continuación a la molienda fraccionante en seco. La molienda fraccionante se efectúa de una manera conocida per se. Por lo regular, la molienda en seco se divide en una primera etapa de molienda en la que se retira el germen o se efectúa una separación en una fracción de endosperma, una fracción de germen y una fracción de salvado, y una segunda etapa de molienda en la que se muele la fracción de endosperma en los tamaños de partícula deseada. Se entiende por el experto en la materia que la separación por lo regular no es completa sino que se realiza solo hasta la pureza deseada de las fracciones, es decir que después de la remoción del germen la fracción de endosperma contiene por lo regular además hasta 30 % en peso, preferentemente no más de 20 % en peso, de los componentes de germen contenidos en el grano de maíz y después de los componentes de salvado hasta 40 % en peso, preferentemente no más de 20 % en peso, de los componentes de cáscara contenidos en los granos de maíz.

5 En la primera etapa, la cual también se denomina con frecuencia como desgerminación de maíz, se trituran los granos de maíz, por ejemplo mediante molino de cilindros, tal como por ejemplo pueden obtenerse de las empresas Bühler AG u Ocrim spa, desgerminadores especiales, por ejemplo dispositivos con uno o varios rotores de rodillos que están rodeados por una camisa tamiz, o también mediante combinaciones de estos aparatos. El proceso puede llevarse a cabo en una etapa y preferentemente se realiza en varias etapas de molienda. Después de una operación de molienda, el material molido se separa en una manera conocida per se en una fracción de endosperma, una fracción del germen y una fracción de salvado. Aquí, se procede por lo regular de tal modo que primero se efectúa una separación en una fracción de endosperma y en una fracción de salvado y germen, y la fracción de salvado y germen que se ha retirado, se separa en un segundo paso en sus componentes. Puesto que los componentes de endosperma del material molido por lo regular tienen tamaños de partícula más pequeños que las partículas de la fracción de germen y de salvado del material molido, la primera separación puede efectuarse de una manera sencilla mediante un proceso de tamizado. La separación de la fracción de germen y de salvado del material molido puede efectuarse, por ejemplo, mediante cribado. Obviamente, los pasos individuales de separación pueden comprender combinaciones de estas medidas.

15 En una desgerminación de maíz de varias etapas la fracción de endosperma de una etapa precedente se sigue triturando en una etapa siguiente y se procesa de manera análoga al procedimiento descrito arriba. Los procesos de 2 a 4 etapas son típicos. La multiplicidad de etapas conduce a purezas superiores de las fracciones individuales y a rendimientos superiores de almidón de la fracción de endosperma.

20 Al usar desgerminadores, en la primera etapa pueden generarse partículas particularmente pequeñas que ya no pueden separarse mediante tamizado o cribado en las tres fracciones deseadas de endosperma, germen y salvado. Por lo regular estas partículas se adicionan a la fracción de salvado, en cuyo caso puede ser ventajoso adicionar estas partículas antes o durante la molienda fina de la fracción de endosperma para lograr un alto rendimiento de almidón.

25 Para la desgerminación de maíz se ha mostrado como ventajoso, si el maíz tiene una cierta humedad, que se encuentra en el rango de 5 a 30 % en peso y principalmente en el rango de 12 a 20 % en peso. Por consiguiente se mezcla maíz que no tiene la humedad deseada, antes o durante la desgerminación de maíz, con una cantidad baja de agua. Después de la adición de agua, el maíz se almacena antes de seguir procesando, preferentemente por un lapso de tiempo de 0,5 a 24 h, por lo cual la humedad adherida a la superficie puede difundir al interior del grano de maíz. Por lo regular, por lo tanto, la molienda en el paso a) se realiza en presencia de 5 a 30 % en peso de agua, respecto de la masa de los granos de maíz empleados. Preferentemente, la cantidad de agua es de 10 a 25 % en peso y principalmente 12 a 20 % en peso. El agua se adiciona preferentemente antes de la desgerminación de maíz, pero también puede adicionarse durante la desgerminación de maíz. En el caso de una desgerminación de múltiples etapas, entre los pasos respectivos de desgerminación puede ajustarse una vez más el contenido de agua. El agua también puede adicionarse opcionalmente en forma de vapor. Mediante análisis de los granos de maíz empleados, pero también del material molido contenido en la etapa respectiva, el experto en la materia puede determinar fácilmente el contenido de agua y calcular fácilmente cantidades requeridas de agua adicional.

35 Por lo regular, luego se efectúa al menos otra molienda de la fracción de endosperma, la cual también puede componerse de uno o más pasos de molienda. Aquí la fracción de endosperma se ajusta a los tamaños de partícula favorable para la licuefacción/sacarificación. Este paso también se denomina con frecuencia como molienda fina. En el caso de la molienda fina, la fracción de endosperma se muele por lo regular a un diámetro de partícula promedio en el rango de 0,05 a 1,5 mm y preferentemente a un tamaño de partícula en el rango de 0,1 a 1 mm y especialmente en el rango de 0,25 a 0,8 mm. El diámetro promedio de partícula está referido a la masa y se calcula de una manera conocida por el experto en la materia, preferentemente mediante análisis de tamizado. Principalmente se ha mostrado como ventajoso si al menos 80 % en peso, principalmente al menos 90 % en peso y especialmente al menos 95 % en peso de las partículas tienen un diámetro de no más de 0,4 mm. En el caso de la molienda fina, en el caso de realizarla en varias etapas, preferentemente después de cada operación de molienda, se efectúa una separación en partículas cuyo tamaño se encuentra por encima del tamaño máximo deseado y en partículas cuyo tamaño no sobrepasa el límite superior deseado. Solo las partículas demasiado grandes se conducen entonces a una operación más de molienda.

50 Como ya se explicó arriba, para impedir pérdidas de almidón se reintroduce una parte o la cantidad entera de la fracción de salvado a la fracción de endosperma. La reintroducción se efectúa preferentemente antes o durante la molienda fina. Sin embargo, preferentemente no se efectúa una reintroducción de la fracción de salvado a la fracción de endosperma.

Las fracciones separadas de esta manera tienen las siguientes composiciones:

55 El componente de salvado tienen de manera típica los siguientes componentes en las siguientes cantidades (respecto de la masa seca total):

Proteína cruda: 1 a 20 % en peso, preferible 5 a 15 % en peso

## ES 2 379 969 T3

Almidón: 1 a 30 % en peso, preferible 5 a 20 % en peso

Fibras crudas: 1 a 40 % en peso, preferible 5 a 20 % en peso

Grasa cruda: 0 a 20 % en peso, preferible 0,5 a 15 % en peso

Ceniza cruda: 0 a 10 % en peso, preferible 0,1 a 5 % en peso

- 5 La humedad del salvado se encuentra de manera típica entre 8 y 20 % en peso, preferible entre 10 y 17 % en peso.

El salvado de maíz es un material similar a una cáscara que se compone de partículas preponderante planas. El diámetro promedio de estas partículas planas se encuentra entre 0,5 mm y 8 mm, preferiblemente entre 0,6 mm y 5 mm. La altura promedio de las partículas planas se encuentra entre 0,01 mm y 4 mm, preferible entre 0,05 mm y 2 mm.

- 10 La fracción de germen tiene típicamente los siguientes componentes en las siguientes cantidades (respecto de la masa seca total):

Proteína cruda: 1 a 30 % en peso, preferible 5 a 20 % en peso

Almidón: 1 a 60 % en peso, preferible 5 a 50 % en peso

Fibras crudas: 1 a 20 % en peso, preferible 2 a 12 % en peso

- 15 Grasa cruda: 8 a 40 % en peso, preferible 10 a 35 % en peso

Ceniza cruda: 0 a 15 % en peso, preferible 0,1 a 10 % en peso

La humedad del germen de maíz se encuentra de manera típica entre 8 y 20 % en peso, preferible entre 10 y 15 % en peso.

- 20 El germen de maíz tiene una especie de forma de gota. El diámetro promedio de estas partículas se encuentra entre 0,1 mm y 5 mm, preferible entre 1 mm y 4 mm. La altura promedio de las partículas se encuentra entre 2 mm y 10 mm, preferible entre 3 mm y 8 mm.

La fracción de endosperma tiene de manera típica los siguientes componentes en las siguientes cantidades (respecto de la masa seca total):

Proteína cruda: 1 a 30 % en peso, preferible 5 a 15 % en peso

- 25 Almidón: 40 a 95 % en peso, preferible 60 a 90 % en peso

Fibras crudas: 0 a 20 % en peso, preferible 0,2 a 12 % en peso

Grasa cruda: 0,2 a 10 % en peso, preferible 0,5 a 5 % en peso

Ceniza cruda: 0 a 15 % en peso, preferible 0,1 a 3 % en peso

- 30 La humedad de la endosperma se encuentra de manera típica entre 8 y 20 % en peso, preferible entre 8 y 15 % en peso.

- 35 Para el germen, el salvado y la fracción de endosperma se indican solo los componentes relevantes para piensos, tal como resultan de un análisis típico para los mismos. En tal caso, el valor indicado para proteína cruda comprende el nitrógeno total según Kjeldahl multiplicado por el factor 6,25; luego, además de proteínas, también por ejemplo otros aminoácidos libres, ácidos nucleicos como también nitrógeno inorgánico. El valor indicado para las fibras crudas comprende como componente principal la celulosa y hemicelulosas, pero también se abarcan sustancias incrustantes como lignina. Con grasa cruda se abarcan todas las sustancias que se disuelven en solventes grasos como, por ejemplo, éter de petróleo o hexano como, por ejemplo, triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos. La ceniza cruda comprende todos los componentes orgánicos que quedan después de calentar por un largo lapso de tiempo a 550 °C. Esencialmente se trata de sustancias minerales en forma de óxidos y sales. Además del almidón analizado por separado, mediante el análisis seleccionado no se detectan polisacáridos que no son no almidón como, por ejemplo, pentosano; o se detectan pero de manera inexacta.
- 40

Las denominaciones usadas aquí de proteína cruda, componentes de fibra cruda, grasa cruda y ceniza cruda son familiares para el experto en la materia y se definen, por ejemplo, en Naumann, C., Bassler, R., 1976. VDLUFA-Methodenbuch (Libro de métodos), volumen 3, Die chemische Untersuchung von Futtermitteln (La investigación química de la comida para animales) (Colección de hojas sueltas con complementos de 1983, 1988, 1993, 1997 y 2004), Editorial VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Alemania [Recopilación de todos los parámetros/ métodos relevantes para la evaluación de productos alimenticios para animales en Alemania].

Paso b)

La harina de maíz obtenida de esta manera, la cual contiene esencialmente la fracción de endosperma y, opcionalmente, la fracción de salvado, se somete después a un proceso de licuefacción y sacarificación enzimática, en cuyo caso los componentes de almidón de la fracción de endosperma se hidrolizan para proporcionar glucosa. En un primer paso b.1) se realiza una licuefacción de la harina de maíz obtenida en el paso a), en cuyo caso los componentes de almidón de la harina de maíz se digieren o se hidrolizan típicamente para producir cadenas de azúcares con 4 a 20 y principalmente 8 a 12 unidades de glucosa. Este paso se denomina en lo sucesivo como licuefacción.

La licuefacción puede llevarse a cabo de la manera acostumbrada agregando enzimas. Los procesos para esto se conocen del estado de la técnica mencionado al inicio, por ejemplo, de "The Alcohol Textbook - A reference for beverage, fuel and industrial alcohol industries", capítulo 2, páginas 7 a 23.

Para esto, la harina de maíz obtenida en el paso a) primero se mezcla con un fluido acuoso, por ejemplo, agua fresca, agua de proceso recirculada, por ejemplo, de una fermentación o evaporación subsiguientes, o con una mezcla de estos fluidos, en cuyo caso se obtiene una suspensión acuosa. Con frecuencia, este procedimiento se denomina también machacado.

La cantidad de harina se selecciona de tal manera que la suspensión contiene 30 a 45 % en peso y preferible 32 a 38 % en peso de almidón, respecto del peso total de la suspensión (lechada). Puesto que 1 kg de almidón en una licuefacción/sacarificación por lo regular proporciona 1,0 a 1,1 kg de mono-, di- y oligosacáridos, la concentración total de mono-, di-, y/u oligosacáridos en la solución de glucosa después de la sacarificación se encuentra en el rango de hasta 495 g/kg y principalmente en el rango de 320 a 410 g/kg. Aquí la glucosa constituye por lo regular al menos 80 % en peso, principalmente al menos 90 % en peso, de mono-, di- y/u oligosacáridos respecto de la cantidad total de oligosacáridos.

La temperatura del agua empleada se selecciona por lo regular de tal manera que la suspensión tiene una temperatura en el rango de 30 a 60 °C, preferible 40 a 58 °C y muy particularmente preferible 50 a 55 °C. Preferentemente, no debe excederse de una temperatura de 60 °C a fin de impedir la formación no deseada de engrudo del almidón.

Para la licuefacción de la fracción de almidón en la harina de maíz, fundamentalmente pueden emplearse todas las enzimas que licúan almidón, principalmente  $\alpha$ -amilasas (clase de enzima EC 3.2.1.1), por ejemplo  $\alpha$ -amilasas, que pueden obtenerse de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus stearothermophilus*, entre otras aquellas que se usan para licuar materiales obtenidos mediante el proceso de *dry-milling* (molienda en seco) en el contexto de la producción de bioetanol. Las  $\alpha$ -amilasas adecuadas para la licuefacción también pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo de Novozymes bajo la denominación Termamyl 120 L, tipo L; o de Genencor bajo la denominación Spezyme. También puede emplearse una combinación de diversas  $\alpha$ -amilasas para la licuefacción. La concentración de la enzima en la lechada, respecto del contenido de almidón es por lo regular de 0,01 a 0,2 % en peso, particularmente preferible de 0,02 a 0,1 % en peso y muy particularmente preferible de 0,04 a 0,08 % en peso.

Ventajosamente las cantidad de enzima que licúa almidón y harina de maíz se seleccionan de tal modo que se reduce la viscosidad de manera suficiente durante la operación de gelificación con el fin de hacer posible una mezcla efectiva de la suspensión, revolviendo por ejemplo. Preferiblemente, la viscosidad de la mezcla de reacción durante la gelificación es de máximo 20 Pas, particularmente preferible de máximo 15 Pas y muy particularmente preferible de máximo 8 Pas. La medición de la viscosidad se efectúa por lo regular con un viscosímetro Haake, tipo Roto Visko RV20 con sistema de medición M5 y dispositivo de medición MVDIN a una temperatura de 50 °C y una velocidad de corte de 200 s<sup>-1</sup>.

Con frecuencia la licuefacción se realiza en presencia de al menos una sal de calcio. La concentración de calcio en la lechada se ajusta luego adicionando una sal de calcio por lo regular a 10 a 200 ppm, preferible 15 a 100 ppm y muy particularmente preferible a 20 a 60 ppm. La presencia de iones de calcio son embargo no es obligatoria, y se conoce una serie de enzimas licuefactoras para la licuefacción y sacarificación las cuales proporcionan buenas conversiones y rendimientos en ausencia de calcio, de modo que en estos casos puede prescindirse de la adición de sales de calcio.



- 5 Para una actividad óptima de la enzima de licuefacción de almidón, la licuefacción se realiza preferentemente al menos parcialmente a un pH óptimo de la enzima licuefactora, con frecuencia a un valor de pH en el rango débilmente ácido, por lo regular en el rango de 4,0 a 7,0, preferentemente en el rango de 5,0 a 6,5, particularmente preferible en el rango de 5,3 a 6,0. Usualmente se efectúa un ajuste de pH antes o al principio de la licuefacción; este valor de pH se controla por lo regular durante la licuefacción y opcionalmente se reajusta. El ajuste del valor de pH se efectúa de manera preferente con ácidos minerales diluidos como HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, con ácidos orgánicos como ácido acético, con hidróxidos de metal alcalino como NaOH o KOH, o hidróxidos de metal alcalino-térreo como hidróxido de magnesio o hidróxido de calcio. El ajuste de pH se efectúa preferentemente con hidróxido de calcio y/o ácido sulfúrico.
- 10 La preparación de la suspensión de harina de maíz puede efectuarse de manera discontinua o continua; cualquier producto para ajustar el valor de pH, como hidróxido de calcio y/o ácido sulfúrico y la enzima de licuefacción se mezclan previamente con el agua o pueden adicionarse individualmente a la mezcla de harina de maíz/agua. En tal caso, la secuencia de adición puede ser cualquiera. En el caso de la preparación discontinua de la suspensión de harina de maíz pueden emplearse todos los tipos de reactores con mezcladores. En el caso de la preparación
- 15 continua, por lo regular se emplean mezcladores continuos de operación lenta o rápida.
- La suspensión (lechada) preparada de esta manera se calienta luego preferentemente a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación del almidón usado. Por lo regular se selecciona una temperatura en el rango de 80 a 120 °C, preferible de 90 a 115 °C y particularmente preferible en el rango de 95 a 110 °C, en cuyo caso la temperatura se encuentra preferentemente al menos 5 K, principalmente 10 K y particularmente preferible al
- 20 menos 20 K, por ejemplo 10 a 80 K, principalmente 20 a 60 K, por encima de la temperatura de gelificación (temperatura de formación de engrudo). La licuefacción también puede realizarse por debajo de la temperatura de formación de engrudo, usando por ejemplo las enzimas o las combinaciones de enzimas descritas en WO 2004/113551.
- 25 En una forma preferida de realización para la licuefacción de la fracción de almidón, se calienta primero la lechada a una temperatura por encima de la temperatura de formación de engrudo del almidón, introduciendo vapor directamente. De manera típica se calienta a una temperatura que se encuentra al menos 10 K y principalmente al menos 20 K, por ejemplo 10 a 80 K, principalmente 20 a 60 K por encima de la respectiva temperatura de formación de engrudo. Preferentemente se calienta la suspensión a temperaturas en el rango de 80 a 120 °C, principalmente en el rango de 90 a 115 °C y especialmente en el rango de 95 a 110 °C.
- 30 El vapor empleado directamente para calentar es normalmente vapor de agua recalentado que tiene una temperatura de al menos 105 °C, principalmente de al menos 110 °C, por ejemplo en el rango de 110 a 210 °C. Aunque el empleo de vapor saturado es igualmente posible. El vapor se introduce a la suspensión preferentemente con sobrepresión. Por consiguiente, el vapor tiene preferentemente una presión de al menos 1,5 bar, por ejemplo de 1,5 a 16 bar, principalmente de 2 a 12 bar.
- 35 La introducción de vapor directamente a la suspensión se efectúa por lo regular de tal manera que el vapor se genera en la suspensión con sobrepresión, preferentemente con una sobrepresión de 1 a 10 u 11 bar, principalmente 1,5 a 5 bar y preferentemente con alta velocidad. Mediante la generación del vapor, la suspensión se calienta de manera instantánea a temperaturas por encima de 90 °C, es decir a temperaturas por encima de la temperatura de formación de engrudo.
- 40 El calentamiento se efectúa preferentemente con vapor directo en un dispositivo que opera continuamente, al cual se introduce la lechada de manera continua con una presión de transporte determinada que resulta de la viscosidad de la suspensión, de la velocidad de transporte y de la geometría del dispositivo, y al cual se introduce el vapor caliente con sobrepresión, respecto de la presión de transporte, en la zona de alimentación, a través de una boquilla regulable. Alimentando el vapor con sobrepresión, no solo se calienta la suspensión sino que también se produce
- 45 energía mecánica en el sistema, la cual promueve más la mezcla de las partículas de harina de maíz, provoca un suministro de energía particularmente uniforme y de esta manera tiene como consecuencia una formación de engrudo de las partículas granulares de almidón en la harina de maíz. Normalmente, estos dispositivos tienen una geometría tubular. La generación del vapor se efectúa preferentemente en dirección del eje longitudinal del dispositivo tubular. La suspensión se suministra por lo regular en un ángulo plano hacia la corriente de vapor que
- 50 por lo regular no excede 50°. La boquilla regulable tiene normalmente una geometría cónica que se estrecha en dirección del flujo del vapor. En esta boquilla se encuentran dispuestos una aguja o un cono dispuesto sobre una barra desplazable en dirección longitudinal. La aguja o el cono forman con el cono de la boquilla una ranura. Desplazando la aguja o la barra en dirección longitudinal puede ajustarse de manera sencilla el tamaño de la ranura y con esto el área del corte transversal de la abertura de boquilla, por lo cual puede regularse de manera sencilla la
- 55 velocidad de entrada de vapor.
- Normalmente, estos dispositivos tienen un tubo de mezclado en el que la suspensión se transporta después de la entrada del vapor y se descarga del dispositivo. Este tubo de mezclado está dispuesto usualmente en dirección de la entrada del vapor. El tubo de mezclado forma normalmente una ranura con la boquilla a través de la cual se

transporta la suspensión. A través de esta ranura durante el transporte se producen fuerzas de corte adicionales sobre la suspensión e incrementan de esta manera la entrada de energía mecánica a la suspensión. El tubo de mezclado puede estar dispuesto de manera desplazable en dirección longitudinal. Desplazando el tubo de de mezclado el tamaño de la abertura de ranura puede ajustarse de manera sencilla y con esto la diferencia de presión en el dispositivo.

