

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 376**

51 Int. Cl.:

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2006 E 06830135 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1957656**

54 Título: **Preparación fermentativa de lisina**

30 Prioridad:

28.11.2005 DE 102005056668

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.06.2014

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE**

72 Inventor/es:

**POMPEJUS, MARKUS;
FREYER, STEPHAN;
LOHSCHIEDT, MARKUS;
ZELDER, OSKAR y
BOY, MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 471 376 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparación fermentativa de lisina

La presente invención se refiere a la preparación fermentativa de lisina mediante el empleo de un medio que contiene azúcar, que comprende al menos una parte de los constituyentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón, para el cultivo de los microorganismos.

Los medios líquidos que contienen azúcar son una fuente fundamental de nutrientes para muchos procedimientos de fermentación; las partes de azúcar contenidas en los medios se metabolizan por los microorganismos empleados, obteniéndose productos de valor orgánicos. La diversidad de productos metabólicos microbianos preparados de este modo, es decir, compuestos orgánicos, en este caso comprende, por ejemplo, compuestos volátiles de bajo peso molecular tales como etanol, productos metabólicos no volátiles tales como aminoácidos, vitaminas y carotenoides así como múltiples sustancias adicionales.

Para tales procedimientos de fermentación microbiana conocidos en general, dependiendo de las distintas condiciones del procedimiento se utilizan distintas fuentes de carbono. Estas van desde sacarosa pura pasando por melaza de remolacha y caña de azúcar, las denominadas "melazas high test" (melaza de caña de azúcar invertida) hasta glucosa de hidrolizados de almidón. Para la preparación biotecnológica de L-lisina además se mencionan ácido acético y etanol como co-sustratos que se pueden emplear a gran escala (Pfefferle y col., *Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 79 (2003), 59-112).

Basándose en las fuentes mencionadas de carbono se han establecido distintos métodos y formas de proceder para la preparación fermentativa basada en azúcar de productos metabólicos microbianos. Con el ejemplo de la L-lisina, los mismos se describen, por ejemplo, por Pfefferle y col. (en el lugar citado) en relación con generación de cepa, desarrollo del procedimiento y producción a gran escala.

Una importante fuente de carbono para la preparación fermentativa mediada por microorganismos de productos metabólicos microbianos es el almidón. El mismo, en etapas de reacción antepuestas, en primer lugar se tiene que licuar y sacarificar antes de que se pueda usar en una fermentación como fuente de carbono. Para esto se obtiene el almidón de una fuente natural de almidón tal como patatas, yuca, cereales, por ejemplo, trigo, maíz, cebada, centeno, triticale o arroz habitualmente en forma purificada previamente y a continuación se licua enzimáticamente y se sacarifica para emplearse entonces en la fermentación en sí para la producción de los productos metabólicos deseados.

Además del empleo de fuentes de almidón purificadas previamente de este modo se ha descrito también el uso de fuentes no purificadas de almidón para la preparación de fuentes de carbono para la producción fermentativa de productos metabólicos microbianos. A este respecto, normalmente, las fuentes de almidón en primer lugar se trituran mediante molienda. El producto molido se somete entonces a una licuefacción y sacarificación. Ya que este producto molido contiene de forma natural, además del almidón, también una serie de constituyentes que no contienen almidón, que pueden influir de forma desventajosa en la fermentación, estos constituyentes habitualmente se separan antes de la fermentación. La retirada se puede realizar directamente después de la molienda (documentos WO 02/077252; JP 2001-072701; JP 56-169594; CN 1218111), después de la licuefacción (documentos WO 02/077252; CN 1173541) o después de la sacarificación (documento CN 1266102; Beukema y col.: *Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potatoe saccharification to give culture medium* (Conference Abstract), *Symp. Biotechnol. Res. Neth.* (1983), 6; NL8302229). Sin embargo, en todas las variantes se emplea un hidrolizado de almidón esencialmente puro en la fermentación.