Dispositivos de este tipo se conocen en el estado de la técnica como aparatos de cocción a chorro, por ejemplo el dispositivo representado en "The Alcohol Textbook", capítulo 2, loc. cit., figura 13 y que se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo bajo la denominación HYDROHEATER® o JetCooker® de la empresa Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, USA.

La lechada calentada con vapor directo se transfiere por lo regular a continuación a una zona de reacción posterior con el fin de continuar la gelificación de los componentes de almidón. Simultáneamente, la enzima licuefactora empieza a hidrolizar el almidón. En la zona de reacción posterior normalmente rige una sobrepresión, normalmente una presión absoluta en el rango de 2 a 8 bar. Las temperaturas en la zona de reacción posterior se encuentran típicamente en el rango de 80 a 120 °C, principalmente en el rango de 90 a 115 °C. El tiempo de residencia en esta zona de reacción posterior, dependiendo de la temperatura de la suspensión, puede estar en el rango de 1 a 30 min, con frecuencia de 2 a 20 min, y principalmente de 5 a 10 min. Las zonas de reacción posterior tienen típicamente una geometría tubular o con forma de columna. En una forma de realización, la zona de reacción posterior tiene la geometría de una columna dispuesta verticalmente. La suspensión se aplica en la zona superior de la columna después de dejar el dispositivo para el tratamiento de vapor y se recoge en la zona inferior. En otra forma de realización de la invención, la zona de reacción posterior tiene una geometría tubular.

Después de dejar la zona de reacción posterior la suspensión se refrigera por lo regular y se realiza una segunda licuefacción. Esta refrigeración puede efectuarse mediante despresurización de la solución que se encuentra bajo presión. La despresurización se realiza preferentemente como una evaporación rápida (flash) con el fin de enfriar la suspensión, preferentemente a temperaturas por debajo de 110 °C, principalmente por debajo de 105 °C, por ejemplo en el rango de 80 a 110 °C, preferible de 90 a 105 °C y muy particularmente preferible 95 a 100 °C. Por lo regular luego se efectúa una licuefacción del almidón digerido de esta manera en un recipiente de reacción separado. Opcionalmente puede ser práctico en lugar de adicionar la cantidad total de la enzima licuefactora antes o durante el calentamiento, adicionar una cantidad parcial de la misma a la segunda licuefacción después de ajustar la temperatura. Esta cantidad parcial puede ser de 0 a 80 %, preferible de 10 a 60 % y muy particularmente preferible de 15 a 40 % de la cantidad total de la enzima de licuefacción. La segunda licuefacción puede efectuarse durante un lapso de tiempo de 30 a 240 min, preferible de 45 a 180 min y muy particularmente preferible de 60 a 120 min. La segunda licuefacción puede efectuarse en un tubo de flujo continuo, de manera continua en una cascada de reactores o en tanques discontinuos con dispositivos para revolver. Al usar tanques con dispositivos para revolver es ventajoso proporcionar un número suficiente de tanques con dispositivos para revolver, lo cual permite una limpieza de tanques individuales con dispositivos para revolver de manera paralela a la operación en curso sin perder su capacidad.

Para degradar completamente el almidón en dextrinas, la mezcla de reacción se mantiene a la temperatura establecida, u opcionalmente se calienta más, hasta que la detección de almidón con yodo u opcionalmente resulta negativa otra prueba para detectar almidón o al menos esencialmente negativa. Aquí opcionalmente a la mezcla de reacción pueden adicionarse además una o varias cantidades más de  $\alpha$ -amilasa, por ejemplo en el rango de 0,001 a 0,5 % en peso y preferible 0,002 a 0,2 % en peso, respecto de la cantidad total de la fuente de almidón empleada.

En lugar de calentar la lechada mediante vapor directo también puede calentarse indirectamente con un medio de calentamiento, por ejemplo vapor, en intercambiadores de calor llamados "wide gap", a la temperatura deseada, por lo cual se impide una dilución de la suspensión de harina de maíz por el vapor generado. Por lo regular aquí también se realiza una reacción posterior y una segunda licuefacción, como se describe para el calentamiento para vapor directo. Respecto de las medidas tomadas en tal caso se aplica lo dicho previamente de manera análoga.

De esta manera se obtiene un hidrolizado acuoso parcial de almidón que contiene la fracción licuada de almidón a partir de la harina de maíz, típicamente dextrina y opcionalmente otros oligosacáridos y mono- o disacáridos, así como los componentes de proteína y opcionalmente de salvado de la harina de maíz.

Después de terminada la licuefacción del almidón se efectúa una sacarificación de las dextrinas contenidas en el hidrolizado parcial de almidón, es decir su degradación en glucosa o sacarosa. La sacarificación puede realizarse continua o discontinuamente de una manera conocida per se.

La sacarificación de las dextrinas (es decir oligosacáridos) en la solución licuada de almidón se efectúa por lo regular de manera enzimática, es decir con ayuda de al menos una enzima que sacarifica las dextrinas. Para esto pueden emplearse fundamentalmente todas las glucoamilasas (clase de enzima EC 3.2.1.3), principalmente glucoamilasas, que se recuperaron de *Aspergillus* y especialmente aquellas que se usan para la sacarificación de materiales recuperados mediante el método de *dry-milling* (molienda en seco) en el contexto de la producción de bioetanol. Las

glucoamilasas adecuadas para la sacarificación también se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo de Novozymes bajo la denominación Dextrozyme GA; o de Genencor bajo la denominación Optidex. También puede emplearse una combinación de diversas glucoamilasas.

5 Por lo menos una enzima de sacarificación, principalmente al menos una glucoamilasa, se adiciona al medio líquido que contiene dextrina obtenida después de la licuefacción, usualmente en una cantidad de 0,001 a 5,0 % en peso, preferible de 0,005 a 3,0 % en peso y particularmente preferible de 0,01 a 1,0 % en peso, respecto de la cantidad total de la fuente de almidón.

10 Por lo regular, la solución de almidón licuado usualmente se enfría o se acondiciona a la temperatura óptima de la enzima de sacarificación o ligeramente por debajo, por ejemplo a 40 a 70 °C, preferible 50 a 65 °C y principalmente 60 a 63 °C y a continuación se mezcla con la enzima de sacarificación. Preferentemente, el hidrolizado acuoso parcial de almidón se somete a una sacarificación inmediatamente a continuación de la licuefacción. El hidrolizado acuoso parcial de almidón se enfría luego a las temperaturas arriba indicadas antes de que se adicione la enzima de sacarificación. Este enfriamiento se efectúa ventajosamente en un intercambiador de calor, en cuyo caso la energía que se desprende puede utilizarse para el precalentamiento de otras corrientes del proceso.

15 La sacarificación se efectúa ventajosamente a un valor de pH en el rango de acción óptimo de la enzima empleada, preferentemente a un valor de pH en el rango de 3,0 a 5,5, principalmente en el rango de 4,0 a 5,0 y particularmente preferible en el rango de 4,2 a 4,8. Preferentemente, el valor de pH se ajusta al valor deseado antes de la adición de la enzima de sacarificación, principalmente de la glucoamilasa.

20 La sacarificación puede efectuarse discontinuamente en reactores con dispositivos para revolver o continuamente en un tubo de flujo o particularmente preferible en una cascada de tanques con dispositivos para revolver. Al usar los tanque con dispositivos para revolver es ventajoso proporcionar un número suficiente de tanques con dispositivos para revolver, que permite limpiar los tanques de manera paralela a la operación en curso sin perder capacidad.

25 Después de adicionar la enzima de sacarificación, la suspensión que contiene dextrina se mantiene a la temperatura establecida preferentemente por un lapso de tiempo de, por ejemplo, 8 a 72 h o más, si se requiere, a menudo 12 a 60 h, preferiblemente 24 a 54 h y particularmente preferible 36 a 48 h, en cuyo caso las dextrinas se sacarinizan en mono- y disacáridos. El progreso de la sacarificación puede seguirse mediante métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo HPLC, ensayos de enzima o tiras reactivas con la glucosa. La sacarificación finaliza cuando la concentración de los monosacáridos esencialmente no se incrementa más o cuando vuelve a disminuir.

Paso c):

30 Mediante la sacarificación se obtiene una solución acuosa de glucosa que contiene además los componentes aún no hidrolizados de la harina de maíz como sólidos en forma suspendida. Estos sólidos son en primer lugar un sólido rico en proteína que aquí y en lo sucesivo se denomina gluten de maíz, y componentes de salvado, si se ha realizado una recirculación del salvado durante la molienda. Estos componentes se reducen en el paso c) del proceso de la invención en la solución de glucosa. En tal caso puede procederse de tal manera que la cantidad total de la solución de glucosa, preparada en el paso b), que contiene gluten de maíz se somete a una separación de sólidos. Sin embargo también puede someterse solo una corriente parcial de la solución de glucosa preparada en el paso b) la cual contiene gluten de maíz a la separación de sólidos y la glucosa restante, que contiene gluten de maíz, puede llevarse para otro uso, por ejemplo para una producción de bioetanol.

40 Por lo regular, una disminución se realiza en la medida que se separen al menos 80 % en peso, preferentemente al menos 90 % en peso y principalmente al menos 95 % en peso de los componentes de gluten o los componentes de salvado contenidos en la solución de glucosa.

La extracción del gluten de maíz y del salvado opcionalmente presente puede efectuarse mediante cualquier proceso conocido sólido/líquido, en cuyo caso se prefieren procesos mecánicos como centrifugación, decantación y filtración, incluyendo combinaciones de estas medidas.

45 Para extraer los sólidos de la solución de glucosa se ha mostrado ventajoso si la solución de glucosa sometida a extracción tiene una temperatura en el rango de 60 a 100 °C, principalmente en el rango de 70 a 90 °C y particularmente preferible en el rango de 75 a 85 °C. Para esto, por lo regular se calienta a la temperatura deseada la solución de glucosa obtenida en el paso b) antes de la reducción de los componentes sólidos gluten y salvado. El calentamiento se efectúa ventajosamente en un intercambiador de calor en cuyo caso puede utilizarse la energía necesaria para enfriar otras corrientes del proceso.

Además, se ha mostrado ventajoso que el valor de pH de la solución de glucosa antes de la reducción de los sólidos se ajuste a un valor en el rango de 4,0 a 6,5, principalmente en el rango de 4,5 a 6,0 y particularmente preferible en

el rango de 5,0 a 5,5. Para ajustar el valor de pH puede emplearse cualquier base, aunque preferentemente un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de sodio o amoníaco.

5 En el caso de la reducción se obtiene una solución de glucosa pobre en sólidos y una fracción rica en sólidos que contiene gluten de maíz y opcionalmente componentes de salvado y que tiene una fracción de glucosa más baja que la solución de glucosa pobre en sólidos.

10 La solución de glucosa pobre en sólidos puede contener además cantidades pequeñas de sólido no disuelto, en cuyo caso la cantidad por lo regular excede de 15 % en volumen, principalmente 10 % en volumen y especialmente 5 % en volumen, respecto del volumen total de la solución acuosa de glucosa, y se encuentra con frecuencia en el rango de 0,001 a 15 % en volumen, principalmente en el rango de 0,01 a 10 % en volumen y particularmente preferible en el rango de 0,02 a 5 % en volumen, respecto del volumen total de la solución acuosa de glucosa. La determinación del sólido no disuelto se efectúa mediante centrifugación de la solución de glucosa en tubitos graduados de centrífuga a 1650 g durante 15 min y mediante lectura a continuación de la cantidad de sólido no disuelto.

15 Para lograr un rendimiento de glucosa alto es ventajoso si la fracción rica en sólidos se resuspende en agua y a continuación se somete a una nueva separación sólido/líquido. La cantidad de agua se encuentra típicamente en el rango de 3 a 15 l/kg de sólido suspendido, calculado como sustancia seca o en el rango de 3 a 20 l por l de sólido húmedo separado. Mediante esta segunda separación sólido/líquido se obtiene una fase líquida que contiene partes disueltas de glucosa que estaban contenidas en la fase sólida de la primera separación sólido/líquido. La fase líquida se vierte luego a la fase líquida de la primera separación sólido/líquido. Para seguir incrementando el rendimiento de glucosa, esta operación, es decir la resuspensión en agua del sólido obtenido y la separación sólido/líquido a continuación, puede repetirse una o varias veces, en cuyo caso las soluciones acuosas de glucosa obtenidas en cada caso se vierten a la solución obtenida en la primera separación sólido/líquido.

20 La temperatura a la que se lleva a cabo la segunda y opcionalmente las otras separaciones sólido/líquido se encuentra típicamente en el rango de 60 a 100 °C, preferentemente en el rango de 70 a 90 °C y particularmente preferible en el rango de 75 a 85 °C. Respecto del valor de pH se aplica lo dicho previamente para la primera separación sólido/líquido.

25 El agua que se usa para resuspender la fracción rica en sólidos de la primera y de la segunda separaciones sólido/líquido puede ser agua fresca Sin embargo, con frecuencia para resuspender se emplea la solución acuosa de glucosa de una separación sólido/líquido con el fin de, primero, reducir la dilución de las soluciones de glucosa pobres en sólidos, combinadas, de las etapas individuales de separación sólido/líquido a causa del agua fresca y, segundo, disminuir la demanda de agua fresca en total. Por ejemplo, en tres separaciones sucesivas de sólido/líquido, la fase líquida de la tercera separación sólido/líquido se usa para resuspender la fase de sólidos de la segunda separación sólido/líquido y la fase líquida de la segunda separación sólido/líquido se usa para resuspender las fase rica en sólidos de la primera separación sólido / líquido. Aunque, además del agua fresca, también puede emplearse agua del proceso que se genera, por ejemplo, como condensado al evaporarse más tarde la solución de glucosa, o que se genera al secar los productos secundarios (por ejemplo, gluten de maíz o biomasa).

30 Para seguir reduciendo los sólidos en las soluciones acuosas de glucosa obtenidas de esta manera puede ser ventajoso someterlas a una, así llamada, etapa de acabado con el fin de reducir los sólidos allí contenidos. La reducción de concentración adicional puede efectuarse de cualquier manera conocida de separación sólido/líquido, como por ejemplo filtración con membrana, incluyendo microfiltración y ultrafiltración, filtración convencional, flotación, centrifugación, decantación o separación. También son concebibles formas de realización de varias etapas que resultan de cualquier combinación de los métodos nombrados aquí.

35 La solución de glucosa, pobre en sólidos, la cual puede obtenerse de la glucosa acuosa obtenida en el paso b) después de la reducción de concentración del gluten de maíz y del salvado opcionalmente presente, es nueva y es adecuada de manera particular para la preparación de productos químicos.

40 Por la fracción de masa seca se entiende la cantidad total de sólidos disueltos y no disueltos en la solución acuosa de glucosa. Estos pueden determinarse mediante evaporación de la solución de glucosa de una manera conocida. Para esto se evapora una determinada cantidad de la respectiva solución de glucosa en la estufa de secado a 80 °C hasta que se seque. El pesaje del residuo seco proporciona el contenido de masa seca. De manera alternativa pueden emplearse balanzas para peso seco, como se venden para este propósito, por ejemplo, por la empresa PCE Deutschland, Meschede.

45 Respecto de los sólidos contenidos en la solución acuosa de glucosa, la solución acuosa de glucosa tiene los siguientes componentes característicos:

## ES 2 379 969 T3

a) 80 a 98 % en peso, preferentemente 93 a 97 % en peso de azúcar en forma de glucosa y opcionalmente disacáridos como sacarosa, maltosa e isomaltosa,

b) 1 a 7 % en peso, con frecuencia 2 a 7 % en peso, preferentemente 2,5 a 5 % en peso de proteína cruda,

c) 0,001 a 0,1 % en peso, con frecuencia 0,01 a 0,1 % en peso de fibras crudas,

5 d) 200 a 1500 mg/kg, preferentemente 600 a 1200 mg/kg de aminoácidos libres y

e) 0,01 a 1 % en peso de componentes de ceniza cruda.

10 Además, la solución de glucosa también puede contener cantidades pequeñas de aceite/grasa de la fracción de germen. Sin embargo, la cantidad principal de cualquier componente de aceite/grasa se separa por lo regular junto con el gluten en el paso c). Lo mismo aplica para cualquier componente de salvado que no se haya separado antes de la sacarificación.

En el proceso de la invención se genera en una cantidad de 4 a 40 % en peso, principalmente 8 a 30 % en peso, respecto de la masa seca del maíz empleado. El gluten de maíz tiene por lo regular la siguiente composición en bruto, en cuyo caso los datos se refieren en cada caso a la masa seca total del gluten de maíz.

a) 10 a 60 % en peso, principalmente 20 a 55 % en peso de proteína cruda;

15 b) 1 a 60 % en peso, principalmente 2 a 45 % en peso de componentes de azúcar;

c) hasta 20 % en peso, con frecuencia 0,5 a 10 % en peso de grasa cruda, grasa vegetal y/o aceites vegetales;

d) hasta 20 % en peso, principalmente 1 a 12 % en peso de componentes de fibra cruda; y

e) hasta 15 % en peso, por ejemplo 0,1 a 10 % en peso, de componentes sólidos distintos de estos, también denominados ceniza cruda.

20 El gluten de maíz separado en el paso c) es un sólido en forma de partículas finas que, después de la separación, tiene por lo regular una humedad en el rango de 50 a 85 % en peso y principalmente en el rango de 55 a 75 % en peso, respecto de la masa total del gluten de maíz separado. El gluten de maíz puede secarse de una manera conocida per se hasta producir un polvo de partículas, que no se suelta o se suelta ligeramente. La humedad se encuentra entonces típicamente por debajo de 50 % en peso, por lo regular por debajo de 30 % en peso y  
25 especialmente por debajo de 15 % en peso. Un gluten de maíz húmedo con una fracción de masa seca de 35 % en peso, o un contenido de agua de 185 %, respecto del gluten de maíz seco, se comporta como un sólido.

El tamaño de partícula promedio de las partículas de gluten de maíz (promedio en peso determinado por dispersión de luz o análisis de tamizado), se encuentra de manera típica en el rango de 50 a 600  $\mu\text{m}$  y principalmente en el rango de 100 a 500  $\mu\text{m}$ .

30 El gluten de maíz tiene una alta capacidad de absorción de agua y está en capacidad de absorber hasta 185 % en peso de agua respecto de su peso seco sin volverse pegajoso. Por lo tanto es adecuado de manera particular como auxiliar de formulación, principalmente para la producción de formulaciones sólidas de sustancias húmedas o pastosas que por su parte tienden a aglutinarse. El gluten de maíz es principalmente adecuado para la formulación de una biomasa, tal como se genera en el caso de una fermentación. De esta manera se obtiene un producto no  
35 pegajoso que contiene biomasa y un gluten de maíz, el cual puede emplearse, por ejemplo, como producto de forraje o pienso o componente de producto de forraje y pienso.

El gluten de maíz se caracteriza además por una capacidad de absorción alta para aceites y sustancias oleosas, principalmente para aceites vegetales. Es adecuado por lo tanto en medida particular para la preparación de formulaciones sólidas de aceites vegetales o componentes de aceite vegetal de alto valor o sustancias con  
40 propiedades comparables como tocoferoles.

La glucosa acuosa obtenida después de la/las separación(es) sólido/líquido puede concentrarse opcionalmente en una evaporación de una o más etapas a la concentración deseada de glucosa. Para esto se concentra la solución acuosa de glucosa a temperaturas en el rango de 50 a 100 °C, preferentemente en el rango de 70 a 95 °C y  
45 particularmente preferible en el rango de 80 a 90 °C, preferentemente aplicando presión reducida. Preferentemente, la concentración opera hasta que se logre una concentración de glucosa de al menos 40 % en peso, principalmente de al menos 50 % en peso y particularmente preferible de al menos 55 % en peso, por ejemplo en el rango de 40 a

80 % en peso, preferible en el rango de 50 a 70 % en peso y muy particularmente preferible en el rango de 55 a 65 % en peso.

Uso de la glucosa para la producción de sustancias orgánicas

5 La solución de glucosa obtenida de esta manera puede usarse a continuación como una fuente de carbono para la producción de sustancias orgánicas, es decir productos de químicos.

10 El término productos químicos debe interpretarse de manera amplia y abarca todas las sustancias orgánicas, es decir compuestos definidos pero también oligómeros, polímeros, incluidas enzimas, pero también biomasa como, por ejemplo, levaduras o proteína unicelular (Single Cell), que se producen o pueden producirse a partir de glucosa. La preparación de la sustancia orgánica puede efectuarse tanto mediante fermentación como también de manera no fermentativa. El proceso ofrece principalmente ventajas durante la producción de productos químicos que son diferentes de etanol, puesto que aquí existen por lo regular requisitos más altos a la calidad de la glucosa.

15 Ejemplos de sustancias orgánicas, que pueden producirse de modo no fermentativo a partir de glucosa, comprenden 5-hidroximetilfurfural, ácido levúlico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido 2-ceto-glucónico, ácido glutárico, sorbitol, isosorbida y alquilpoliglucósidos, polioles como etilenglicol, propilenglicol y HFCS (High-Fructose-Corn Syrup).

Ejemplos de sustancias orgánicas que pueden prepararse de modo fermentativo a partir de glucosa:

20 - ácidos mono-, di- y tricarboxílicos que tienen opcionalmente grupos hidroxilo con 2 a 10 átomos de C, por ejemplo ácido tartárico, ácido itacónico, ácido succínico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido 2,5-furandicarboxílico, ácido glutárico, ácido levúlico, ácido glucónico, ácido aconítico, ácido diaminopimélico y ácido cítrico;

- aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, por ejemplo lisina, glutamato, metionina, fenilalanina, ácido aspártico, triptófano y treonina;

- bases de purina y bases de pirimidina;

25 - Nucleósidos y nucleótidos, por ejemplo dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) y adenosina-5'-monofosfato (AMP);

- lípidos,

- ácidos grasos saturados e insaturados con preferentemente 10 a 22 átomos de C, por ejemplo ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico;

- dioles con 3 a 10 átomos de C, por ejemplo propanodiol y butanodiol;

30 - alcoholes polihídricos con 3 o más grupos hidroxilo, por ejemplo con 3, 4, 5 o 6 grupos OH, por ejemplo glicerina, sorbitol, manitol, xilitol y arabinitol;

- alcoholes de cadena larga con al menos 4 átomos de C, por ejemplo con 4 a 22 átomos de C, por ejemplo butanol; carbohidratos, por ejemplo ácido hialurónico y trehalosa;

- carbohidratos;

35 - aminas alifáticas, principalmente diaminas alifáticas con 3 a 10 átomos de C como 1,5-pentandiamina;

- compuestos aromáticos, por ejemplo aminas aromáticas, vainillina e índigo;

- vitaminas y provitaminas, por ejemplo ácido ascórbico, vitamina B6, vitamina B12 y riboflavina;

- cofactores y nutracéuticos;

40 - Proteínas, por ejemplo enzimas como amilasas, pectinasas, celulasas ácidas, híbridas o neutrales, esterases como lipasas, pancreasas, proteasas, xilanasas y oxidoreductasas como lacas, catalasa y peroxidasa, glucanasas y fitasas;

- levaduras, por ejemplo levaduras para hornear o levaduras de cerveza;
- carotenoides, por ejemplo licopeno,  $\beta$ -caroteno, astaxantina, zeaxantina y cantaxantina;
- cetonas con 3 a 10 átomos de C, por ejemplo acetona y acetoína;
- lactonas, por ejemplo  $\gamma$ -butirolactona;

- 5
- polihidroxicanoatos, por ejemplo polihidroxiacetato;
  - poliláctidos;
  - polisacáridos, por ejemplo glucano, manano, galactano;
  - poliisoprenoides;
  - poliamidas y
- 10
- ciclodextrinas.

El término "cofactor" comprende compuestos del tipo no proteína que son necesarios para la aparición de una actividad enzimática normal. Estos compuestos pueden ser orgánicos o inorgánicos; Las moléculas de cofactor son preferentemente orgánicas. Ejemplos de tales moléculas son NAD y fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADP); el precursor de estos cofactores es niacina.

- 15
- El término "nutracéutico" comprende complementos nutritivos que son saludables en plantas y animales, principalmente al ser humano. Ejemplos de tales moléculas son vitaminas, antioxidantes y determinados lípidos, por ejemplo ácidos grasos poliinsaturados.

Uso de la glucosa en una fermentación

- 20
- Se revela además el uso de la solución de glucosa que puede obtenerse según la invención como fuente de glucosa para la producción fermentativa de una sustancia orgánica, tal como se define arriba.

Se revela un proceso para la producción de una sustancia orgánica mediante fermentación, el cual comprende los siguientes pasos:

- i. proporcionar una solución acuosa de glucosa, por ejemplo mediante la producción de la solución de glucosa mediante el proceso de la invención y
- 25
- ii. adicionar la solución de glucosa a un medio de fermentación que contiene un microorganismo que es capaz de sobreproducir la sustancia orgánica.

La realización de la fermentación puede efectuarse de las manera y el modo usuales, conocidos por el experto en la materia. Para esto, por lo regular se cultiva el microorganismo respectivo deseado usando una glucosa acuosa preparada de acuerdo con la invención.

- 30
- El proceso de fermentación puede operarse tanto de manera discontinua (procedimiento por lotes) como también de manera semi-continua (procedimiento Fed-Batch (lote alimentado) incluyendo *fed-batch* con cosecha intermedia), en cuyo caso se prefiere el procedimiento semicontinuo.

- 35
- Por ejemplo, la solución acuosa de glucosa obtenida de acuerdo con el proceso de la invención puede - opcionalmente junto con una fuente de azúcar convencional, es decir mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables o la composición que contiene mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos 45 % en peso y que es de manera típica esencialmente libre de sólidos insolubles en agua, por ejemplo una melaza de baja calidad (Low Quality Molasse) con 45 y 50 % en peso de azúcar - opcionalmente después de diluir con agua y adicionar componente de medio usuales como búfer, sales nutritivas, fuentes de nitrógeno, como sulfato de amonio, urea, etc., componentes nutritivos complejos que contienen aminoácidos, tales como extractos de levaduras, peptona, CSL y similares, inocularse con el microorganismo deseado y multiplicar éste en condiciones de fermentación hasta que la concentración de microorganismos logre el estado estacionario deseado para la fermentación. Aquí, los azúcares contenidos en la solución de glucosa se metabolizan y se forma el producto valioso deseado (llamado procedimiento por lotes o fase por lotes).
- 40

Debido al gran contenido de aminoácidos libres en la glucosa, de manera sorprendente puede prescindirse de la adición de otros componentes nutritivos complejos o su cantidad reducirse de manera drástica, lo cual es una ventaja más de la solución de glucosa.

5 En el caso del procedimiento *fed-batch* (lote alimentado) se continúa el proceso de fermentación mediante adición de la glucosa que puede obtenerse de acuerdo con la invención. En tal caso, el producto metabólico sobreproducido por el microorganismo se acumula en el caldo de fermentación, en cuyo caso el producto del metabolismo puede estar presente tanto en las células del microorganismo como también en la fase acuosa del medio de fermentación.

10 La fermentación se realiza preferentemente de manera semicontinua, es decir como *fed-batch*. En tal caso se procede de tal modo que primero se multiplica el microorganismo usando una solución de glucosa y/u otra fuente de azúcar hasta que se alcance la concentración de microorganismos deseada en el fermentador. A continuación se introduce la glucosa acuosa al fermentador. De esta manera se mantiene el proceso de fermentación y el metabolito sobreproducido por el microorganismo se acumula en el caldo de fermentación (véase arriba). El contenido de azúcar en el licor de fermentación puede regularse principalmente a través de la velocidad de introducción de la glucosa acuosa al caldo de fermentación. Por lo regular la velocidad de introducción se ajusta de tal modo que la  
15 concentración de glucosa en el caldo de fermentación se encuentra en el rango de  $> 0$  % en peso hasta aproximadamente 5 % en peso y principalmente no excede un valor de 3 % en peso.

20 La glucosa puede esterilizarse opcionalmente antes de la fermentación, en cuyo caso usualmente se matan los microorganismos contaminantes mediante proceso térmico. Para esto se calienta el medio líquido que contiene azúcar usualmente a temperaturas por encima de 80 °C. La destrucción o la lisis de los contaminantes pueden efectuarse inmediatamente antes de la fermentación. Para esto se lleva el medio líquido que contiene azúcar a esterilización.

25 Se revela un proceso para la producción de compuestos orgánicos no volátiles con al menos 3 átomos de C o con al menos 2 átomos de C y al menos 1 átomo de N. Por compuestos orgánicos no volátiles se entienden aquí tales compuestos que no pueden recuperarse del caldo de fermentación mediante destilación sin descomponerse. Estos compuestos tienen por lo regular un punto de ebullición por encima del punto de ebullición de agua, con frecuencia por encima 150 °C y principalmente por encima 200 °C a presión normal. Por lo regular se trata de compuestos que se presentan en estado sólido en condiciones normales (298 K, 101,3 kPa).

30 Sin embargo, también es posible emplear el medio líquido que contiene azúcar en una fermentación para la producción de metabolitos no volátiles que tienen un punto de fusión por debajo del punto de ebullición de agua y/o una consistencia oleosa a presión normal.

35 Principalmente, el proceso es adecuado para la producción de enzimas, aminoácidos, vitaminas, nucleótidos, di-, oligo- y polisacáridos, ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C, ácidos hidroxicarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C, cetonas con 3 a 10 átomos de C, alcanoles con 4 a 10 átomos de C y alcanodiolos con 3 a 10 y principalmente 3 a 8 átomos de C y aminas, principalmente diaminas alifáticas con 3 a 10 átomos de C.

El experto en la materia entiende que los compuestos preparados de modo fermentativo de esta manera se obtienen respectivamente en la forma enantiomérica producida por los microorganismos empleados (en tanto existan enantiómeros diferentes). De esta manera, de los aminoácidos se obtiene por lo regular el L-enantiómero respectivo.

40 Los microorganismos empleados en la fermentación dependen de manera conocida de los productos del metabolismo (metabolitos) respectivos, tal como se explica más abajo. Estos 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	Lactobacilli, (por ejemplo Lactobacillus delbrueckii)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido itacónico	Aspergillus terreus, Aspergillus itaconicus	Jakubowska, in Smith u. Pateman (Editor), Genetics and Physiology of Aspergillus, London: Academic Press 1977; Miall, in Rose (Editor), Economic Microbiology, Vol. 2, S. 47 - 119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
Ácido succínico	Actinobacillus sp. 130Z, Anaerobiospirillum succiniproducens, Actinobacillus succinogenes, E. coli	Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498 - 504 (1976); EP 249773 (1987), inventor: Lemmeu.Datta; US5504004 (1996), invent.: Guettler, Jain u. Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 - 342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novelsuccinic-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
Ácido hidroxipropiónico	Lactobacillus delbrückii, L. leichmannii od. Sporolactobacillus inulinus	RÖMPP Online Version 2.2
Ácido propiónico	Propionibacterium, por ejemplo P. arabinosum, P. schermanii, P. freudenreichii, Clostridium propionicum,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido diaminopimélico	Corynebacterium glutamicum	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido cítrico	Aspergillus niger, Aspergillus wentii	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 - 373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996).
Ácido aconítico	Aspergillus niger, Aspergillus wentii	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 - 373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996).; Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995;
Ácido málico	Aspergilli, por ejemplo Aspergillus flavus, A. niger, A. oryzae, Corynebacterium	US 3063910
Ácido glucónico	Aspergilli, por ejemplo A. niger	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido butírico	Clostridium (por ejemplo Clostridium acetobutylicum, C. butyricum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995;

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Ácido láctico	Lactobacillus, por ejemplo L. delbrückii, L. leichmannii,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995;
Lisina	Corynebacterium glutamicum	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Glutamato	Corynebacterium glutamicum	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Metionina	Corynebacterium glutamicum	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Fenilalanina	Corynebacterium glutamicum, E.coli	Trends Biotechnol. 3, 64 - 68 (1985); J. Ferment. Bioeng. 70, 253- 260 (1990).
Treonina	E. coli	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Ácido aspártico	E. coli	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35+ bibliografía allí citada, Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Bases de purina y pirimidina	Bacillus subtilis	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Dinucleótido de nicotinamidadenina (NAD)	Bacillus subtilis	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Adenosina-5' -monofosfato (AMP)	Bacillus subtilis	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido $\gamma$ -linolénico	Mucor, Mortiella, Aspergillus spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Bran by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico	Mortiella, Conidiobolus, Saprolegnia spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Bran by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido araquidónico	Mortiella, Phytium spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Bran by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido eicosapentaenoico	Mortiella, Phytium spp., Rhodopseudomonas, Shewanella spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Bran by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido docosahexaenoico	Thraustochytrium, Entomophthora spp., Rhodopseudomonas, Shewanella spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Bran by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Propanodiol	E. coli	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309
Butanodiol	Enterobacter aerogenes" Bacillus subtilis, Klebsiella oxytoca	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 von 2,3-Butandiol. CIT 64 (6), 2004, 570-571
Butanol	Clostridium (por ejemplo Clostridium acetobutylicum, C. propionicum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),

ES 2 379 969 T3

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Glicerina	Levadura, Saccharomyces rouxii,	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Manitol	Aspergillus candida, Torulopsis mannifaciens	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Arabitol	Saccharomyces rouxii, S. mellis, Sclerotium gluanicum, Pichia ohmeri	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Xilitol	Saccharomyces cerevisiae	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido hialurónico	Streptococcus sp.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995;
Trehalosa	Brevibacterium, Corynebacterium, Microbacterium, Arthrobacter spp., Pleurotus genus , Filobasidium floriforme	JP 05099974, JP 06311891, FR 2671099, EP 0555540, JP 3053791, Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: Trehalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, Filobasidium floriforme. Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
Ácido ascórbico	Gluconobacter melanogenes	RÖMPP Online Version 2.2
Vitamina B12	Propionibacterium spp., Pseudomonas denitrificans	Chem. Ber. 1994, 923 -927; RÖMPP Online Version 2.2
Riboflavina	Bacillus subtilis, Ashbya gossypii	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48.
Vitamina B6	Rhizobium tropici, R. meliloti	EP0765939
Enzimas	Apergilli (por ejemplo, Aspergillus niger A. oryzae), Trichoderma , E.coli, Hansenula o Pichia (por ejemplo Pichia pastorius), Bacillus (por ejemplo Bacillus licheniformis, B. subtilis) u. v. a.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Zeaxantina	Dunaliella salina	Jin et al (2003) Biotech.Bioeng. 81: 115- 124
Cantaxantina	Brevibacterium	Nelis et al (1991) J Appl Bacteriol 70: 181- 191
Licopina	Blakeslea trispora, Candida utilis	WO 03/056028, EP 01/201762, WO 01/12832, WO 00/77234, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64: 1226-1229

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
$\beta$ -Caroteno	Blakeslea trispora, Candida utilis	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene from Blakeslea trispora with Span 20, Biotechnology Letters, Vol 19, No 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: Effect of the aeration rate and agitationspeed on beta-carotene production and morphology of Blakeslea trispora in a stirred tank reactor: mathematical modelling, Biochemical Engineering Journal 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226- 1229
Astaxantina	Phaffia rhodozyma; Candida utilis	US 5,599,711; WO 91/02060, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
Polihiidroxicanoatos, poliésteres	Escherchia coli, Alcaligenes latus, u.v.a.	S. Y. Lee, Plastic Bacteria, Progress and Prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, volumen 14, (1996), páginas 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (edit.), Biopolymers, 1. edición, 2003, Wiley-VCH, Weinheim y la bibliografía citada allí
Polisacáridos	Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, Xanthomonas campestris, u. v. a.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Poliisoprenoides	Lactarius sp., Hygrophorus sp., Russula sp.	Steinbüchel (editor), Biopolymers, 1. edición, 2003, Wiley-VCH, Weinheim y bibliografía allí citada
Acetona	Clostridium (por ejemplo, Clostridium acetobutylicum, C. propionicum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 y 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Acetoína	Enterobacteraerogenes, Clostridium acetobutylicum, Lactococcus lactis	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Editor, Biology of the Procaryotes, Thieme, Stuttgart (1999), S.307; RÖMPP Online-Edition
Vainillina	Pseudomonas putida, Amycolatopsis sp.	Priefert, H., Rabenhorst, J., Seinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296-314 (2001)
Thuringensin	Bacillus thuringiensis	Jian-Zhong Jong et al.: Fed-batch culture of Bacillus thuringiensis for thuringensin production in a tower type bioreactor. Biotechnology and Bioengineering 48 (3) (2004), 207-213.

(continuación)

Sustancia	Microorganismo	Referencia
Policétidos	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i>	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. <i>Pure &amp; Appl. Chem.</i> 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> . <i>Microbiology</i> 150 (8), (2004), 2761-74.
Ácido giberético	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hollmann et al.: Extraktiv-Fermentation von Gibberellinsäure mit <i>Gibberella fujikuroi</i> (fermentación extractiva de ácido giberético con <i>Gibberella fujikuroi</i> ). <i>CIT</i> 7 (1995), 892-895.
Índigo	<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. <i>Journal of Industrial Microbiology &amp; Biotechnology</i> 28 (2002), 127-133.

- 5 El compuesto orgánico preparado se selecciona entre ácidos mono-, di- y tricarboxílicos que tienen opcionalmente grupos hidroxilo con 3 a 10 átomos de C, aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, bases de purina, bases de pirimidina; Nucleósidos, nucleótidos, lípidos; ácidos grasos e insaturados; dioles con 4 a 10 átomos de C, alcoholes polihídricos con 3 o más grupos hidroxilo, alcoholes de cadena larga con al menos 4 átomos de C, carbohidratos, principalmente di-, oligo- y polisacáridos, compuestos aromáticos, vitaminas, provitaminas, cofactores, nutracéuticos, proteínas, carotenoides, cetonas con 3 a 10 átomos de C, lactonas, aminas, biopolímeros y ciclodextrinas.
- 10 Se revela el empleo del medio líquido que contiene azúcar en una producción fermentativa de enzimas como fitasas, xilanasas o glucanasas.
- Se revela el empleo del medio líquido que contiene azúcar en una producción fermentativa de aminoácidos como lisina, treonina o glutamato.
- 15 Se revela el empleo del medio líquido que contiene azúcar en una producción fermentativa de vitaminas como ácido pantoténico y riboflavina y sus precursores y derivados.
- Se revela el empleo del medio líquido que contiene azúcar en una producción fermentativa de
- ácidos mono-, di- y tricarboxílicos, principalmente ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos con 2 a 10 átomos de C como ácido acético, ácido propiónico, ácido fumárico y ácido succínico;
- 20 - ácidos hidroxicarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C como ácido láctico;
- alcoholes de cadena larga como los mencionados previamente, principalmente alcoholes con 4 a 10 átomos de C como butanol;
  - dioles como los mencionados previamente, principalmente alcandioles con 3 a 10 y principalmente 3 a 8 átomos de C como propanodiol;
- 25 - cetonas como las mencionadas previamente, principalmente cetonas con 3 a 10 átomos de C como acetona;
- aminas, principalmente diaminas alifáticas con 3 a 10 átomos de C como 1,5-diaminopentano;
  - nucleótidos como 5'-IMP y 5'-GMP, y

- carbohidratos como los mencionados previamente, principalmente disacáridos como trehalosa, oligosacáridos y polisacáridos como glucano.