Frente a esto se describe en el documento US 5.503.750 un procedimiento de fermentación desarrollado especialmente para la preparación de ácido láctico mediante el uso de mosto de cereales sacarificado, en el que el ácido láctico se separa de forma continua mediante ultrafiltración y posterior nanofiltración y, de este modo, se retira del fermentador. Los retentados de la ultra- y nanofiltración que contienen azúcar residual no fermentado se devuelven al fermentador.

Los procedimientos más nuevos para la preparación fermentativa de compuestos orgánicos comprenden, en particular, una purificación de las fuentes de almidón antes de la fermentación, por ejemplo, la purificación de soluciones de almidón licuadas y sacarificadas (documento JP 57159500), o facilitan procedimientos que han de posibilitar la preparación de medios de fermentación a partir de recursos renovables (documento EP 1205557).

Por el contrario, las fuentes no purificadas de almidón se emplean en gran medida durante la preparación fermentativa de bioetanol. En este caso, las fuentes de almidón, habitualmente granos enteros de cereales, en primer lugar se muelen en seco y a continuación se hidroliza el constituyente de almidón de la fuente de almidón bajo los efectos de enzimas. A este respecto, la hidrólisis se puede llevar a cabo de forma tanto discontinua, por ejemplo, en reactores de agitación, como continua, por ejemplo, en cocedores de chorro. Se encuentran descripciones correspondientes de procedimientos, por ejemplo, en "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Jaques y col. (ed.), Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735, capítulo 2, páginas 7 a 23, y en McAloon y col., "Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks", NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory, octubre de 2000.

Ya que en la preparación fermentativa de bioetanol se obtiene el producto de valor mediante destilación, el empleo de fuentes de almidón del procedimiento de molienda en seco en forma no purificada previamente no representa ningún problema serio. Sin embargo, en caso de la aplicación de un procedimiento de molienda en seco para la preparación de otros productos metabólicos microbianos, la corriente de sólidos aportada a la fermentación a través de la solución de azúcar es problemática, ya que la misma puede tener efecto negativo sobre la fermentación, por ejemplo, en vista de la velocidad de transferencia de oxígeno o la necesidad de oxígeno de los microorganismos empleados (para esto compárese con Mersmann, A. y col.: Selection and Design of Aerobic Bioreactors, Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357-370) y puede dificultar de forma considerable el tratamiento posterior.

Además, mediante la aportación de sólidos ya durante la preparación de la suspensión que contiene almidón, la viscosidad de la suspensión puede alcanzar un valor crítico, por lo que, por ejemplo, una suspensión con más del 30 % en peso de harina de maíz en agua no se puede mezclar ya homogéneamente (Industrial Enzymology, 2ª ed., T. Godfrey, S. West, 1996). Por ello, con un procedimiento convencional la concentración de glucosa está limitada. Esto, con respecto a la preparación fermentativa de bioetanol, no tiene más relevancia en el sentido de que mayores concentraciones, a causa de la toxicidad del producto para las levaduras empleadas para la fermentación, de por sí no se pueden hacer reaccionar de forma oportuna.

En la preparación fermentativa de productos metabólicos orgánicos distintos del etanol, en principio es desventajoso suministrar a la fermentación medios que contengan azúcar con reducidas concentraciones de azúcar, debido a que esto conduce a una dilución sobreproporcional del caldo de fermentación y, por consiguiente, se reduce la concentración final que se puede conseguir de los productos de valor, lo que, por un lado, causa costes mayores durante su obtención del medio de fermentación y disminuye el rendimiento espacio-tiempo. Estas consideraciones son determinantes en particular para el caso en el que un hidrolizado de almidón preparado para una producción de bioetanol de gran volumen, que presenta de forma convencional reducidas concentraciones de azúcar o glucosa de hasta aproximadamente el 30 o el 33 % en peso, se ha de suministrar parcialmente a una fermentación secundaria de menor volumen para la preparación de otros productos químicos.

A causa de las dificultades y las limitaciones expuestas, los procedimientos de molienda en seco, tal como se emplean en gran medida para la preparación de bioetanol, en la preparación fermentativa de productos metabólicos microbianos distintos del etanol hasta ahora no han adquirido ninguna importancia económica sustancial.

Hasta ahora se han descrito intentos para transferir el concepto de molienda en seco y las ventajas principales asociadas a este procedimiento a la preparación a gran escala de productos metabólicos microbianos únicamente mediante el uso de yuca como fuente de almidón. De este modo, el documento JP 2001/275693 describe un procedimiento para la preparación fermentativa de aminoácidos, en el que como fuente de almidón se emplean tubérculos pelados de yuca que se han molido en seco. Sin embargo, para llevar a cabo el procedimiento es necesario ajustar un tamaño de partícula del producto molido de $\leq 150 \mu\text{m}$. En la filtración aplicada para esto se separan partes del producto molido empleado, incluyendo constituyentes que no contienen almidón, antes de la licuefacción/sacarificación del almidón contenido y la posterior fermentación. En este procedimiento se consiguen concentraciones moderadas de azúcar. Se describe un procedimiento similar en el documento JP 2001/309751 para la preparación de un aditivo de pienso que contiene aminoácidos.

Se pueden conseguir mayores concentraciones de azúcar en el medio líquido empleado para fermentación con el empleo de un producto de molienda para la sacarificación que contiene, esencialmente, los constituyentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón mediante el procedimiento descrito por el solicitante en el documento WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728). A este respecto, una separación de los constituyentes sólidos que no contienen almidón contenidos en la fuente de almidón antes de la fermentación sorprendentemente ha resultado no ser necesaria. Se describe un procedimiento similar mediante el empleo de fuentes de almidón seleccionadas de granos de cereales en el documento PCT/EP2006/066057 (solicitud de patente anterior DE 102005042541.0) del solicitante. En algunos casos se observó una inhibición o retraso de la multiplicación de los microorganismos.

Por tanto, el objetivo de la presente invención era facilitar otro procedimiento para la preparación de lisina mediante fermentación que no requiriese ninguna, o al menos ninguna separación previa completa, de los constituyentes sólidos que no contienen almidón contenidos en la fuente de almidón. Además, debía caracterizarse por una sencilla manejabilidad de los medios usados y su empleo sin problemas en la fermentación. En particular, el procedimiento debía permitir el uso de cereales como fuente de almidón.

Sorprendentemente, se halló que se pueden superar los problemas del estado de la técnica explicados en el presente documento al preparar en primer lugar mediante molienda, licuefacción y sacarificación de fuentes de almidón sin separación previa de los constituyentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón un primer medio líquido que contiene azúcar (1) y al suministrar el mismo junto con los mono-, di- u oligosacáridos metabolizables o una composición que contiene mono- u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso y que esencialmente está exenta de sólidos insolubles en agua, a una fermentación.

Por tanto, el objetivo de la invención es un procedimiento para la preparación de lisina mediante fermentación que comprende las siguientes etapas:

a1) molienda de granos de cereales como fuente de almidón con obtención de un producto molido que contiene al menos el 50 % en peso de los constituyentes sólidos que no contienen almidón contenidos en los granos de cereales molidos, ascendiendo la parte de los constituyentes sólidos que no contienen almidón en el producto molido al menos al 15 % en peso;

5 a2) suspensión del producto molido en un líquido acuoso e hidrólisis de la parte de almidón en el producto molido mediante licuefacción enzimática y, dado el caso, sacarificación posterior, obteniéndose un primer líquido (1) que contiene mono- u oligosacáridos, que contiene los constituyentes sólidos que no contienen almidón del producto molido y en el que la concentración total de mono-, di- y oligosacáridos se encuentra en el intervalo de 100 a 400 g/kg; y

10 b) adición del líquido (1) que contiene mono- u oligosacáridos junto con mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables o una composición que contiene mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso y que esencialmente está exenta de sólidos insolubles en agua, a un medio de fermentación que contiene un microorganismo que está capacitado para la sobreproducción de la lisina en condiciones de fermentación,

15 aumentándose la concentración total de mono-, di- y oligosacáridos en el primer líquido (1) mediante adición de mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables o mediante adición de un medio que contiene mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso y que está esencialmente libre de sólidos insolubles en agua al menos 50 g/kg.