5 El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación son polihidroxicanoatos como poli-3-hidroxi-  
 5 hidroxibutirato y copoliésteres con otros ácidos hidroxicarboxílicos orgánicos como ácido 3-hidroxi-  
 5 hidroxibutírico y otros que se describen en Steinbüchel (loc. cit.), por ejemplo también ácidos hidroxicarboxílicos de  
 5 cadena larga (denominados también como de cadena larga) como ácido 3-hidroxi-  
 5 hidroxioctanoico, ácido 3-  
 5 hidroxidecanoico y ácido 3-hidroxitetradecanoico, así como mezclas de los mismos. Para realizar la fermentación,  
 5 aquí pueden aplicarse condiciones análogas y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes  
 10 de carbono, por ejemplo en S. Y. Lee, Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production  
 10 in bacteria, Tibtech, volumen 14, (1996), páginas 431-438.

Los microorganismos empleados en la fermentación se seleccionan por lo tanto entre microorganismos naturales o recombinantes que sobreproducen al menos uno de los siguientes metabolitos:

- Enzimas como fitasa, xilanasas o glucanasas;

- Aminoácidos como lisina, treonina, glutamato o metionina;

15 - Vitaminas como ácido pantoténico y riboflavina; Precursores y/o derivados de los mismos;

- Disacáridos como trehalosa;

- Polisacáridos como glucano;

- Ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C como ácido propiónico, ácido fumárico y ácido succínico;

20 - Ácidos hidroxicarboxílicos alifáticos con 3 a 10 átomos de C como ácido láctico;

- Polihidroxicanoatos como poli-3-hidroxi-  
 20 hidroxibutirato y copoliésteres del ácido 3-hidroxi-  
 20 hidroxibutírico;

- Cetonas con 3 a 10 átomos de C como acetona;

- Aminas, principalmente diaminas alifáticas con 3 a 10 átomos de C como 1,5-diaminopentano;

- Alcoholes con 4 a 10 átomos de C como butanol; y alcandioles con 3 a 8 átomos de C como propandiol.

25 Microorganismos adecuados se seleccionan usualmente entre los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*,  
 25 *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*,  
 25 *Propionibacterium*, *Rhizopus*, *Clostridium*, *Schizophillum* y *Sclerotium*, principalmente entre cepas de  
 25 *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium* sp AJ-1526, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Bacillus subtilis*,  
 30 *Bacillus megaterium*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus itaconicus*,  
 30 *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*,  
 30 *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium*  
 30 *freudenreichii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutilicum*, *Rhizopus arrhizus*,  
 30 *Rhizopus oryzae*, *Schizophillum commune* y *Sclerotium rolfsii*.

35 El microorganismo empleado en la fermentación es una cepa del género *Corynebacterium*, principalmente una cepa  
 35 del *Corynebacterium glutamicum*. Principalmente es una cepa del género *Corynebacterium*, especialmente del  
 35 *Corynebacterium glutamicum*, el cual sobreproduce un aminoácido, especialmente lisina, metionina o glutamato.

El microorganismo empleado en la fermentación es una cepa del género *Escherichia*, principalmente una cepa de la  
 40 *Escherichia coli*. Principalmente es una cepa del género *Escherichia*, especialmente de la *Escherichia coli*, que  
 40 sobreproduce un aminoácido, especialmente lisina, metionina o treonina.

40 El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es lisina. Para realizar la fermentación aquí  
 40 pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono,  
 40 por ejemplo en Pfefferle et al., a. a. O., y US 3,708,395. En principio se considera tanto una operación continua,  
 40 como también una discontinua (*batch* o *fed-batch*), se prefiere la operación de *fed-batch*.

45 El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es metionina. Para realizar la fermentación aquí  
 45 pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono,

por ejemplo en WO 03/087386 y WO 03/100072. En el caso de la preparación de lisina, para esto se prepara un medio para la fermentación de lisina a partir de la solución de glucosa obtenida en el paso c) junto con sales nutritivas y componentes nutritivos complejos, por ejemplo melaza, un medio para la fermentación de lisina. Este medio puede esterilizarse por vapor de manera directa o indirecta. Después de la esterilización el medio se emplea en una fermentación para la producción de lisina con microorganismos usuales, por ejemplo *Corynebacterium glutamicum*. Después de terminada la fermentación, el caldo de fermentación contiene, además de lisina, también el microorganismo (biomasa), componentes disueltos del medio nutritivo y opcionalmente también componentes sólidos de la fuente de almidón que no contienen almidón, los cuales no pudieron retirarse completamente mediante la separación sólido/líquido (véase capítulo 2.2.3). La recuperación de lisina puede efectuarse de manera usual y se explica abajo aún más.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es ácido pantoténico. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en la WO 01/021772.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es riboflavina. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito 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.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es ácido fumárico. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Rhodes et al., *Production of Fumaric Acid in 20-L Fermentors*, *Applied Microbiology*, 1962, 10 (1), 9-15.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es ácido láctico. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Narayanan et al., *Electronic J. Biotechnol.* 2004, 7, <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue2/full/7/pdf>.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es ácido succínico. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 498 – 504 (1976); EP 249773 (1987), inventores: Lemme y Datta; US 5,504,004 (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 5,573,931, US 5,521,075, WO99/06532, US 5,869,301 o US 5,770,435.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es ácido itacónico. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Kautola, H., *Appl. Microb. Biotechnol.*, 1990, 33,7 y Willke et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56, 289.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es una fitasa. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en la WO 98/55599.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es glucano. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Schilling et al.: *Repression of oxalic acid biosynthesis in the unsterile scleroglucan productino process with Sclerotium rolfisii ATCC 15205*, *Bioprocess Engineering* 22 (2000), 51-55 o Rau et al.: *Oxygen controlled batch cultivations of Schizophillum commune for enhanced production of branched  $\beta$ -1,3-glucans*, *Bioprocess Engineering* 11 (1994), 161-165.

Los metabolitos producidos por los microorganismos en la fermentación son nucleótidos como 5'-IMP y 5'-GMP. Para realizar las fermentaciones aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Sato et al., *Accumulation of Guanosine Polifosfates by Brevibacterium ammoniagenes: Isolation and Identification of the Products*. *Agr. Biol. Chem.* 40 (3), 1976, 465-474; Mori et al: *A novel process of inosine 5'-monofosfate production using overexpressed guanosine/inosine kinase*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1997) 48: 693-698, o GB 01188885.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es glutamato. Para realizar la fermentaciones aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de



carbono, por ejemplo en E. Kimura, L-Glutamate Production, en: Handbook of Corynebacterium glutamicum, CRC press, Boca Raton, FI, 439-464.

5 El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es 1,5-diaminopentano. Para realizar las fermentaciones aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en JP 2004222569.

El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es ácido 5-ceto-glucónico. Para realizar la fermentación aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Elfari, M. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005, 66,668, y Herrmann U., et al., Appl. Microbial. Bioetchnol. 2004, 64, 86.

10 El metabolito producido por los microorganismos en la fermentación es ácido 2,5-diceto-glucónico. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Roper, H., Starch-Starke 1990, 42, 342 o Zelic, B. et al., Chem. Biochem. Eng. Q. 2002, 16,7.

#### Procesamiento de la fermentación

15 En el proceso para la producción de una sustancia orgánica mediante fermentación resulta un caldo de fermentación que, además del metabolito deseado, esencialmente contiene la biomasa generada durante la fermentación y el azúcar no usado, así como las sales de búfer y sales nutritivas. Por lo regular, por lo tanto, después de la fermentación continúa otro procesamiento del caldo de fermentación, con el fin de recuperar el producto de valor, es decir, la sustancia orgánica preparada mediante el proceso de fermentación y transferir a una forma manejable y o  
20 comercial, así como para desechar o aprovechar adicionalmente subproductos generados durante la fermentación, como la biomasa o los componentes acuosos.

El tipo de procesamiento y los pasos requeridos para el mismo dependen de manera conocida de las propiedades de las sustancias del caldo de fermentación y principalmente del tipo del metabolito producido.

25 De manera típica los procesos de procesamiento tienen uno o varios de los siguientes pasos que pueden combinarse en cualquier secuencia y manifestación:

- Desactivación del microorganismo, por ejemplo mediante esterilización de la manera descrita arriba;
- Separación de la biomasa del caldo de fermentación;
- Aislamiento del metabolito no volátil del caldo de fermentación que aún contiene biomasa o del cual la biomasa ya se separó;
- 30 - Purificación del metabolito deseado:
- Concentración del metabolito;
- Concentración de la biomasa.

35 No todos los pasos debe ser componentes obligatorios del método de procesamiento. Por ejemplo, puede prescindirse de una purificación adicional del o de los metabolitos, si no se establecen requerimientos altos a la pureza del producto.

40 La separación de la biomasa del caldo de fermentación se efectúa según procesos usuales de la separación de fases sólido-líquido (descritos, por ejemplo, en Belter, P. A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988), y Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. Edición en CD-ROM, Wiley-VCH) y se efectúa por lo regular mediante procesos mecánicos como decantación, separación, flotación, centrifugación, sedimentación, filtración o métodos de membrana. En tal caso también es concebible intercalar varias etapas de un proceso o combinar diferentes procesos, como por ejemplo decantación y separación. Además, también puede emplearse agua de lavado para incrementar el rendimiento del metabolito no volátil en la separación de biomasa. Preferiblemente se emplean los procesos mencionados si el metabolito es una sustancia que está  
45 presente en solución en el caldo de fermentación. En el caso de metabolitos oleosos o sólidos por lo regular es práctica entonces una separación mecánica por medio de decantación, separación, flotación, centrifugación, sedimentación, si existen diferencias de densidad entre la biomasa y el metabolito. Por lo demás también se consideran entonces principalmente métodos cromatográficos, métodos de destilación o métodos de extracción.

5 El aislamiento o reducción de concentración del producto de valor del caldo de fermentación se efectúa por lo regular de tal manera que se reduce la concentración o se aísla al menos un producto de valor del caldo de fermentación, de tal modo que el contenido de este producto de valor en el caldo de fermentación restante es de máximo 20 % en peso, principalmente de máximo 10 % en peso, especialmente de máximo 5 % en peso y muy especialmente de máximo 2,5 % en peso, cada caso respecto del peso total del caldo de fermentación restante. El aislamiento o reducción de concentración del producto de valor del caldo de fermentación pueden efectuarse en uno o varios pasos.

10 Para aislar un producto de valor disuelto en el caldo de fermentación se procede ventajosamente de tal manera que primero se retira la biomasa y otros componentes no disueltos del caldo de fermentación, por ejemplo mediante centrifugación o filtración y a continuación se aísla el producto de valor de la fase líquida, por ejemplo mediante cristalización, precipitación, adsorción, destilación, cromatografía, extracción, intercambio iónico, proceso de membranas (preferiblemente diálisis por difusión, electrodiálisis, nanofiltración). Como alternativa el producto de valor también puede aislarse directamente del caldo de fermentación, por ejemplo empleando procesos cromatográficos, procesos de extracción, procesos de membrana, procesos de adsorción y destilación. Como 15 proceso cromatográfico debe mencionarse principalmente la cromatografía de intercambio iónico en la que el producto de valor puede aislarse de manera selectiva de la columna de cromatografía.

Para separar el producto de valor puede ser práctico en un primer paso modificar químicamente el producto de valor en el caldo de fermentación, por ejemplo mediante esterificación o formación de sal, con el fin de mejorar de esta manera la capacidad de separarse.

20 La cristalización es un proceso que hace posible tanto una separación del producto de valor del caldo de fermentación como también permite una purificación adicional del producto de valor. Preferiblemente se aplica entonces en combinación con una separación mecánica tal como se mencionó arriba, en la cual los cristales pueden separarse de la lejía madre.

25 En el caso de compuestos volátiles u oleosos, por lo regular se requiere un control de temperaturas máximas durante el procesamiento, principalmente durante el secamiento. Estos compuestos también pueden aislarse ventajosamente formulándolos en una forma casi sólida (forma pseudosólida) en adsorbentes. Para este propósito se indican adsorbentes adecuados, por ejemplo, en la WO 2005/116228 de la solicitante, por ejemplo carbones activos, óxidos de aluminio, geles de sílice, ácido silícico, arcilla, negros de humo, zeolitas, sales inorgánicas de metal alcalino y de metal alcalino térreo como hidróxidos, carbonatos, silicatos, sulfatos, fosfatos de sodio, potasio, magnesio y calcio, principalmente sales de magnesio y de calcio, por ejemplo  $Mg(OH)_2$ ,  $MgCO_3$ ,  $MgSiO_4$ ,  $CaSO_4$ ,  $CaCO_3$ , óxidos de metal alcalino térreo, por ejemplo  $MgO$  y  $CaO$ , otros fosfatos y sulfatos inorgánicos, por ejemplo  $ZnSO_4$ , sales de ácidos orgánicos, principalmente sus sales de metal alcalino y de metal alcalino térreo y especialmente sus sales de sodio y de potasio, por ejemplo acetato, formiato, hidroformiato y citrato de sodio y potasio, soportes orgánicos de alto peso molecular, como almidones opcionalmente modificados, celulosa, lignina, 35 los materiales de soporte mencionados en relación con la formulación de producto, así como el gluten de maíz. Ejemplos de productos de valor que pueden aislarse ventajosamente de esta manera son ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico, además ácido propiónico, ácido láctico, propanodiol, butanol y acetona. También estos compuestos en formulación pseudosólida se entienden como metabolitos o productos de valor no volátiles en forma sólida.

40 Los pasos arriba mencionados de procesamiento pueden requerir parcialmente el empleo de sustancias aditivas (por ejemplo, para la regeneración del intercambiador de iones, el solvente para la extracción, etc.) y/o puede generarse parcialmente una corriente de subproductos (por ejemplo, lejía madre de la cristalización, eluato del intercambiador iónico) Estas corrientes de subproductos, que pueden contener parcialmente además el producto de valor, la biomasa, componentes sólidos, que no contienen almidón del maíz empleado como fuente de almidón, y fracciones 45 de los aditivos, pueden seguir procesándose, parcialmente pueden reintroducirse, desecharse o volver a utilizarse en algún paso del proceso total.

Todas las corrientes arriba mencionadas, preferible las corrientes que contienen biomasa, las corrientes con producto de valor, así como las corrientes de producto contienen en ciertas circunstancias altas concentraciones de agua (debido a la fermentación o al agua de lavado en el procesamiento) y pueden concentrarse (reducción del contenido de agua). Esto puede ocurrir térmicamente, por ejemplo mediante evaporación, secamiento o mecánicamente mediante procesos de membrana, filtración, etc. El agua puede desecharse o recircularse como agua de proceso y puede emplearse, por ejemplo, para formar lechada de la fracción de endosperma o para formar lechada del sólido separado en el caso de la separación de gluten de maíz de varias etapas.

55 Se revela un proceso en el que se retiran, en gran medida o completamente, los componentes volátiles del caldo de fermentación sin aislamiento previo o reducción de concentración del producto de valor, y opcionalmente sin separación previa de la biomasa, en cuyo caso se obtiene una formulación sólida del producto de valor. Una descripción más exacta para realizar un proceso así se encuentra en la WO 2007/028804 de la solicitante, a la cual se hace referencia por medio de la presente.

5 Adicionando auxiliares de formulación como materiales de soporte y de recubrimiento, aglutinantes y otros aditivos, las propiedades del producto de valor seco y presente junto con los componentes sólidos de la fermentación pueden elaborarse de manera dirigida, de una manera conocida per se, respecto de diversos parámetro como el contenido de sustancia activa, el tamaño de los granos, la forma de partículas, la tendencia a generar polvo, la higroscopicidad, la estabilidad, principalmente la estabilidad durante el almacenamiento, el color, el olor, el comportamiento de flujo, la tendencia a la aglomeración, la carga electrostática, la sensibilidad a la luz y a la temperatura, la estabilidad mecánica y la capacidad de redispersarse.

10 A los productos auxiliares de formulación usados usualmente pertenecen, por ejemplo, aglutinantes, materiales de soporte, auxiliares para empolvar/fluir, además pigmentos de tinte, biocidas, agentes de dispersión, antiespumantes, productos reguladores de viscosidad, ácidos, lejías, antioxidantes, estabilizantes de enzima, inhibidores de enzima, adsorbatos, grasas, ácidos grasos, aceites o mezclas de éstos. Auxiliares de formulación de este tipo se emplean ventajosamente, principalmente, al aplicar procesos de formulación y de secamiento como secamiento por aspersión, en lecho fluidizado y liofilización, en calidad de auxiliares de secamiento. Para mayor detalle se hace referencia a la WO 2007/028804.

15 El contenido de los aditivos previamente mencionados y opcionalmente de otros aditivos como materiales para recubrimiento puede variar fuertemente según los requisitos especiales del producto de valor respectivo y dependiendo de las propiedades de los aditivos empleados y puede encontrarse, por ejemplo, en el rango de 0,1 a 80 % en peso y principalmente en el rango de 1 a 30 % en peso, cada caso respecto del peso total del producto o mezcla de productos formulados terminados.

20 La adición de los auxiliares de formulación puede efectuarse antes, durante o después del procesamiento del caldo de fermentación (también denominado formulación de producto o diseño de sólidos) y principalmente durante el secamiento. Una adición de los auxiliares de formulación antes del procesamiento del caldo de fermentación o del producto de valor puede ser principalmente ventajosa para mejorar la procesabilidad de las sustancias o productos a procesarse. Los auxiliares de formulación pueden adicionarse tanto al producto de valor obtenido en forma sólida como también a una solución o suspensión que contienen el producto, por ejemplo después de finalizada la fermentación directamente al caldo de fermentación o a una solución o suspensión obtenidas en el transcurso del procesamiento antes del faso de secamiento final.

25 De esta manera, las sustancias auxiliares pueden mezclarse, por ejemplo, en una suspensión del producto de valor; una suspensión así también puede adicionarse a un material de soporte, por ejemplo por aspersión o por mezcla. La adición de los materiales auxiliares de formulación durante el secamiento puede desempeñar un papel, por ejemplo, si se asperge una solución o una suspensión que contienen el producto de valor. Principalmente después del secamiento se efectúa una adición de auxiliares de formulación, por ejemplo, al aplicar recubrimientos o revestimientos/capas de revestimientos sobre partículas secas. Tanto después de secar como también después de un paso eventual de revestimiento, al producto pueden adicionarse otros auxiliares.

30 La remoción de componentes volátiles del caldo de fermentación se efectúa de una manera conocida per se mediante procesos usuales para separar fases sólidas de fases líquidas, incluyendo procesos de filtración y procesos para evaporar componentes volátiles de las fases volátiles. Procesos de este tipo que también pueden comprender pasos para la purificación gruesa de los materiales de valor así como pasos para elaboración final se describen, por ejemplo, en Belter, P. A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988), y Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. Edición en CD-ROM, Wiley-VCH. En el contexto de la formulación de producto o del procesamiento después de terminada la fermentación, 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 también se describen procesos, aparatos, materiales auxiliares o ejemplos generales y especiales, aplicables, conocidos por el experto en la materia.