20 El empleo del líquido (1) obtenido mediante hidrólisis enzimática, que contiene mono- u oligosacáridos, conduce a una clara reducción de los costes durante la preparación fermentativa de los compuestos orgánicos. A causa de la adición paralela a esto de azúcares metabolizables (es decir, los mono-, di- u oligosacáridos metabolizables) en forma concentrada se evita, además, una dilución indeseada del caldo de fermentación. Además, gracias al procedimiento de acuerdo con la invención se pueden evitar problemas de viscosidad, tal como pueden aparecer durante la licuefacción de la fuente de almidón a mayores concentraciones de producto molido. Además se pueden evitar de este modo problemas durante la multiplicación del microorganismo.

25 Aquí y en lo sucesivo, en relación con el líquido (1) que contiene mono- u oligosacáridos se usan de forma sinónima las expresiones "líquido (1)" y medio líquido (1)".

30 Como fuente de almidón sirven para el procedimiento de acuerdo con la invención granos de almidón que presentan en el estado seco al menos el 40 % en peso y, preferentemente, al menos el 50 % en peso de parte de almidón. Estos se encuentran en muchas de las plantas de cereales cultivadas hoy en día a gran escala tales como maíz, trigo, avena, cebada, centeno, triticale, arroz y distintas variedades de mijo, por ejemplo, sorgo y milo. Preferentemente, la fuente de almidón está seleccionada de granos de maíz, centeno, triticale y trigo. Básicamente, el procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo también con fuentes análogas de almidón tales como, por ejemplo, una mezcla de distintos granos de cereales que contienen almidón.

35 Para la preparación del medio líquido (1), en la etapa a1) se muele la respectiva fuente de almidón con o sin adición de líquido, por ejemplo, agua, preferentemente sin la adición de líquido. Se puede combinar también una molienda en seco con una posterior molienda en húmedo.

40 Para la molienda en seco se emplean normalmente molinos de martillos, molinos de rotor o molinos trituradores de cilindros; para la molienda en húmedo son adecuados mezcladoras de agitación, molinos de bolas de mecanismo de agitación, molinos de circulación, molinos de discos, molinos de cámara anular, molinos vibratorios o molinos planetarios. Básicamente se consideran también otros molinos. El experto puede establecer en experimentos rutinarios la cantidad de líquido requerida para la molienda en húmedo. Habitualmente se ajusta de tal manera que el contenido de sustancia seca se encuentra en el intervalo del 10 al 20 % en peso.

45 Mediante la molienda se ajusta un tamaño de grano adecuado para las etapas posteriores del procedimiento. En este caso ha resultado ventajoso que el producto molido obtenido con la molienda, en particular con la molienda en seco en la etapa a1), presente partículas de harina, es decir, constituyentes con forma de partícula, con un tamaño de grano en el intervalo de 100 a 630 µm en una parte del 30 al 100 % en peso, preferentemente del 40 al 95 % en peso y de forma particularmente preferente del 50 al 90 % en peso. Preferentemente, el producto molido obtenido contiene el 50 % en peso de partículas de harina con un tamaño de grano de más de 100 µm. Por norma general, al menos el 95 % en peso de las partículas de harina molidas presentan un tamaño de grano de menos de 2 mm. A este respecto, la medición del tamaño de grano se realiza mediante análisis de tamiz mediante el uso de una máquina de análisis de vibración. Un tamaño de grano reducido básicamente es ventajoso para la obtención de un elevado rendimiento de producto. Sin embargo, un tamaño de partícula demasiado reducido puede conducir a problemas, en particular debido a formación de grumos/aglomeración, durante la mezcladura inicial del producto molido durante la licuefacción o en el tratamiento, por ejemplo, en el secado de los sólidos después de la etapa de fermentación.