35 En una primera variante, en tanto se encuentre presente disuelto en la fase líquida, el producto de valor, no volátil, se transfiere de la fase líquida a la fase sólida, por ejemplo mediante cristalización o precipitación. A continuación se efectúa una separación de los componentes sólidos no volátiles incluyendo el producto de valor, por ejemplo mediante centrifugación, decantación o filtración. De manera similar también pueden separarse productos oleosos de valor, en cuyo caso los productos de fermentación oleosos se transfieren a una forma sólida adicionando adsorbentes, por ejemplo ácido silícico, gel de sílice, lodo, arcilla y carbón activo.

40 En una segunda variante se retiran los componentes volátiles mediante evaporación. La evaporación puede efectuarse de una manera conocida per se. Ejemplos de procesos adecuados para evaporar componentes volátiles son el secamiento por pulverización (o aspersión), secamiento o aglomeración en lecho fluidizado, liofilización, secamiento en secadores de flujo y de contacto así como secamiento por extrusión. También puede realizarse una combinación de los procesos previamente mencionados con procesos de moldeo como extrusión, granulación o formación de perlas. En el caso de los procesos mencionados de último preferentemente se emplean, parcialmente o en gran medida, mezclas de sustancias que contienen el producto de valor que han sido secados previamente.

Retirar los componentes volátiles del caldo de fermentación comprende un proceso para secar por aspersión o un proceso de secamiento en lecho fluidizado, incluyendo la granulación en lecho fluidizado. Para esto, el caldo de fermentación, opcionalmente después de una separación previa para retirar partículas sólidas gruesas que no contienen fracciones de producto de valor volátil, o contiene pequeñas fracciones, se introduce a uno o varios aparatos de secamiento por aspersión o por lecho fluidizado. El transporte o la introducción del caldo de fermentación cargado con sólidos se efectúa convenientemente por medio de dispositivos usuales de transporte para líquidos que contienen sólidos, por ejemplo bombas como bombas de tornillo excéntrico (por ejemplo de la empresa Delasco PCM) o bombas de alta presión (por ejemplo de la empresa LEWA Herbert Ott GmbH).

En el caso específico de la producción de lisina, el método de procesamiento comprende una separación de la biomasa mediante de separadores. La fracción que contiene biomasa se seca luego en un secador de tambor o un secador de haz de tubos. Opcionalmente, antes de secar, un residuo de fermentación de la fermentación de vitamina B2, conocida como "BFR" (Vitamin B2 Fermentation Residues) se mezcla con la fracción que contiene biomasa. La fracción baja en sólido se acidifica y se pasa por un intercambiador iónico. La lisina se enlaza en este intercambiador iónico. El caldo de fermentación empobrecido de lisina, que deja el intercambiador iónico, se concentra evaporando el agua; se separan y se secan los sólidos cristalizados en tal caso. El producto generado se denomina "fertilizante" y puede reintroducirse al proceso o emplearse como fertilizante y/o para otras aplicaciones. La lejía madre de la cristalización se sigue procesando como el llamado "CMS" (*Condensed Molasses Solubles*). La lisina enlazada en el intercambiador iónico se eluye con agua de amoníaco y se concentra evaporando el agua. De este caldo concentrado puede retirarse la lisina como base libre en forma de una formulación líquida. En el siguiente paso de proceso adicionando ácido clorhídrico se cristaliza la lisina como hidrocloreuro de lisina. Los cristales se separan y se secan mediante centrifugación. La lejía madre de la cristalización se reintroducen al eluato del intercambiador iónico o puede retirarse como lisina en una formulación líquida.

Como alternativa para el procesamiento descrito, después de la fermentación el caldo de fermentación que contiene lisina se seca directamente mediante aspersión. Opcionalmente, el residuo de fermentación de la producción de vitamina B2 puede adicionarse. Una evaporación previa en una o varias etapas del caldo de fermentación puede conducir a una reducción de los costes de energía y de la inversión.

#### Uso de la glucosa en una reacción no fermentativa

Se revela el uso de la solución de glucosa que puede obtenerse de acuerdo con la invención como fuente de glucosa para la producción no fermentativa de una sustancia orgánica, tal como se define arriba.

Se revela un proceso para la producción de una sustancia orgánica mediante reacción no fermentativa, el cual comprende los siguientes pasos:

i. proporcionar una solución acuosa de glucosa, por ejemplo mediante la preparación de la solución de glucosa de acuerdo con el proceso de la invención y

ii. usar la solución de glucosa o de una glucosa esencialmente anhidra (contenido de agua < 10 % en peso), obtenida concentrando la solución en una reacción no fermentativa para la producción de la sustancia orgánica deseada.

La realización de la reacción no fermentativa puede efectuarse de modo y manera usuales, conocidas por el experto en la materia. Para esto, por lo regular, se hace reaccionar la glucosa acuosa obtenida de acuerdo con la invención, opcionalmente empleando un catalizador.

La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es 5-hidroximetilfurfural. Para la realización de la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Cottier et al., Trends Heterocycl. Chem. 1991, 2, 233; Lewcowski, J., Arkivoc 2001, 2, 17; Kuster, B.F.M. et al., Carbohidr. Res. 1977, 54, 159, EP 0230250, FR 2464260 o DE 3601281.

La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es ácido levúlico. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Horvat et al, Tetrahedron Lett. 1985, 26, 2111 o US 3258481.

La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es ácido glucónico. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Lichtenthaler, F.W., Acc. Chem. Res. 2002, 35, 728, Besson, M. et al., J. Catal. 1995, 152, 116 o EP 233816.

La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es ácido glucurónico. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Corma, A. et al., Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals., Chem. Rev. 2007, 107, 2411-2502.

- 5 La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es ácido 2-ceto-glucónico. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en US 2002177198, WO 9915673 o EP 867446.

10 La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es ácido glutárico. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Besson, M. et al., Recl. Trav. Chim. Pys-Bas 1996, 115, 217 y Dirx, J.M.H. et al., J. Catal. 1981, 67, 1.

15 La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es sorbitol. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Dechamp, N. et al., Catal. Today 1995, 24, 29 y Maranhao, L.C. A. et al., Ind. Eng. Chem. Res. 2005, 44, 9624, WO 02100537, WO 02100539 y WO 2004052813.

La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es isosorbida. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo in WO 9804540, WO 9200947 y US 4297290.

20 La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa son alquilpoliglucósidos. Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en US 5480979 y US 5698684.

25 La sustancia orgánica que puede prepararse por vía no fermentativa a partir de la glucosa es HFCS (High-Fructose-Corn-Syrup). Para realizar la reacción aquí pueden aplicarse condiciones y procedimientos análogos, tal como se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo in Marshall et al., Enzymatic Conversion of d-Glucose to d-Fructose 1957, Science 125 (3249), 648 y US 4523960.

#### Formulación de los subproductos

30 Como ya se explicó arriba, tanto en los pasos a) y c) del proceso de la invención para producir glucosa, pero también en el procesamiento fermentativo siguiente de la glucosa para producir productos de valor, se genera una serie de subproductos o productos secundarios. Por lo regular se trata de una o varias de las siguientes corrientes de sustancias, preferentemente en las cantidades indicadas:

- fracción fina en polvo de la purificación de maíz, si se genera, normalmente en una cantidad hasta 5 % en peso, principalmente 0,1 a 3 % en peso;
- salvado de maíz, si se genera, normalmente en una cantidad hasta 7 % en peso, por ejemplo 1 a 6 % en peso;
- germen de maíz, normalmente en una cantidad de 2 a 16 % en peso, preferible 4 a 12 % en peso
- 35 - gluten de maíz, normalmente en una cantidad de 4 a 40 % en peso, preferible 8 a 30 % en peso
- biomasa, normalmente en una cantidad de 1 a 40 % en peso, preferible 5 a 20 % en peso y
- opcionalmente sub-corrientes que pueden generarse en el procesamiento del producto de valor, si se generan, normalmente en una cantidad hasta 100 % en peso, preferible 0,2 a 50 % en peso, particularmente preferible 0,3 a 20 % en peso,

40 en cuyo caso todos los datos de % en peso se refieren a la masa total del maíz empleado para la producción de glucosa.

45 Estas corrientes de sustancias pueden procesarse por separado o desecharse. Asimismo es posible mezclar estas corrientes de sustancias entre sí en el contexto de un procesamiento más de cualquier manera, es decir parcial o completamente en cualquier combinación (es decir, juntar al menos dos corrientes de sustancias). Por lo regular antes del procesamiento se efectúa un secamiento, en cuyo caso opcionalmente las corrientes de sustancias a mezclarse entre sí se secan, antes o después de mezclarse. Con frecuencia se procede de tal modo que las partículas sólidas de las corrientes de sustancias, libres de agua, se aglomeran o se muelen conjuntamente.

## ES 2 379 969 T3

5 Los pasos de proceso de secamiento, aglomeración y molienda pueden realizarse y combinarse opcionalmente en cualquier secuencia para mezclar las diferentes corrientes. Preferentemente se procede de tal manera que al mezclar las corrientes de sustancias se obtiene un subproducto que preferiblemente es apto para piensos o forrajes y contiene al menos una fracción de las corrientes de sustancias del procesamiento de maíz (por ejemplo, producción de azúcar) y contiene al menos un componente del procesamiento del caldo de fermentación (biomasa o corrientes de sustancias secundarias).

Opcionalmente pueden adicionarse auxiliares de formulación, sustancias activas o una o varias biomásas o una o varias corrientes de sustancias secundarias de otros procesos de fermentación a los sub-productos obtenidos de esta manera, en cuyo caso esta adición puede efectuarse en cualquier lugar del proceso.

10 Las humedades residuales des estos subproductos, en estado no seco, son de 10 a 90 % en peso, preferible de 40 a 80 % en peso. En estado seco, la humedad residual del subproducto es de 1 a 20 % en peso y preferible de 3 a 18 % en peso y particularmente preferible 5 a 15 % en peso.

El diámetro de partícula promedio de la fracción de sólidos en el subproducto se encuentra entre 50  $\mu\text{m}$  y 8 mm, preferible entre 100  $\mu\text{m}$  y 5 mm y particularmente preferible entre 150  $\mu\text{m}$  y 3 mm.

15 El subproducto es una mezcla de diversas fracciones de sólidos; luego, antes de la mezcla, las distribuciones de tamaños de partícula de las corrientes de sustancia individuales, de las cuales se compone el subproducto, se seleccionan o se ajustan por lo regular de tal modo que no ocurra una separación de las corrientes de sustancias o que al menos se mantenga en un mínimo. Esto se garantiza entonces, por lo regular, si las corrientes de sustancias a mezclarse tienen un tamaño de partícula lo más similar posible, o si el llamado valor SPAN de la mezcla de subproducto es menor a 4, preferiblemente menor a 3, particularmente preferible menor a 2 y principalmente menor a 1,8. Aquí el valor SPAN de la mezcla de subproducto se define como

$$\text{SPAN} = (D_{90} - D_{10}) / D_{50}$$

25 El valor  $D_{50}$  es en tal caso el diámetro de partícula promedio de la mezcla de subproducto, es decir respecto de la masa el valor  $D_{50}$  indica aquel diámetro de partícula que el 50 % en peso de las partículas sobrepasan o el 50 % en peso no sobrepasan. El valor  $D_{90}$  es aquel diámetro que no sobrepasan el 90 % en peso de las partículas o que sobrepasan el 10 % en peso. El valor  $D_{10}$  es aquel diámetro que no sobrepasan el 10 % en peso de las partículas o que sobrepasan el 90 % en peso. El valor SPAN o el diámetro de partículas y su distribución pueden determinarse de manera conocida, por ejemplo mediante análisis de tamizado o mediante dispersión de la luz.

30 Si un subproducto se prepara de al menos una corriente de sustancia seca y de al menos una corriente líquida, entonces las corrientes de sustancias pueden primero secarse, por una parte, y luego tratarse como corrientes de sustancias secas (véase arriba). Para la mezcla de estas corrientes de sustancias se aplica lo mismo que para la mezcla de corrientes de sustancias ya secas originalmente. Por otra parte, no obstante, las corrientes de sustancias secas y líquidas también pueden mezclarse entre sí antes de un secamiento o durante el secamiento. Esto tiene la ventaja de que el sólido que está contenido en la corriente de sustancia líquida o del tipo suspensión se incorpora mezclándose bien a las corrientes de sustancias secas y se dispersa, o se aplica la corriente de sustancia seca como recubrimiento sobre los componentes sólidos de las corrientes de sustancias secas o las corrientes de sustancias líquidas se utilizan para aglomerar o aglutinar las partículas sólidas de la corriente de sustancias secas.

La fracción en polvo fino se desecha y no se incorpora mezclándose con los sub-productos.

El salvado de maíz no se incorpora mezclándose a los subproductos sino que se usa como producto independiente.

40 El germen de maíz no se incorpora mezclándose a los subproductos sino que se usa como producto independiente, por ejemplo para la recuperación de aceite de germen de maíz.

El gluten de maíz no se incorpora mezclándose a los subproductos, sino que se usa como producto independiente.

La biomasa no se incorpora mezclándose a los subproductos sino que se usa como producto independiente.

45 Las corrientes de subproducto no se incorporan mezclándose a los subproductos sino que se usan, se desecha o se elimina.

Una fracción o toda la cantidad del salvado de maíz generado, por ejemplo 10 a 100 % en peso, respecto del contenido de masa seca del salvado de maíz que se genera en total, se mezcla, por ejemplo, con 10 a 100 % en peso, respecto de la corriente respectiva de subproducto y se seca, con el fin de obtener un subproducto que contiene maíz. Opcionalmente, el salvado de maíz puede molerse antes de mezclar, de modo que los tamaños de

partícula promedios se ajustan a 150 hasta 1400  $\mu\text{m}$  y particularmente preferible a 200  $\mu\text{m}$  hasta 800  $\mu\text{m}$ . Otra opción consiste en que antes o después de moler se adiciona al salvado de maíz una parte de la fracción en polvo fino de maíz que se genera, por ejemplo 10 a 100 % en peso.

- 5 En un proceso para la producción fermentativa de lisina se genera, por ejemplo, un CMS de corriente de subproducto de tipo jarabe con un contenido de masa seca de 40 a 90 % en peso, el cual puede mezclarse o juntarse con el salvado de maíz, por ejemplo mediante aspersión y luego secarse. Después de secarse puede efectuarse opcionalmente una trituración de los aglomerados surgidos eventualmente. La composición (respecto de la masa seca) del subproducto obtenido de esta manera es por lo regular como sigue:

Proteína cruda: 5 a 60 % en peso, preferible 10 a 50 % en peso

- 10 Almidón: 1 a 50 % en peso, preferible 5 a 40 % en peso

Fibras crudas: 1 a 20 % en peso, preferible 2 a 10 % en peso

Grasa cruda: 1 a 20 % en peso, preferible 1 a 10 % en peso

Ceniza cruda: 0 a 15 % en peso, preferible 0,1 a 7 % en peso

Lisina: 0 a 10 % en peso, preferible 0 a 5 % en peso

- 15 Un subproducto A se prepara mezclando entre sí respectivamente 0 a 100 % en peso, preferentemente 30 a 100 % en peso, particularmente preferible la cantidad total del germen de maíz que se genera, 10 a 100 % en peso, preferentemente 30 a 100 % en peso, particularmente preferible la cantidad total del gluten de maíz generado y 10 a 100 % en peso, preferentemente 30 a 100 % en peso, particularmente preferible la cantidad total de la biomasa generada. Opcionalmente, este subproducto puede contener una fracción de 0 a 100 % del salvado de maíz generado y 0 a 100 % de la parte fina.
- 20

Para la producción de este subproducto A son posibles las siguientes variantes de proceso.

- 25 En una primera variante se mezclan y se secan todas las corrientes (germen de maíz, gluten de maíz, biomasa y opcionalmente salvado de maíz y/o fracción de finos). Opcionalmente, el subproducto seco o las sustancias iniciales secas germen de maíz y salvado de maíz también se muelen además, de modo que pueden ajustarse un tamaño de partícula promedio y una humedad residual, tal como se describe arriba. En una segunda variante primero se mezclan solo las corrientes de gluten de maíz húmedas y de la biomasa y luego se secan conjuntamente. Esto tiene la ventaja de que el germen de maíz, que ya está seco y, de manera opcional, también el salvado de maíz seco, no tienen que pasar de manera innecesaria por el secador. Después del secado de los componentes, todas las corrientes pueden mezclarse directamente o las corrientes individuales pueden molerse primero y luego mezclarse.
- 30 Después de mezclar, a su vez puede seguir una molienda. Pueden ajustarse un tamaño medio de partículas y una humedad residual tal como se describe arriba. En una tercera variante, las dos corrientes húmedas de la biomasa y del gluten de maíz se secan primero por separado. Esto puede tener la ventaja de que pueden evitarse o reducirse las reacciones de descomposición no deseadas tales como, por ejemplo, una reacción de Maillard entre componentes de azúcar y de proteína que pueden contenerse en las corrientes. Las corrientes secas del gluten de maíz, de la biomasa, del germen de maíz y opcionalmente del salvado de maíz pueden molerse y mezclarse
- 35 opcionalmente, o a la mezcla puede seguir opcionalmente una molienda. Pueden ajustarse un tamaño de partícula promedio y una humedad residual, tal como se describe arriba. En una cuarta variante, durante o antes del secamiento, a al menos una corriente a secarse se introduce una fracción de 10 a 100 % de al menos una corriente sólida que se genera. Esto tiene la ventaja de que pueden formarse aglomerados deseados, se mejora la conducta de flujo del producto o se reduce la tendencia del producto a pulverizarse. De esta manera, por ejemplo, el gluten de maíz que se genera húmedo (o fracciones del mismo) puede mezclarse con fracciones de salvado de maíz (molido
- 40 opcionalmente), con fracciones de germen de maíz (opcionalmente molidas) o fracciones de finos o combinaciones cualesquiera de los mismos, antes o durante el secado. Asimismo existe la posibilidad de mezclar la biomasa generada húmeda (o fracciones de la misma) con fracciones de salvado de maíz (opcionalmente molido), con
- 45 fracciones de germen de maíz (opcionalmente molido) o fracciones de finos o combinaciones cualesquiera, antes o durante el secado.

- 50 Durante la producción del subproducto A se usa la biomasa de la fermentación de lisina. Las corrientes de gluten de maíz, germen de maíz y biomasa se usan respectivamente en una cantidad de 50 a 100 % en peso, respecto de la cantidad total de la corriente generada respectivamente y se procesa para obtener un subproducto de acuerdo con el proceso arriba descrito. La composición preferida (respecto de la masa seca) del subproducto se caracteriza como sigue:

Proteína cruda: 10 a 60 % en peso, particularmente preferible 20 a 50 % en peso

Azúcar total: 0,1 a 50 % en peso, particularmente preferible 5 a 45 % en peso

Fibras crudas: 0 a 10 % en peso, particularmente preferible 0 a 7 % en peso

Grasa cruda: 1 a 30 % en peso, particularmente preferible 5 a 20 % en peso

Ceniza cruda: 0 a 15 % en peso, particularmente preferible 0,1 a 7 % en peso

5 Lisina: 0,1 a 20 % en peso, particularmente preferible 0,2 a 10 % en peso

En la producción del subproductos A se mezclan las biomásas de diferentes fermentaciones. De esta manera las diferentes biomásas también primero pueden secarse, separadas una de otra o mezcladas, y luego secarse conjuntamente. Las biomásas pueden mezclarse entre sí en cualquier proporción de mezcla. Preferiblemente se mezcla aquí 30 a 100 % y más preferible 50 a 100 %, de la biomasa generada de una fermentación respectiva.

10 El menos una biomasa de otro proceso de fermentación se adiciona a un subproducto cualquiera (arriba descrito) en cualquier lugar del proceso de producción. Se trata de un subproducto que contiene tanto biomasa de una fermentación de lisina (como se describe arriba) y biomasa de una fermentación B2 (BFR, tal como se definió arriba). Aquí se mezclan entre sí preferiblemente 30 a 100 % y más preferiblemente 50 a 100 %, de la biomasa generada de una fermentación respectiva. El subproducto contiene opcionalmente fracciones de 50 a 100 % del germen de maíz generado y/o 50 a 100 % del gluten de maíz generado y/o 50 a 100 % del salvado de maíz generado, así como 0 a 100 % de la porción generada de finos.