Habitualmente, las harinas se caracterizan por el grado de molienda o por el tipo de harina, correlacionándose los mismos entre sí de tal manera que con un grado creciente de molienda aumenta también la variable característica

del tipo de harina. El grado de molienda se corresponde con la cantidad en peso de la harina obtenida en relación con 100 partes en peso del producto molido empleado. Mientras que con la molienda se produce en primer lugar harina fina pura, por ejemplo, del interior del grano de cereal, con la molienda posterior, es decir, con un grado creciente de molienda, aumenta la parte de contenido de fibra bruta y cáscara en la harina, a este respecto se reduce la parte de almidón. Por tanto, el grado de molienda se refleja también en el denominado tipo de harina, que se usa como indicación en número para la clasificación de harinas de cereales y que se basa en el contenido de cenizas de la harina (la denominada escala de cenizas). En este caso, el tipo de harina o el número de tipo indica la cantidad de cenizas (minerales) en mg que queda al quemar 100 g de sustancia seca de harina. Para harinas de cereales, un mayor número de tipo significa un mayor grado de molienda, ya que el núcleo del grano de cereal contiene aproximadamente el 0,4 % en peso, la cáscara por contra aproximadamente el 5 % en peso de ceniza. Con un menor grado de molienda, por tanto, las harinas de cereales están compuestas, sobre todo, del cuerpo de harina triturado, es decir, el constituyente de almidón de los granos de cereales; con un mayor grado de molienda, las harinas de cereales contienen también la capa de aleurona triturada que contiene proteínas de los granos de cereales, en los granos triturados también los constituyentes del germen que contiene proteína y grasa así como las cáscaras de semilla que contienen fibra bruta y cenizas. Para los fines de acuerdo con la invención se prefieren básicamente harinas con un elevado grado de molienda o un elevado número de tipo. Preferentemente, los granos enteros no descascarillados se muelen y continúan procesando, dado el caso después de una separación mecánica previa de germen y gluma.

De acuerdo con la invención, el producto molido usado para la preparación del medio líquido (1) contiene al menos el 50 % en peso, especialmente al menos el 90 % en peso y muy especialmente al menos el 99 % en peso de los constituyentes sólidos que no contienen almidón contenidos en los granos molidos de cereales, de forma correspondiente al grado de molienda. En relación con los constituyentes que contienen almidón del producto molido (y, por tanto, la cantidad de mono-, di- u oligosacárido en el medio líquido (1)), la parte de los constituyentes sólidos que no contienen almidón en el producto molido asciende al menos al 15 % en peso, por ejemplo del 15 al 75 % en peso y especialmente en el intervalo del 20 al 60 % en peso.

La hidrólisis enzimática del producto molido de acuerdo con la etapa a2) se puede realizar según procedimientos habituales conocidos por el experto, por ejemplo, según los procedimientos descritos en el "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", capítulo 2, páginas 7 a 23 que se ha citado al principio.

Para esto, en primer lugar se mezclará el producto molido con un líquido acuoso, por ejemplo, agua fresca, agua de proceso devuelta, por ejemplo, de una fermentación posterior, o con una mezcla de estos líquidos, obteniéndose una suspensión acuosa. Este proceso se denomina frecuentemente también mezclado.

La cantidad de producto molido y líquido acuoso por norma general se seleccionan de tal manera que, mediante la hidrólisis, se obtiene un medio líquido (1) acuoso, en el que la concentración total de mono-, di- y/u oligosacáridos se encuentra en el intervalo de 100 a 400 g/kg, preferentemente en el intervalo de 150 a 350 g/kg y en particular en el intervalo de 200 a 300 g/kg. Por consiguiente se emplea el producto molido normalmente en una cantidad de 150 a 550 g/kg, frecuentemente en el intervalo de 200 a 500 g/kg y en particular en el intervalo de 250 a 450 g/kg en relación con el peso total de la suspensión (mosto). Se pueden emplear básicamente también mayores cantidades de producto molido para conseguir una mayor concentración total de mono-, di- y/u oligosacáridos, por ejemplo concentraciones por encima de 400 g/kg a 700 g/kg, en particular en el intervalo de 450 a 650 g/kg o de 500 g/kg a 650 g/kg.

Para la hidrólisis enzimática de la parte de almidón del producto molido se realizará, por norma general, en primer lugar una licuefacción del producto molido en presencia de una enzima que licua el almidón, por norma general una α -amilasa. Asimismo se pueden emplear otras enzimas activas y estables en las condiciones de reacción que licuan el almidón.