15 Se trata de un subproducto que contiene tanto biomasa de una fermentación de productos químicos, como por ejemplo de una fermentación de lisina o de una fermentación de glutamato, como también biomasa de una fermentación de bioetanol.

20 Al mezclar al menos las dos biomásas, se trata de biomásas de fermentaciones que operan respectivamente con una corriente de glucosa recuperada de la sacarificación de almidón de maíz según la invención. En este caso puede procederse de tal manera que en ambas fermentaciones se trate de la misma corriente de glucosa. También se emplean corrientes de glucosa recuperada del proceso de la invención, aunque se tratan de corrientes de glucosa preparadas por separado, por lo regular con purezas diferentes de la glucosa. Al menos 2 medios de glucosa difieren normalmente en la concentración de los componentes sólidos que no contienen almidón. Respecto de la masa seca se generan al menos una corriente con un contenido alto y una corriente con un contenido bajo de componentes sólidos que no contienen almidón. Las diversas purezas de las corrientes de glucosa pueden generarse mediante procesos como decantación, separación, centrifugación, sedimentación, filtración o procesos de membrana. En tal caso también son concebibles combinaciones de etapas múltiples de un proceso o combinaciones de diversos procesos, como por ejemplo decantación y separación.

25 Pero al menos dos fermentaciones también pueden basarse en diversas fuentes de C, en cuyo caso al menos una fuente de C es una glucosa que puede obtenerse de acuerdo con el proceso de la invención.

30 Un subproducto que contiene al menos la biomasa de dos fermentaciones diferentes también puede contener al menos 2 metabolitos diferentes.

35 De manera análoga al subproducto A descrito arriba, el cual contiene gluten de maíz, germen de maíz y biomasa (opcionalmente salvado de maíz) y al proceso de producción correspondiente, también pueden prepararse subproductos que contienen como componentes secos solamente gluten de maíz y biomasa (opcionalmente salvado de maíz y/o auxiliares de formulación) o solo germen de maíz y biomasa (opcionalmente salvado de maíz y/o auxiliares de formulación) o solo gluten de maíz y germen de maíz (opcionalmente salvado de maíz y/o auxiliares de formulación). Los posibles procesos de producción son análogos a los mencionados arriba.

40 Todos los subproductos pueden contener además sustancias adyuvantes de formulación, materiales de fibra, materiales de carga u otros principios activos que se adicionan en cualquier paso del proceso de la producción.

45 Adicionando auxiliares de formulación como materiales de soporte y de recubrimiento, aglutinantes y otros aditivos pueden elaborarse de manera dirigida, de una manera conocida per se, las propiedades del subproducto respecto de diversos parámetros como el tamaño de grano, forma de partícula, tendencia a pulverizarse, higroscopicidad, estabilidad, principalmente estabilidad al almacenamiento, color, olor, comportamiento de flujo, tendencia a aglomerarse, carga electrostática, sensibilidad a la luz y a la temperatura, estabilidad mecánica y capacidad de redispersarse.

50 A los auxiliares de formulación usualmente utilizados pertenecen, por ejemplo, aglutinantes, materiales de soporte, auxiliares de pulverización/de flujo, además pigmentos para tinturar, biocidas, agentes dispersantes,



antiespumantes, agentes reguladores de viscosidad, ácidos, lejías, antioxidantes, estabilizantes de enzima, inhibidores de enzima, adsorbatos, grasas, ácidos grasos, aceites o mezclas de los mismos. Auxiliares de formulación de este tipo se emplean ventajosamente, principalmente, al aplicar procesos de formulación y secamiento como secamiento por aspersión, de lecho fluidizado y liofilización como auxiliares de secamiento.

5 Ejemplos de aglutinantes son carbohidratos, principalmente azúcares como mono-, di-, oligo- y polisacáridos, por ejemplo dextrinas, trehalosa, glucosa, jarabe de glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y lactosa; sustancias coloidales como proteínas animales, por ejemplo gelatinas, caseína, principalmente caseinato de sodio, proteínas vegetales, por ejemplo proteína de soja, proteína de guisantes, proteína de frijol, lupina, zeína, proteína de trigo, proteína de maíz y proteína de arroz, polímeros sintéticos, por ejemplo polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) y principalmente las marcas Kollidon de la empresa BASF, biopolímeros opcionalmente modificados, por ejemplo lignina, quitina, quitosano, poliláctido y almidones modificados, por ejemplo anhídrido de octenilsuccinato (OSA); gomas como, por ejemplo goma de acacia; derivados de celulosa, por ejemplo metilcelulosa, etilcelulosa, (hidroxietil)metilcelulosa (HEMC), (hidroxipropil)metilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC); harinas, por ejemplo harina de maíz, harina de trigo, harina de centeno, harina de cebada y harina de arroz.

15 Ejemplos de materiales de soporte así como materiales de fibra y de carga son carbohidratos, principalmente los azúcares previamente mencionados como aglutinantes así como almidones, por ejemplo de maíz, arroz, patata, trigo y yuca; almidones modificados, por ejemplo anhídrido de octenilsuccinato; celulosa y celulosa microcristalina; minerales inorgánicos o lodos, por ejemplo arcilla, carbón, kieselgur (tierras diatomáceas), ácido silícico, cebo y caolín; álica, por ejemplo álica de hierro, salvado, por ejemplo salvado de trigo, las harinas previamente mencionadas como aglutinantes; sales como sales metálicas, principalmente sales de metal alcalino y de metal alcalino térreo de ácidos orgánicos, por ejemplo citrato, acetato, formiato e hidrogenocarbonato de Mg, Ca, Zn, Na, K, sales inorgánicas, por ejemplo sulfatos, carbonatos, silicatos o fosfatos de Mg, Ca, Zn, Na, K; óxidos de metal alcalino térreo como CaO y MgO; agentes búfer inorgánicos como hidrofosfatos de metal alcalino, principalmente hidrofosfatos de sodio y de potasio, por ejemplo  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$  y  $Na_2HPO_4$ ; y en general adsorbentes mencionados en relación con la producción de metabolitos con punto de fusión bajo o consistencia oleosa. Otros materiales de carga o de fibra también pueden ser productos que contienen grasa, como por ejemplo harina de soja, granos partidos de soja o harina o granos partidos de maíz, centeno, trigo, cebada, guisantes ...

Ejemplos de agentes de empolverar o agentes de flujo son kieselgur (tierras diatomáceas), ácido silícico, por ejemplo de las marcas Sipernat de la empresa Degussa; arcilla, alúmina, sepiolitas, quenitas, montmorilonitas, zeolitas, carbón, sebo y caolín; los almidones previamente mencionados como materiales de soporte, sales inorgánicas, sales de ácidos orgánicos y agentes búfer; celulosa y celulosa microcristalina.

Respecto de otros aditivos pueden mencionarse como ejemplos pigmentos para tinte como  $TiO_2$ ; biocidas; agentes dispersantes; antiespumantes; agentes reguladores de viscosidad; ácidos inorgánicos como ácidos fosfóricos, ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico; ácidos orgánicos como ácidos mono- y dicarboxílicos saturados e insaturados, por ejemplo ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido maleico y ácido fumárico; lejías como hidróxidos de metal alcalino, por ejemplo NaOH y KOH; antioxidantes; estabilizantes de enzima; inhibidores de enzima; adsorbatos; grasas; ácidos grasos y aceites.

La fracción de las sustancias aditivas previamente mencionadas, y opcionalmente de otros aditivos como materiales para recubrimiento, puede variar fuertemente según los requisitos específicos del subproducto respectivo así como dependiendo de las propiedades de los aditivos empleados y puede encontrarse, por ejemplo, en el rango de 0,1 a 80 % en peso respecto del peso total del producto o mezcla de productos formulados terminados.

La adición de auxiliares de formulación puede efectuarse en cualquier paso de la producción del subproducto, principalmente durante el secamiento opcionalmente requerido. Los auxiliares de formulación pueden adicionarse tanto al subproducto obtenido en forma sólido como también a una solución o solución que contiene a éste. Principalmente después del secamiento se efectúa una adición de auxiliares de formulación por ejemplo al aplicar recubrimientos o revestimientos/capas de revestimiento a partículas secadas. Tanto después del secado como también después del paso eventual de recubrimiento otros productos auxiliares pueden adicionarse al producto.

Opcionalmente, además del metabolito respectivo de la fermentación, a los subproductos se adicionan aún otros principios activos, preferentemente principios activos usuales en la industria de forrajes y piensos en cualquier caso del proceso de producción. Por principio activos aquí se entienden todas las vitaminas, (preferentemente A, B1, B2, B5, B6, C, D3 y E), carotenoides, enzimas (preferentemente fitasa, xilanas, glucanas, amilasa, celulasa, hemicelulasa, proteasa, lipasa, pectinasa, fosfatasa), probióticos (por ejemplo, *Enterococcus* ssp., *Lactobacillus* ssp. *Bacillus* ssp., *Pediococcus* ssp.), antibióticos; ácidos orgánicos y aminoácidos (metionina, lisina, etc.). Los principios activos constituyen preferentemente una fracción de 0,001 a 20 % en peso, particularmente preferible de 0,01 a 5 % en peso del subproducto (respecto de la masa seca).

El siguiente ejemplo sirve para explicar la invención

Como material inicial del ensayo para la molienda de maíz se empleó un maíz de la especificación US Yellow No. 2 con una humedad de 11,9 % en peso. Respecto de la masa seca este maíz contenía 3,8 % en peso de grasa cruda y 75,3 % en peso de almidón.

### Ejemplo 1: Preparación de una solución de glucosa

#### 5 Paso a): molienda fraccionada de maíz

##### a.1. Purificación previa de maíz

En un primer paso se separaron mediante tamizado las fracciones A (> 12 mm de diámetro de partículas; 0,0 % en peso del maíz empleado) y fracción B (< 6,5 mm de diámetro de partícula, 4,05 % en peso del maíz empleado) de la cantidad principal de la corriente de maíz (fracción C). En otro paso se retiraron componentes volátiles mediante cribado (0,18 % en peso), que se desecharon. A continuación se liberó de piedras una fracción C en un clasificador de piedras, de modo que la fracción estaba libre de piedras.

Para optimizar los rendimientos de almidón del proceso entero se separó la fracción B de nuevo por tamizado en una fracción B1 con diámetros de partícula entre 6,5 y 4,0 mm (2,95 % en peso del maíz empleado), una fracción B2 con diámetros de partícula < 4,0 mm (0,98 % del maíz empleado) así como mediante cribado en una fracción de componentes más ligeros (0,13 % para desechar). La fracción B1 que va a la molienda se liberó de piedras en un clasificador de piedras, en cuyo caso se separó una fracción mínima de piedras.

Con base en el maíz crudo empleado a la molienda se adicionaron en total 98,7 % del material para la molienda.

Para mejor molienda el maíz se ajusta luego a una humedad de cerca de 15 % en peso adicionando agua. Antes del procesamiento el maíz se dejó reposar luego por cerca de 8 h.

#### 20 a.2. Molienda fraccionante

##### Variante 1: desgerminación en un desgerminación de maíz

En esta variante de proceso la fracción C (> 6,5 mm) del maíz previamente purificado se conduce a una máquina de desgerminación de maíz. Como máquina de desgerminación de maíz sirvió un dispositivo que comprendía un tornillo de tracción y una zona de elaboración y un tamiz estructurado que circunda con forma de camisa el rotor de rodillos. El maíz a procesarse se condujo por medio de un tornillo de tracción a la zona de elaboración. La desgerminación se logró mediante la elaboración intensa entre el rotor de rodillo y la camisa de tamiz así como ajustando la presión de retención a la salida. Aquí se separaron los gérmenes de la cáscara y de la fracción de endosperma. Después de pasar a través de la máquina, las fracciones generadas se separaron mediante tamizado y cribado. En el tamizado se retiró la llamada harina de cáscara como la fracción más pequeña. Mediante cribado se retiraron las cáscaras liberadas (fracción de salvado). Puesto que la separación de endosperma, cáscaras y germen dentro de la máquina de desgerminación de maíz era incompleta, la fracción no retirada mediante tamizado y cribado se pasó por un molino de rodillos de tres etapas. La fracción de maíz obtenida en la purificación previa B1 (diámetro de partículas entre 6,5 - 4 mm) se pasó igualmente de manera directa al molino de rodillos de tres etapas. Al pasar por el molino de rodillos, las partículas adicionadas se trituraron durante el paso a través de dos rodillos rotantes con diferente velocidad. Después de cada paso en tal caso se separaron las cáscaras y gérmenes liberados mediante tamizado y cribado de una fracción de endosperma triturada suficiente así como de una fracción de endosperma con componentes de germen y cáscara opcionalmente adheridos. Para seguir retirando los componentes de germen y de cáscara esta fracción de endosperma se llevó al siguiente pasaje de molino de rodillo.

Combinando las fracciones de endosperma (84 % en peso del maíz empleado para la molienda) se obtuvo una harina con un contenido de almidón de 84,4 % en peso y un contenido de grasa de 1,28 % en peso. La fracción de germen generada (12,3 % en peso del maíz empleado) tenía un contenido de almidón de 24,1 % en peso y un contenido de grasa de 20,8 % en peso. La fracción de cáscaras (3,6 % en peso del maíz empleado) tenía un contenido de almidón de 24,4 % en peso y un contenido de grasa de 1,9 % en peso.

##### Variante 2: Desgerminación en molino de rodillos

En otra variante de proceso las fracciones C (> 6,5 mm) y B1 (6,5 a 4,0 mm) del maíz purificados previamente se condujeron directamente a un molino de rodillos con dos pares de rodillos con dos rodillos rotantes en sentido contrario con diferente velocidad. En este molino de rodillos se trituraron los granos de maíz mediante por dos rodillos que rotan rápidamente de manera diferente y se separaron parcialmente las cáscaras, la endosperma y los gérmenes de maíz mediante cizallamiento. Según esta primera explicación siguieron tres otras pasadas por el molino de rodillos, en cuyo caso las partículas adicionadas nuevamente se trituraron al pasar a través de dos rodillos rotantes con diferente velocidad. Después de cada pasada en tal caso se separaron mediante tamizado y cribado las

cáscaras y gérmenes liberados de una fracción de endosperma triturada suficiente así como de una fracción de endosperma opcionalmente con componentes de germen y cáscara adheridos. Para seguir retirando los componentes de germen y de cáscara esta fracción de endosperma se condujo a la siguiente pasada por el molino de rodillos.

- 5 Agrupando las fracciones de endosperma (85,3 % en peso del maíz empleado para la molienda) se obtuvo una harina con un contenido de almidón de 84,6 % en peso y un contenido de grasa de 1,74 % en peso. La fracción de germen generada (11 % en peso del maíz empleado) tenía un contenido de almidón de 25,5 % en peso y un contenido de grasa de 19,0 % en peso. La fracción de cáscaras (= fracción de salvado, 3,7 % del maíz empleado) tenía un contenido de almidón de 24,3 % en peso y un contenido de grasa de 2,7 % en peso.

10 a.3. Reducción de tamaño

Para la reducción de tamaño se molieron respectivamente por separado las tres fracciones generadas (endosperma, germen y cáscaras).

La molienda de la fracción de endosperma se realizó en un molino de rodillos. En tal caso se obtuvo una harina de trigo con la siguiente distribución de tamaños.

Tamaño de partícula [ $\mu\text{m}$ ]	> 905	> 410	> 310	> 200	> 132	< 132	Suma
Porción de masa [%]	0,1	1,9	11,6	41,3	23,5	21,6	100,0

15

La molienda de la fracción de germen se efectuó en un molino de martillo con un diámetro de tamiz de 3 mm. Moliendo se ajustó la siguiente distribución de tamaños:

Tamaño de partícula [ $\mu\text{m}$ ]	> 2300	> 1610	> 1200	> 700	< 700	Suma
Porción de masa [%]	0,10	1,20	4,99	27,42	66,30	100,00

20

La molienda de la fracción de cáscaras se efectuó también en un molino de martillo con un diámetro de tamiz de 3 mm. De esto resultó la siguiente distribución de tamaños:

Tamaño de partícula [ $\mu\text{m}$ ]	> 2300	> 1610	> 1200	> 700	< 700	Suma
Porción de masa [%]	0,00	0,20	1,80	24,65	73,35	100,00

Paso b): Licuefacción y sacarificación enzimáticas de harina de maíz

Instrucción general b1:

- 25 Para realizar los ensayos se empleó una combinación de reactores operados de manera continua y discontinua. Primero se hizo una lechada de la harina de maíz. Para esto en un dos tanques con dispositivos para revolver, se cargaron de a 250 L de agua y harina de maíz y se calentó con vapor directo a 60°C. De manera correspondiente, a la cantidad seleccionada de harina de maíz se adicionó luego  $\text{CaCl}_2$  (0,006 % en peso respecto de la cantidad empleada de harina (sustancia en seco)). En el siguiente paso se ajustó el valor de pH con ácido sulfúrico al 10 % en peso a un pH 5,5 - 5,8 y se adicionó  $\alpha$ -amilasa (Liquozyme Supra, Novozyme A/S, 0,04 % respecto de la cantidad empleada de harina (TS)). La lechada preparada de esta manera se bombeó mediante una bomba de tornillo excéntrico a través de un Jet Cooker (Hidroheater M101, Hydro-Thermal Corp.), en el que la lechada se calentó mediante vapor directo a 109°C. De esta manera el almidón contenido en la harina de maíz se convirtió en engrudo y la  $\alpha$ -amilasa empleada condujo a una disociación de las moléculas de almidón. La corriente que abandona el Jet Cooker (dispositivo de cocción a chorro) se condujo a un reactor tubular con una temperatura de 109°C y 5 min de tiempo de residencia. La mezcla de reacción que abandona el reactor tubular se despresurizó en un contenedor de 30 L a la presión ambiental, por lo cual las temperaturas se ajustaron a 95-99 °C. En estas condiciones la mezcla de reacción se bombeó luego a un segundo reactor con 120 min de tiempo de residencia. La mezcla licuada se bombeó opcionalmente a continuación desde este segundo reactor tubular a un tanque, con dispositivo para revolver, de 250 L o 2000 L.

- 40 En los tanques con dispositivos para revolver se realizó respectivamente de manera discontinua una disociación enzimática de la dextrina formada en la licuefacción mediante disociación las moléculas de almidón para proporcionar glucosa. Para esto, en un primer paso se redujo la temperatura de la mezcla licuada a 63°C, el valor de pH se ajustó a 4,3 ( $\pm$  0,1) con ácido sulfúrico al 10 % y luego se agregó glucoamilasa (Dextrozyme DX 1.5X, Novozyme A/S, 0,06 % respecto de la cantidad empleada de harina (TS)). Después de adicionar la glucoamilasa, la

mezcla de reacción s mantuvo luego por 48 h a 63 - 65°C, antes de haber detenido la disociación de la dextrina para dar glucosa mediante desnaturalización de la glucoamilasa elevando la temperatura a > 70 °C.

Se licuaron y sacarificaron diversas harinas de maíz generadas de manera análoga al paso a). Estas harinas tenían las siguientes composiciones:

	Humedad residual	Almidón*	Proteína cruda*	Grasa cruda*	Ceniza cruda*	Fibra cruda*
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Harina 1	9,32	83,2	8,3	1,7	0,7	1,4
Harina 2	9,44	83,1	7,7	1,5	0,6	1,3
Harina 3	11,46	85,8	7,6	1,7	0,3	0,7

\* Porción de masa respecto del contenido de sustancia seca

5

Las harinas tenían la siguiente distribución de tamaños de partícula:

Porción de masa*	Tamaño de partícula [Pm]					
	> 850	> 600	> 425	> 300	> 250	< 250
Harina 1	-	-	2	30	10	58
Harina 2	-	-	2	50	6	42
Harina 3	-	-	2	22	11	64

\* Porción de masa respecto del contenido de sustancia seca

10 Todas las harinas se convirtieron en lechada y se licuaron de acuerdo con la instrucción general b1), en cuyo caso la proporción de harina y agua se seleccionó respectivamente de tal modo que en la licuefacción y sacarificación resultó respectivamente un contenido de almidón de 31,0 % en peso. De manera correspondiente a los diferentes contenidos de almidón de las harinas individuales, con esto se emplearon contenidos de sustancia seca de 37,3 % en peso (harina 1, harina 2) y de 36,1 % en peso (harina 3) para la licuefacción y sacarificación. Después de 48 h mediante este procedimiento se formó una solución de azúcar (glucosa cruda) con azúcares de diferentes longitudes de cadena. Las glucosas crudas obtenidas de esta manera tenían una concentración de glucosa (DP1) de 29,1 - 15 29,6 % en peso. Las fracciones de la glucosa (DP1) y oligoglucosas (DP2 a DP4) en las glucosas crudas obtenidas se recopilan en la siguiente tabla:

Grado de polimerización	Harina 1	Harina 2	Harina 3
DP 1 [%]	94,5	94,7	95,5
DP 2 [%]	2,9	2,9	2,6
DP 3 [%]	1,5	1,5	1,0
DP 4 [%]	0,9	0,7	0,8
> DP 4 [%]	0,3	0,2	0,2

20 En otro experimento se empleó la harina 1 con un contenido de almidón de 34,7 % en peso para la licuefacción y sacarificación. De esta manera resultó un contenido de sustancia seca de 41,7 % en peso en la lechada. En este experimento se redujo la cantidad de glucoamilasa a 0,06 % (respecto de la cantidad empleada de harina (TS)). Después de 48 h en este procedimiento se obtuvo una glucosa cruda con una concentración de glucosa de 32,7 % en peso. 94,2 % de los azúcares generados tenía un grado de polimerización de 1.

Instrucción general b2:

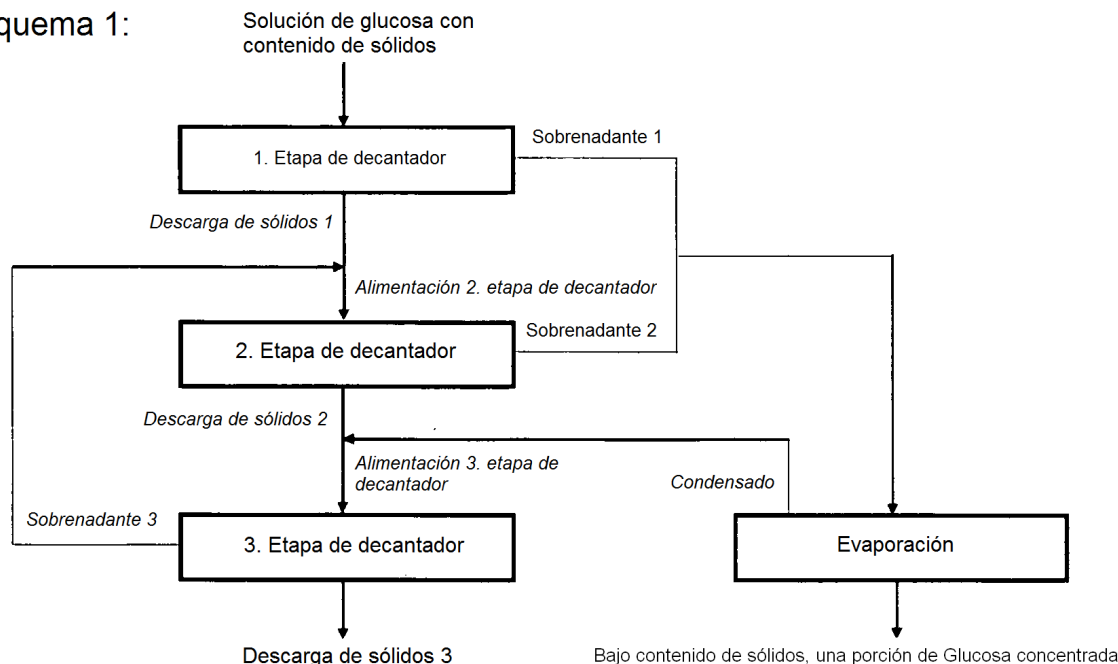
25 Como alternativa a la formación de lechada de harina de maíz, discontinua, en tanques con dispositivos para revolver, descrita en b1), se realizó la formación de lechada de la harina en un mezclador continuador (CoriMix K-TT, Lödige-Drais). Para esto, en el tanque con 2500 L, con dispositivo para revolver, provisto para la sacarificación, se calentaron en total 693 L de agua a una temperatura de 58,1°C y se adicionaron 69 g de Ca(OH)<sub>2</sub> así como 106 g de Liquozyme. La harina de maíz adicionada a la mezcla (11,4 % en peso de humedad residual) tenía una temperatura de 31°C. En un primer punto de operación se agregaron 109,2 kg/h de agua a 82,8 kg/h de harina de maíz, por lo cual se generaron en total 192 kg/h de una suspensión homogénea de harina de maíz con 33,9 % en peso de contenido de almidón y 38,2 % en peso de contenido de sustancia seca. La temperatura de la mezcla era de 42°C. En un segundo punto de operación se elevaron tanto las cantidades introducidas de agua como también las de harina. En el mezclador, se generó una suspensión de harina de maíz homogénea en un total de 475,8 kg/h con un contenido de almidón de 35,8% en peso y un contenido de materia seca de 40,5 % en peso a partir de 217,6 kg/h de 35 harina de maíz y 258,2 kg/h de agua. La temperatura en el segundo punto de operación también fue de 42°C.

La suspensión de harina de maíz obtenida de esta manera se licuó de manera análoga a la manera indicada en la instrucción general b1 en una disposición de un dispositivo de cocción a chorro y 2 reactores tubulares concentrados en serie y a continuación se sacarificó de manera discontinua.

5 Paso c): Empobrecimiento de los sólidos no hidrolizados de la glucosa cruda (gluten de maíz y opcionalmente componentes de salvado)

La separación de los sólidos no hidrolizados de la glucosa cruda obtenida en el paso b) se realizó en un decantador (Tipo Z23-4/401 s, empresa Flottweg). El siguiente esquema 1 da una visión general sobre los pasos individuales del proceso.

Esquema 1:



10 Según el proceso descrito en el paso b) de la harina 2 se preparó una solución de glucosa que contenía 36,1 % en peso de sustancia seca, 28,6 % en peso de glucosa y 0,8 % en peso de disacáridos. La densidad específica era de 1,15 g/cm<sup>3</sup>.

15 En correspondencia con el esquema 1 se adicionaron 440 kg de esta solución de glucosa que contenía sólidos con un flujo de 440 kg/h a la primera etapa de decantador y se separaron en dos fracciones (sobrenadante 1 y descarga de sólidos 1). De esta manera se obtuvieron 326 kg de sobrenadante (sobrenadante 1) con un contenido de glucosa de 30,3 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,9 % en peso, un contenido total de sustancias secas de 33,1 % en peso y una densidad de sobrenadante de 1,15 g/cm<sup>3</sup>. La descarga de sólidos de la primera etapa de decantador (descarga de sólidos 1) de 114 kg tenía un contenido de glucosa de 23,6 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,6 % en peso. El contenido total de sustancias seca de la descarga de sólidos 1 era de 44,6 % en peso.

20 En el siguiente paso la descarga de sólidos 1 se resuspendió con 154 kg de sobrenadante de la tercera etapa de decantador (sobrenadante 3), por lo cual se obtuvieron 268 kg de una solución de glucosa que contiene sólidos de 11,9 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,4 % en peso. El contenido total de sustancia seca de esta solución fue de 23,2 % en peso. Esta solución de glucosa que contiene sólidos se adicionó con un flujo de 470 kg/h a la segunda etapa de decantador y de nuevo se separó en dos fracciones (sobrenadante 2 y descarga de sólidos 2). De esta manera se obtuvieron 169 kg de sobrenadante 2 con un contenido de glucosa de 13,2 % en peso, un contenido de disacáridos de 0,4 % en peso, un contenido total de sustancias seca de 14,1 % en peso y una densidad de 1,07 g/cm<sup>3</sup>. La descarga de sólidos 2 se generó en una cantidad de 99 kg y tenía un contenido de glucosa de 9,2 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,2 % en peso. El contenido total de sustancia seca de la descarga de sólidos 2 fue de 38,6 % en peso.

30 En el próximo paso se resuspendió luego la descarga de sólidos 2 con 154 kg de condensado de la evaporación de glucosa, en cuyo caso se obtuvieron 253 kg de una solución de glucosa que contiene sólidos, con un contenido de glucosa de 3,8 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,2 % en peso. El contenido total de sustancia seca de esta solución fue de 16,1 % en peso. Esta solución de glucosa que contiene sólidos se adicionó luego con un flujo

de 670 kg/h a la tercera etapa de decantador y nuevamente se separó en dos fracciones (sobrenadante 3 y descarga de sólidos 3). Se obtuvieron 144 kg de sobrenadante 3 con un contenido de glucosa de 4,5 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,1 % en peso. A un contenido total de sustancia seca de 4,4 % en peso, la densidad del sobrenadantes 3 era de 1,03 g/cm<sup>3</sup>. La descarga de sólidos 3 se produjo en una cantidad de 109 kg y tenía un contenido de glucosa de 3,1 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,1 % en peso. El contenido total de sustancia seca de esta descarga de sólidos 3 fue de 31,6 % en peso.

Los sobrenadantes de las primeras dos etapas de decantador (sobrenadante 1 y sobrenadante 2) se combinaron. De esta manera se obtuvieron 494 kg de una glucosa pobre en sólidos que presentaba una fracción volumétrica de sólidos de 1,0 % en volumen, determinada mediante centrifugación a 1650 g. La mezcla tenía un contenido de glucosa de 24,4 % en peso y un contenido de disacáridos de 0,7 % en peso. A un contenido total de sustancia seca de 26,6 % en peso, la densidad de la mezcla fue de 1,12 g/cm<sup>3</sup>.

La solución de glucosa generada de esta manera se evaporó en un contenedor con dispositivo de mezcla, de doble pared, de 800 L. Para esto se cargó el contenedor con dispositivo de mezcla con vapor caliente a 140°C. La temperatura de la solución de glucosa se mantuvo a 95 °C estableciendo un vacío ligero.

Al final de la evaporación quedaron 202 kg de solución de glucosa en el contenedor con dispositivo de mezcla. Esta solución presentaba un contenido de glucosa de 60,5 % en peso y un contenido de disacáridos de 1,6 % en peso. El contenido total de sustancia seca de la solución fue de 65,0 % en peso. El contenido de proteína cruda fue de 1,9 % en peso, el contenido de fibra cruda y de ceniza cruda de 0,01 % en peso.

La solución de glucosa generada contenía aproximadamente 580 mg/kg de proteína o de aminoácidos con la siguiente distribución de aminoácido: 119 mg/kg de aspartato, 7 mg/kg de treonina, 15 mg/kg de serina, 55 mg/kg de glutamina, 16 mg/kg de glicina, 64 mg/kg de alanina, 5 mg/kg de cisteína, 15 mg/kg de valina, 3 mg/kg de metionina, 11 mg/kg de isoleucina, 9 mg/kg de leucina, 33 mg/kg de tirosina, 17 mg/kg de fenilalanina, 5 mg/kg de histidina, 10 mg/kg de lisina, 18 mg/kg de arginina y 190 mg/kg de prolina. El valor de pH de la solución se encontraba en pH 4,4. La solución contenía 0,12 % en peso de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 19 mg/kg de Cl<sup>-</sup>, 0,17 % en peso de K<sup>+</sup>, 0,01 % en peso de Ca<sup>2+</sup>, 42 mg/kg de Na<sup>+</sup> y 0,12 % en peso de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. La viscosidad de la solución a 30 °C era de 84 cP.

**Ejemplo 2, que no es de acuerdo con la invención: Preparación de un polvo de gluten de maíz mediante secamiento de la fracción de sólidos obtenida en el ejemplo 1, paso c)**

Para la producción del polvo de gluten de maíz se secó el sólido (descarga de sólidos 3) separado en el ejemplo 1, paso c) en un secador Multicoil-Pilot (empresa NLI). Este secador con 300 L de volumen presentaba 3 calefactores rotantes con un área total de 3 m<sup>2</sup>. Para operar el secador se envasó el material a secar, a continuación se ajustó la presión en el secador a 600 mbar y el secador mediante vapor a 6 bar se calentó en los calefactores. Para esto se hizo girar el secador con 13 revoluciones por minuto. Al inicio del experimento se cargaron 10 kg de material previamente secado de una separación de sólidos precedente con el fin de impedir incrustaciones en los calefactores. Después de adicionar 10 kg del sólido húmedo con 31,6 % en peso de contenido de sustancia seca (descarga de sólidos 3 del paso c) del ejemplo 1) se secó por 45 min. En otros intervalos se adicionó luego respectivamente más sólido húmedo (descarga de sólidos 3 del paso c) del ejemplo 1), se secó y en el curso del secamiento más tarde se determinó respectivamente la humedad residual.

Tiempo [min]	0	45	70	105	120	145	165	200	220	250	290
Sólido <sub>seco</sub> [kg]	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sólido <sub>húmedo</sub> [kg]	10	10	20	6	18	16	18	22	40	40	-
Humedad residual [% en peso]	-	-	-	-	24,0	22,8	25,6	10,4	15,3	19,2	10,1

El producto seco preparado de esta manera tenía un tamaño de partícula promedio de 369 μm y una densidad aparente de 531 g/L. El producto seco se componía de 36,8 % en peso de proteína cruda, 20,1 % en peso de azúcar, 7,0 % en peso de grasa cruda y 4,5 % en peso de fibras crudas.

**Ejemplo 3 que no es de acuerdo con la invención: Uso en una fermentación de la solución de glucosa generada**

Una solución de glucosa preparada según el ejemplo 1 se empleó en fermentaciones con *Corynebacterium glutamicum* para la producción de lisina.

3.1 Construcción de una cepa de *C. glutamicum* ATCC13032lysC<sup>fbr</sup> que sobrepoduce lisina

3.1.1 Construcción del plásmido pCIS lysC

En el primer paso de la construcción de la cepa se efectuó un intercambio alélico del gen de tipo silvestre que codifica la enzima aspartato quinasa (*lysC*) en *C. glutamicum* ATCC13032. Aquí se efectuó un intercambio de nucleótido en el gen *lysC* de tal modo que en la proteína resultante el aminoácido Thr se intercambió en la posición 311 por un Ile. A partir del ADN cromosómico de ATCC13032 como plantilla para una reacción PCR se amplificó *lysC* con los cebadores de oligonucleótido

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC -3' (SEQ ID NO:1)

y

5'-CTCTCTCTGTGCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'(SEQ ID NO:2)

Con ayuda del sistema PCR Pfu-Turbo (Stratagene, EUA) según datos del fabricante. El ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC 13032 se preparó según Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. El fragmento amplificado se flanquea en su extremo 5' por una intersección de restricción y en su extremo 3' por una intersección de restricción MluI. Antes de la clonación se digirió el fragmento amplificado por estas dos enzimas de restricción y se purificó con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg).

El polinucleótido obtenido se clonó por las intersecciones de restricción Sall y MluI en pCLIK5 MCS integrador *SacB*, llamado en lo sucesivo pCIS, (SEQ ID NO: 3) y se transformó en *E.coli* XL-1 blue. Se logró una selección en células que portan plásmido colocando en placas de agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) que contiene canamicina (20 µg/ml). El plásmido se aisló y se confirmó la secuencia de nucleótido esperada mediante secuenciación. La preparación del ADN plásmido se realizó de acuerdo con métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Las reacciones de secuenciación se realizaron según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciador se separaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). El plásmido obtenido se denominó pCIS *lysC* (SEQ ID NO:4). Comprende las siguientes regiones parciales esenciales:

Posición	Tipo de secuencia	Descripción
155-1420	CDS	<i>lysC</i>
Complemento (3935..5356)	CDS	<i>sacB</i> \Bacillus subtilis
Complemento (5357..5819)	Promotor	Promotor\sacB
Complemento (3913..3934)	C Region	<i>sacB</i> \región downstream
1974..2765	CDS	Resistencia a canamicina
Complemento (3032..3892)	CDS	Origen de replicación \E.coli\Plásmido pMB

### 3.1.2 Mutagénesis del gen *lysC* de *C. glutamicum*

La mutagénesis dirigida del gen *lysC* de *C. glutamicum* se realizó con el QuickChange Kit (Stratagene, EUA) según datos del fabricante. La mutagénesis se realizó en el plásmido pCIS *lysC* (SEQ ID NO:4). Para el intercambio de thr 311 por 311 ile con ayuda del método Quickchange (Stratagene) se sintetizaron los siguientes cebadores de oligonucleótido:

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3' (SEQ ID NO:5)

5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3' (SEQ ID NO:6)

El empleo de estos cebadores en la reacción Quickchange conduce en el gen *lysC* (SEQ ID NO:7) a un intercambio del nucleótido en posición 932 (de C por T). El intercambio resultante de aminoácido Thr311 Ile en el gen *lysC* se confirmó según la transformación en *E.coli* XL1-blue y la preparación de plásmido mediante una reacción de secuenciación. El plásmido obtuvo la denominación pCIS *lysC* thr311 ile (SEQ ID NO:8). Comprende las siguientes regiones parciales esenciales:

Posición	Tipo de secuencia	Descripción
155-1420	CDS	<i>LysC</i> (thr311 ile)
Complemento (3935..5356)	CDS	<i>sacB</i> \Bacillus subtilis
Complemento (5357..5819)	Promotor	Promotor\sacB

(continuación)

Posición	Tipo de secuencia	Descripción
Complemento (3913..3934)	C Region	sacB\región downstream
1974..2765	CDS	Resistencia a canamicina
Complemento (3032..3892)	CDS	Origen de replicación \E.coli\Plásmido pMB

### 3.1.3 Transformación de pCIS lysC thr311 ile en *C. glutamicum* (cepa ATCC13032)

5 El plásmido pCIS lysC thr311 ile se transformó en *C. glutamicum* ATCC13032 por medio de electroporación tal como se describe en Liebl et al., FEMS Microbiology Letters 53:299-303 (1989). Se describen modificaciones del protocolo en la DE 10046870. La disposición cromosómica del sitio (locus) lysC de transformantes individuales se verificó con métodos estándar mediante Southernblot e hibridación, tal como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989). De esta manera se aseguró que los transformantes fueran aquellos que han integrado el plásmido transformado en el sitio lysC mediante recombinación homóloga. Después del crecimiento de tales colonias por una noche en medios que no contienen antibiótico se colocan en placas las células en un medio de sacarosa-CM-agar (10% de sacarosa) y se incuban por 24 horas a 30°C.

15 Puesto que el gen sacB en el vector pCIS lysC thr311ile convierte la sacarosa en un producto tóxico, solo pueden crecer aquellas colonias que han suprimido el gen sacB mediante un segundo paso de recombinación homólogo entre el gen de tipo silvestre lysC y el gen mutado lysC thr311 ile. Durante la recombinación homóloga, el gen de tipo silvestre o el gen mutado pueden suprimirse junto con el gen sacB. Si se retira el gen sacB junto con el gen de tipo silvestre, resulta un transformante mutado.

20 Las colonias crecidas se recogieron y se investigaron para un fenotipo sensible a canamicina. Los clones con el gen sacB suprimido deben demostrar de manera simultánea un comportamiento de crecimiento sensible a la canamicina. Tales clones sensibles a la canamicina se estudiaron para detectar su productividad de lisina en un matraz oscilante. Para comparación, se cultivó el *C. glutamicum* ATCC13032 sin tratar. Los clones con una producción de lisina incrementada frente al control se seleccionaron, se recuperó ADN cromosómico y la región correspondiente del gen lysC se amplificó mediante una reacción PCR (Pfu-Turbo PCR Systems; Stratagene, EUA) según datos del fabricante y se secuenció (según Sanger et al., loc. cit.). Un clon tal con la propiedad de síntesis de lisina incrementada y mutación detectada en lysC en la posición 932 se denominó ATCC13032 lysC<sup>fb</sup>.