Para licuar la parte de almidón en el producto molido se pueden emplear, básicamente, todas las enzimas licuefactoras, en particular α -amilasas (clase de enzimas EC 3.2.1.1), por ejemplo α -amilasas que se han obtenido de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus staerothermophilus* y especialmente las que se usan para licuar materiales obtenidos mediante procedimientos de molienda en seco en el marco de la preparación de bioetanol. Las α -amilasas adecuadas para la licuefacción también están disponibles en el mercado, por ejemplo en Novozymes con la denominación Termamyl 120 L, Tipo L; o de Genencor con la denominación Spezyme. Se puede emplear también una combinación de distintas α -amilasas para la licuefacción.

En este caso se obtiene un medio acuoso que contiene la parte licuada de almidón del producto molido, normalmente oligosacáridos con, por norma general, 3 a 18, en particular 6 a 12 unidades de monosacárido, en particular unidades de glucosa, así como los constituyentes que no contienen almidón del producto molido empleado, en particular los constituyentes sólidos que no contienen almidón del producto molido empleado para la licuefacción.

Ventajosamente, las cantidades de enzima que licua almidón y producto molido se seleccionan de tal manera que la viscosidad está reducida suficientemente durante el proceso de gelificación para posibilitar un entremezclado eficaz

de la suspensión, por ejemplo, mediante agitación. Preferentemente, la viscosidad de la mezcla de reacción durante la gelificación asciende como máximo a 20 Pas, de forma particularmente preferente a como máximo 15 Pas y de forma muy particularmente preferente como máximo a 8 Pas. Por norma general, la medición de la viscosidad se realiza con un viscosímetro de Haake tipo Roto Visko RV20 con el sistema de medición M5 y equipo de medición MVDIN a una temperatura de 50 °C y una velocidad de cizalla de 200 s⁻¹.

La α -amilasa (o la enzima que licua el almidón usada) se puede disponer en el recipiente de reacción o se puede añadir en el transcurso de la etapa a2). Preferentemente se añade una cantidad parcial de la α -amilasa necesitada en la etapa a2) al comienzo de la etapa a2) o se dispone en el reactor esta cantidad parcial. La cantidad total de α -amilasa se encuentra, habitualmente, en el intervalo del 0,002 al 3,0 % en peso, preferentemente del 0,01 al 1,5 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,02 al 0,5 % en peso en relación con la cantidad total de la fuente empleada de almidón.

La licuefacción se puede realizar por encima o por debajo de la temperatura de gelificación. Preferentemente se realiza la licuefacción en la etapa a2) al menos temporalmente por encima de la temperatura de gelificación o temperatura de gelatinización del almidón empleado (el denominado proceso de cocción). La temperatura necesaria para esto para el respectivo almidón es conocida por el experto (véase el "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", capítulo 2, página 11 citado al principio) o se puede determinar por el mismo en experimentos rutinarios. Por norma general se selecciona una temperatura en el intervalo entre 80 y 165 °C, preferentemente entre 90 y 150 °C y de forma particularmente preferente en el intervalo de 100 a 140 °C, encontrándose la temperatura, por norma general, al menos 5 K, en particular al menos 10 K y de forma particularmente preferente al menos 20 K, por ejemplo, de 10 a 100 K, en particular de 20 a 80 K por encima de la temperatura de gelificación. A estas temperaturas se destruye la estructura granular del almidón (gelificación), por lo que se posibilita su degradación enzimática.

Para un efecto óptimo de la α -amilasa (o de la enzima que licua el almidón usada) se lleva a cabo la etapa a2), preferentemente, al menos temporalmente en el óptimo de pH de la enzima licuefactora, frecuentemente a un valor de pH en el intervalo débilmente ácido, preferentemente entre 4,0 y 7,0, de forma particularmente preferente entre 5,0 y 6,5, efectuándose habitualmente antes o al comienzo de la etapa a2) el ajuste del pH; este valor del pH se controla preferentemente durante la licuefacción y dado el caso se reajusta. El ajuste del valor del pH se realiza, preferentemente, con ácidos minerales diluidos tales como H₂SO₄ o H₃PO₄ o con lejías alcalinas diluidas, tales como NaOH o KOH.

En una forma de realización preferente, para la licuefacción de la parte de almidón en el producto molido de acuerdo con la etapa a2) se añade al menos una cantidad parcial del producto molido de forma continua o discontinua al líquido acuoso. En este caso, preferentemente se añade al menos el 40 % en peso, en particular al menos el 50 % en peso y de forma muy particularmente preferente al menos el 55 % en peso en el transcurso de la licuefacción, sin embargo, antes de una posible sacarificación al reactor. Frecuentemente, la cantidad añadida no superará el 90 % en peso, en particular el 85 % en peso y de forma particularmente preferente el 80 % en peso. Preferentemente, la cantidad parcial añadida en el transcurso de producto molido se suministra al reactor en condiciones como existen durante la licuefacción. La adición se puede realizar de forma discontinua, es decir, en porciones en varias subporciones que, con preferencia, respectivamente no ascienden a más del 30 % en peso, de forma particularmente preferente no a más del 20 % en peso, por ejemplo, del 1 al 30 % en peso y en particular del 2 al 20 % en peso de la cantidad total del producto molido a licuar, o de forma continua. En esta forma de realización es esencial que al comienzo de la licuefacción se encuentre en el reactor solo una parte del producto molido, preferentemente no más del 60 % en peso, en particular no más del 50 % en peso y de forma particularmente preferente no más del 45 % en peso del producto molido y que se añada la cantidad restante del producto molido durante la licuefacción.

La licuefacción se puede llevar a cabo también de forma continua, por ejemplo, en una cascada de reacción multietápica.

En una forma de realización preferente, la etapa a2) del procedimiento de acuerdo con la invención se realiza de tal manera que en primer lugar se suspende una cantidad parcial de como máximo el 60 % en peso, preferentemente como máximo el 50 % en peso y de forma particularmente preferente como máximo el 45 % en peso, por ejemplo del 10 al 60 % en peso, en particular del 15 al 50 % en peso y de forma particularmente preferente del 20 al 45 % en peso, en relación con la cantidad total del producto molido en el líquido acuoso y a continuación se lleva a cabo la licuefacción.

En una forma de realización preferente se realiza la adición discontinua o continua, en particular por porciones de una cantidad parcial del producto molido en la etapa a2) de tal manera que la viscosidad del medio líquido asciende, como máximo, a 20 Pas, preferentemente como máximo a 15 Pas y de forma particularmente preferente como máximo a 8 Pas. Para respaldar el control de la viscosidad ha resultado ventajoso que al menos el 25 % en peso, preferentemente al menos el 35 % en peso y de forma particularmente preferente al menos el 50 % en peso de la cantidad total del producto molido añadido se añada a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización del almidón normalmente el producto molido. El control de la viscosidad además se puede ver influido porque se añade al menos una enzima que licua el almidón, preferentemente una α -amilasa, y/o la al menos una

enzima de sacarificación, preferentemente una glucoamilasa, también por porciones.

Para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención es posible que el líquido acuoso usado para la suspensión del producto molido sólido se pre-atempere a una temperatura ligeramente elevada, por ejemplo en el intervalo de 40 a 60 °C. Sin embargo, se prefiere emplear los líquidos a temperatura ambiente.

5 Entonces, a la suspensión del producto molido se añade la al menos una enzima que licua el almidón, preferentemente una α -amilasa. Si se añade una cantidad parcial del producto molido solo en el transcurso de la licuefacción, entonces preferentemente al principio se añade solo una cantidad parcial de la α -amilasa, por ejemplo del 10 al 70 % en peso y en particular del 20 al 65 % en peso en relación con la α -amilasa empleada en total en la etapa a2). La cantidad de α -amilasa añadida en este momento en este caso depende de la actividad de la respectiva α -amilasa en relación con la fuente usada de almidón en las condiciones de reacción y se encuentra, habitualmente, en el intervalo del 0,0004 al 2,0 % en peso, preferentemente del 0,001 al 1,0 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,02 al 0,3 % en peso, en relación con la cantidad total de la fuente empleada de almidón. Como alternativa, en este caso la cantidad parcial de la α -amilasa antes de la preparación de la suspensión se puede mezclar con el líquido acuoso.