### 3.2 Preparación de los medios de fermentación

#### 3.2.1 Precultivo 1:

El precultivo 1 se realizó en un fermentador de 5 L. El volumen de trabajo en el fermentador fue de 3 L. La composición del medio de precultivo se representa en la siguiente tabla.

Componente del medio	Concentración
Sacarosa	4,75 %
Sulfato de amonio	1,00 %
MgSO <sub>4</sub>	0,05 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 %
Urea	0,25 %
Agua de maíz hinchado	5,00 %
Proteína de soja hidrolizada	4,00 %
Ácido nicotínico	4,95 mg/L
Tiamina*HCl	1 mg/L
d-Biotina	1,5 mg/L
β-Alanina	10 mg/L
FeSO <sub>4</sub>	10 mg/L
MnSO <sub>4</sub>	10 mg/L
CUSO <sub>4</sub>	1 mg/L
Antiespumante	0,1 g/L

30 El azúcar se disolvió directamente en agua en el fermentador y se esterilizó in-situ. Las fuentes de nitrógeno se estabilizaron por separado de los azúcares y a continuación se adicionaron. La solución de vitamina y de microsales



se preparó también por separado y se añadió al fermentador después de la esterilización a través de un filtro estéril de 0,2  $\mu\text{m}$ . Después de adicionar todos los componentes del medio se ajustó el valor de pH mediante NaOH a un pH 7.

### 3.2.2 Precultivo 2:

- 5 El precultivo 2 se realizó en un fermentador de 50 L. El volumen de trabajo del fermentador fue de 30 L. La composición del segundo medio de precultivo se muestra en la siguiente tabla.

Componente del medio	Concentración
Melazas de baja calidad ( <i>Low Quality Molasses</i> )	3,50 %
Sacarosa	3,50 %
Agua de maíz hinchado	3,63 %
Sulfato de amonio	0,70 %
Urea	0,25 %
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 %
Ácido nicotínico	7 mg/L
Tiamina*HCl	2,5 mg/L
d-Biotina	0,05 mg/L
$\beta$ -Alanina	5 mg/L
MnSO <sub>4</sub>	7 mg/L
CuSO <sub>4</sub>	1,5 mg/L
Antiespumante	0,25 g/L
Betaína 97%	0,07 %

- 10 Como en el caso del medio de precultivo 1, las fuentes de azúcar se disolvieron en agua directamente en el fermentador y se esterilizaron in situ. Las fuentes de nitrógeno se esterilizaron por separado de los azúcares y luego se añadieron. La solución de vitaminas y microsales también se preparó por separado y se añadió al fermentador después de la esterilización, a través de un filtro estéril de 0.2  $\mu\text{m}$ . Después de la adición de todos los componentes del medio, el pH se ajustó a 7 por medio de NaOH.

### 3.2.3 Cultivo principal:

- 15 El cultivo principal se condujo como un proceso de alimentación de tal modo que además del medio inicial también se empleó un medio de alimentación. Se empleó un fermentador con 300 L de volumen nominal en cuyo caso el máximo volumen de trabajo era de 190 L.

- 20 Al principio de cada fermentación principal se adicionaron 110 L del medio inicial representado en la siguiente tabla al fermentador. Nuevamente, la fuente de azúcar se cargó en el fermentador junto con agua y se esterilizó in situ. Las fuentes de nitrógeno se esterilizaron por separado de los azúcares. La solución de vitaminas y microsales también se preparó por separado y se añadió al fermentador después de la esterilización, a través de un filtro estéril de 0.2  $\mu\text{m}$ . Después de la adición de todos los componentes del medio el pH se ajustó a 7 por medio de NaOH.

Componente del medio	Concentración
<i>Low Quality Molasses</i>	3,00 %
Agua de maíz hinchado	1,49 %
Sulfato de amonio	5,00 %
Antiespumante	0,1 g/L
Betaína 97%	0,07%
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,063 %
Ácido nicotínico	2,5 mg/L
Tiamina*HCl	2,5 mg/L
d-Biotina	0,3 mg/L
MnSO <sub>4</sub>	1 mg/L

- 25 La composición del medio de alimentación se representa en la siguiente tabla. La glucosa empleada se produjo mediante el proceso representado en el ejemplo 1. El tanque esterilizado vacío para el medio de alimentación se llenó a pasos con las soluciones de vitamina, sal y sulfato de amonio elaboradas por separado mediante un intercambiador de calor en espiral (140°C, 90 s de tiempo de residencia). Luego las soluciones de azúcar, también esterilizadas, se suministraron en un segundo paso a través del intercambiador de calor.

Componente del medio	Concentración
<i>Low Quality Molasses</i>	3,10 %
Glucosa*	41,90 %
Sulfato de amonio	5,50 %
Antiespumante	1,0 g/L
Betaína 97%	0,07 %
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,05 %
Ácido nicotínico	0,00045%
Tiamina*HCl	0,000038%
d-Biotina	0,000125%
* de la solución de glucosa correspondiente al ejemplo 4	

### 3.3 Fermentación

5 La preparación del inóculo para el precultivo 1 se llevó a cabo en matraces de oscilación de 2 L con un volumen de trabajo de 300 mL (medio de precultivo 1). Partiendo de tubos inclinados con agar, los matraces de oscilación se inocularon y se agitaron durante 19 a 24 h a 29°C y 120 revoluciones por minuto hasta una fracción en volumen de biomasa de 3% en volumen.

El fermentador para el precultivo 1, preparado en correspondencia con la sección 3.2.1, se inoculó con un matraz oscilante y se fermentó durante 24 h a 30°C, una entrada de potencia mecánica específica de 5 kW/m<sup>3</sup> y aireación de 1 vvm. El criterio de desactivación para la fermentación fue un contenido de biomasa de 3% en volumen.

10 A continuación, el fermentador para el precultivo 2, preparado en correspondencia a la sección 3.2.2, se inoculó con el precultivo 1. Se añadió una cantidad correspondiente del precultivo 1 con el fin de lograr al principio una fracción de volumen de biomasa de 0.5% en volumen. La fermentación operó a 30°C, con una aireación de 0,7 vvm y una entrada de potencia mecánica de 2 kW/m<sup>3</sup>. El control de pH se efectuó por medio de amoniaco gaseoso en el rango de 6,8 a 7,0. La duración usual de fermentación hasta alcanzar el criterio de desactivación de una fracción de  
15 volumen de 10% en volumen fue de 14 a 18 h.

En el siguiente paso, el fermentador principal, preparado con el medio inicial en correspondencia con la sección 3.2.3, se inoculó al bombeando el contenido total del precultivo 2 al fermentador principal. La fermentación principal se realizó a 33°C, con una aireación de 0,5 vvm y una entrada de potencia mecánica de 0,5 kW/m<sup>3</sup>. Durante la  
20 fermentación, el pH se reguló por medio de amoniaco gaseoso para obtener un pH de 6,8 a 7,0. Respectivamente, en intervalos de dos horas se añadió una cantidad parcial del medio de alimentación preparado, en cuyo caso la cantidad añadida dependía del consumo de azúcar actual. Para evitar acumulación o empobrecimiento de azúcar, se añadió respectivamente tal cantidad de azúcar según el consumo esperado en el intervalo siguiente. Tan pronto como el volumen de los ingredientes en el fermentador había excedido un valor de 210 L, se extrajo una cantidad parcial desde el fermentador para evitar que el líquido se desborde. Después de 48 h, la fermentación concluía y el  
25 fermentador se vaciaba. Las cantidades parciales retiradas durante la fermentación se combinaron con el contenido del fermentador al final de la fermentación y se procesaron de manera conjunta.

Utilizando la cepa de *Corynebacterium glutamicum* mencionada en la sección 3.1, en la fermentación principal según el procedimiento descrito se generó un total de 21,6 kg de lisina. La concentración de lisina al final de fermentación fue de 98 g/L. El contenido de biomasa en los 293 kg del caldo de fermentación producido fue de 38 g/L.

### 30 3.4 Procesamiento del caldo de fermentación mediante separación y secamiento de la biomasa

Para separar la biomasa se hizo pasar el caldo de fermentación que contenía biomasa a 300 L/h a través de un decantador CA 225 (empresa Westfalia). En total, según este procedimiento se obtuvieron 48,3 kg de una fracción que comprende biomasa con 23% en peso de biomasa seca y 244,7 kg de un sobrenadante libre de biomasa. Se extrajo una cantidad parcial de la fracción que contiene biomasa y se secó en bandejas en un horno de secado a  
35 90°C. La humedad residual de la biomasa seca fue de 5,2 % en peso. Respecto de la materia seca, la biomasa se componía de 62% en peso de proteína cruda, 0,3% en peso de proteína cruda, 5,6% en peso de grasa cruda, 5,9% en peso de azúcares y 3,2% en peso de ceniza cruda.

#### **Ejemplo 4, que no es de acuerdo con la invención: Producción y estudio de una composición de forraje para cerdos usando gluten del ejemplo 2**

40 Se analizaron muestras de la fracción de germen obtenidas en el ejemplo 1 (número de muestra n = 1), muestras del gluten seco obtenido en el ejemplo 2 (número de muestra n = 2) y muestras de la biomasa generada en el ejemplo 3 (número de muestra n = 16) respecto de su composición y de sus características de sólido. El análisis de las

muestras dio lugar a la composición representada en la siguiente tabla. El tamaño medio de partícula del gluten en las muestras consideradas se encontró en 270 µm, de la biomasa entre 400 y 500 µm, y de la fracción de germen molida entre 872 y 1194 µm.

Parámetro	Germen	Gluten	Biomasa
Humedad residual [%]	9,65	5,90	7,24
Proteína cruda [%]*	18,82	32,74	67,30
Azúcar total [%]*	18,09	27,80	5,62
Lisina [%]*	0,00	0,03	9,09
Fibra cruda [%]*	5,90	6,25	0,11
Grasa cruda [%]*	19,73	2,60	6,94
Ceniza cruda [%]*	2,35	0,83	2,75
N de Amonio [%]*	0,18	0,38	0,53
N total [%]*	3,01	5,24	10,77
Sulfato [%]*	0,09	0,13	4,71
NDF# [%]*	26,77	34,13	11,77
* respecto de la masa seca			
# fibra no digerible ( <i>non-digestible fiber</i> )			

- 5 Para la producción de una composición de forraje se mezclaron los componentes individuales en una proporción de 21% de biomasa: 22% de fracción de germen: 57% de gluten, con el fin de obtener una composición de forraje de la siguiente composición. Se prepararon un total de 16 muestras. En promedio, la composición de forraje obtenida de esta manera presentó una densidad aparente entre 550 y 700 g/L con un tamaño promedio de partícula de 590 µm.

Parámetro	Composición de forraje
Humedad residual [%]	9,32
Proteína cruda [%]*	36,98
Azúcar total [%]*	27,05
Lisina [%]*	2,65
Fibra cruda [%]*	4,72
Grasa cruda [%]*	10,13
Ceniza cruda [%]*	2,67
N de amonio[%]*	0,30
N total [%]*	5,90
Sulfato [%]*	1,26
NDF# [%]*	27,66
* respecto de la masa seca	
# fibra no digerible ( <i>non-digestible fiber</i> )	

- 10 La composición de forraje obtenida de esta manera presentó un contenido elevado de proteína, específicamente un contenido elevado de lisina y, debido al elevado contenido de grasa y azúcares, presentó un contenido elevado de energía.

En experimentos de forraje con cerdos, las composiciones de forraje elaboradas de esta manera se probaron para su aptitud como forraje o aditivos para forraje. Comenzando con una dieta de maíz/soya, se añadieron 5% de la composición de forraje obtenida. La cantidad añadida se compensó en correspondencia con la composición de la mezcla de forraje al reducir la harina de soya (73%), el maíz (20%) y el aceite de soya (7%). De esta manera, se elaboraron dietas con el mismo contenido energético y nutritivo por medio de más adaptaciones en aminoácidos libres y minerales. Finalmente, las raciones de granularon. La dieta que contenía la mezcla de forraje se suministró respectivamente en 12 corrales con lechones de 4 a 6 semanas, en comparación con la dieta de maíz / soya. Los lechones mostraron un incremento del peso promedio de 261 g/día, un índice de consumo de forraje de 472 g/día y un índice de asimilación de forraje de 1,87 kg de forraje por kg de peso incrementado. Se obtuvieron resultados equiparables al proporcionar una dieta convencional de maíz/soya, la cual había sido fortificada con aminoácidos para generar el contenido de nutrientes deseado.

25 Los ejemplos muestran que la composición de forraje puede emplearse en lugar de, o junto con, dietas convencionales sin que la calidad del forraje sufra por esto. Más bien puede prescindirse de la adición de aminoácidos. Por lo tanto, de manera diferente a los sólidos generados en la producción de bioetanol, los forrajes son adecuados como un reemplazo de alto valor para el maíz y la soya en dietas para animales monogástricos.

**Ejemplo 5 que no es de acuerdo con la invención: Producción de composiciones de forraje para polluelos usando gluten que puede obtenerse de manera análoga al ejemplo 2**

Respecto de su composición se analizaron muestras de las fracciones de biomasa, gluten y germen producidas en correspondencia con los ejemplos anteriores 1 a 3 para detectar su composición. Como referencia sirvió harina de soya.

Se preparó una composición de forraje al mezclar la biomasa, gluten y germen en la proporción de 26:47:27 y se analizó para detectar algunos componentes principales, de forma análoga al ejemplo 4. La composición de los otros componentes se calculó a partir de la composición de los componentes individuales de esta mezcla. De acuerdo con este procedimiento se obtuvo la siguiente composición de las diversas muestras:

Parámetro	Germen	Gluten	Bio-masa	FZ <sup>5)</sup>	Harina de Soja
Contenido de sustancia seca [g/kg]	912	966	931	937	911
Ceniza cruda [g/kg]	56	7	28	3	65
Proteína cruda [g/kg]	160	292	642	349	452
Otros extractos [g/kg]	226	66	85	111	25
Almidón [g/kg]	200	19	<6	63 <sup>4)</sup>	53
Azúcar [g/kg]	98	384	11	209 <sup>4)</sup>	89
Fibra cruda [g/kg]	53	37	4	32 <sup>4)</sup>	69
Contenido de energía ME [MJ/kg] <sup>2)</sup>	14,8	12,1	13,0	13,0 <sup>4)</sup>	9,9
Ca [g/kg]	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5 <sup>4)</sup>	3
P [g/kg]	2	2	4,4	2,6 <sup>4)</sup>	3
Na [g/kg]	0,3	0,3	3,2	1,1 <sup>4)</sup>	3
K [g/kg]	1,2	1,2	6,1	2,5 <sup>4)</sup>	3
Cl [g/kg]	< 0,6	< 0,6	1,9	0,9 <sup>4)</sup>	3
<sup>1)</sup> según análisis de aminoácidos <sup>2)</sup> cálculo mediante fórmula de regresión en correspondencia con resultados de análisis <sup>3)</sup> no analizado <sup>4)</sup> calculado de los componentes individuales de la formulación de forraje <sup>5)</sup> Composición de forraje					

10

Para la producción de un forraje, se preparó una dieta básica con la siguiente composición: La composición de la dieta básica se representa en la siguiente tabla:

Componente	[g/kg]
Maíz	677,1
Harina de soja de alta proteína ( <i>High Protein</i> )	211,0
L-Lisina HCl	7,8
D,L-Metionina	5,4
L-Treonina	3,5
L-Triptofano	0,9
L-Arginina	3,8
L-Isoleucina	3,1
L-Leucina	0,9
L-Valina	2,9
L-Fenilalanina	0,9
L-Cistina	1,7
Aceite de soja	27,5
Fosfato monocálcico	220,6
Carbonato de calcio	19,1
Cloruro de sodio	5,4
Premezcla de vitaminas	5,5
Cloruro de colina (50 %)	1,4
Premezcla de microelementos	1,4

## ES 2 379 969 T3

En los experimentos de forraje descritos en lo sucesivo, la dieta básica se empleó como referencia y se emplearon tres forrajes más en los que se reemplazaron 35 % en peso de la dieta por gluten del ejemplo 2, por la composición de forraje o por harina de soja (comparación).

No.	Composición	
V1	Dieta básica	100%
2	Dieta básica + Gluten	65%+35%
3	Dieta básica + Composición de forraje	65%+35%
V4	Dieta básica + harina de soja	65%+35%
V: comparación		

- 5 Para asegurar la homogeneidad, se generó una mezcla básica común de esta dieta básica. Luego, las muestras correspondientes se mezclaron respectivamente con su mezcla básica. A continuación, las mezclas se compactaron mediante una matriz de 3 mm para proporcionar gránulos.

- 10 Para preparar los experimentos de forraje, se criaron polluelos machos de un día de edad (Ross 308) en galpones utilizando una dieta inicial disponible a nivel comercial. En el día 8, algunos de estos polluelos se retiraron para participar en los experimentos de forraje y se transfirieron.

- 15 Para experimentos de forraje se llevaron a cabo respectivamente 6 experimentos paralelos con 8 polluelos enjaulados por muestra, respectivamente. Hasta el día 13, estos polluelos se alimentaron con la dieta inicial comercial. En el día 13, los polluelos se pesaron, y recibieron la dieta experimental durante 9 días antes de volverse a pesar. En este procedimiento, se obtuvieron diariamente los siguientes incrementos de peso, consumo de forraje e índices de aprovechamiento de forraje (incremento de peso/consumo de forraje, expresado como masa) :

Forraje No.	V1	2	3	V4
Incremento de peso [g/día]	57,5	52,0	39,9	61,5
Consumo de forraje [g/día]	85,5	85,1	76,5	87,8
Índice de aprovechamiento de forraje <sup>1)</sup>	1,49	1,64	1,92	1,43
<sup>1)</sup> g de incremento de peso / g de consumo de forraje				

Las dietas con el gluten o las composiciones de forraje condujeron a un mejor aprovechamiento de forraje

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para la producción de una solución acuosa de glucosa de maíz, el cual comprende:
- a) molienda en seco, fraccionante de granos de maíz, en cuyo caso los granos de maíz se separan en una fracción de endosperma que contiene almidón de maíz y una fracción de germen rica en aceite y opcionalmente una fracción de salvado;
  - b) licuefacción y sacarificación enzimáticas del almidón de maíz en una suspensión acuosa de la fracción de endosperma, en cuyo caso se obtiene una solución acuosa de glucosa que contiene gluten de maíz; y
  - c) reducción de la concentración del gluten de maíz y opcionalmente del salvado presente en la solución acuosa de glucosa,
- en cuyo caso, en el paso b) se emplea una suspensión acuosa de la harina de maíz obtenida en el paso a), la cual contiene la fracción de endosperma y opcionalmente la fracción de salvado, y la cantidad de la harina de maíz se selecciona de tal manera que la suspensión acuosa contiene 30 a 45 % en peso de almidón, respecto del peso total de la suspensión.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde la molienda se realiza en el paso a) en presencia de 1 a 30 % en peso de agua respecto de la masa de los granos de maíz empleados.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde en el paso a) se separan esencialmente solo la fracción de germen y la fracción de salvado de la fracción de endosperma.
4. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde en el paso a) se separan la fracción de salvado y la fracción de germen de la fracción de endosperma y una parte de la fracción de salvado se reintroduce a la fracción de endosperma.
5. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, donde el gluten de maíz se retira de la solución acuosa de glucosa en al menos 90 %, respecto de todos los componentes de glucosa contenidos en la solución de glucosa.
6. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, donde la reducción de la concentración del gluten de maíz y de los componentes de salvado opcionalmente presentes se efectúa de tal manera que la solución de glucosa obtenida después de la reducción de concentración contiene menos de 10 % en volumen de sólidos.