15 Preferentemente, la cantidad empleada o cantidad parcial de α -amilasa antes del comienzo del calentamiento se añade a la temperatura aplicada para la licuefacción, en particular a temperatura ambiente o temperatura solo ligeramente mayor, por ejemplo en el intervalo de 20 a 30 °C, a la suspensión.

Entonces, la suspensión preparada de este modo se calienta preferentemente a una temperatura por encima de la temperatura de gelificación del almidón usado. Por norma general se selecciona una temperatura en el intervalo de 80 a 165 °C, preferentemente de 90 a 150 °C y de forma particularmente preferente en el intervalo de 100 a 140 °C, encontrándose la temperatura preferentemente al menos 5 K, en particular 10 K y de forma particularmente preferente al menos 20 K, por ejemplo de 10 a 100 K, en particular de 20 a 80 K por encima de la temperatura de gelificación (temperatura de gelatinización). Con control de la viscosidad dado el caso poco a poco se añaden otras cantidades parciales de la fuente de almidón, por ejemplo, respectivamente del 1 al 30 % en peso y en particular del 2 al 20 % en peso en relación con la cantidad empleada total de producto molido a la suspensión que contiene almidón. En este caso se prefiere añadir la cantidad parcial a añadir en el transcurso de la licuefacción del producto molido en al menos 2, preferentemente al menos 4 y de forma particularmente preferente al menos 6 porciones parciales a la mezcla de reacción. Como alternativa, en esta forma de realización se puede realizar la adición de la cantidad parcial no empleada durante la preparación de la suspensión del producto molido de forma continua durante la licuefacción. La temperatura, durante la adición, se debería mantener ventajosamente por encima de la temperatura de gelificación del almidón.

Después de alcanzar la temperatura deseada o dado el caso después de la adición completa de la harina, se mantiene, es decir, se cuece la mezcla de reacción habitualmente todavía durante un tiempo, por ejemplo de 10 a 60 minutos o más, en caso necesario, a la temperatura ajustada por encima de la temperatura de gelificación del almidón. La mezcla de reacción se enfría entonces por norma general a una temperatura ligeramente menor, sin embargo, preferentemente por encima de la temperatura de gelificación, por ejemplo de 70 a 90 °C. A continuación, dado el caso se añade una cantidad parcial adicional de α -amilasa, preferentemente la cantidad principal. En este caso, la cantidad de α -amilasa añadida en este momento, dependiendo de la actividad de la α -amilasa usada en las condiciones de reacción, está preferentemente en del 0,002 al 2,0 % en peso, de forma particularmente preferente del 0,01 al 1,0 % en peso y de forma muy particularmente preferente del 0,02 al 0,4 % en peso en relación con la cantidad total de la fuente empleada de almidón.

Para la degradación completa del almidón hasta dar dextrinas, la mezcla de reacción se mantiene a la temperatura ajustada o, dado el caso, se continúa calentando hasta que la comprobación de almidón con yodo o, dado el caso, otro ensayo para la comprobación de almidón, resulte negativo o al menos sustancialmente negativo. Dado el caso, en este caso se pueden añadir todavía una o varias cantidades parciales adicionales de α -amilasa, por ejemplo, en el intervalo del 0,001 al 0,5 % en peso y preferentemente del 0,002 al 0,2 % en peso, en relación con la cantidad total de la fuente empleada de almidón, a la mezcla de reacción.

Como alternativa, la suspensión acuosa que contiene el producto molido para la licuefacción de la parte de almidón se puede calentar en primer lugar mediante introducción de vapor de agua a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización del almidón normalmente la fuente de almidón o en el producto molido. Normalmente se calentará a una temperatura que se encuentra al menos 10 K y en particular al menos 20 K, por ejemplo de 10 a 100 K, en particular de 20 a 80 K por encima de la respectiva temperatura de gelatinización. En particular se calienta la suspensión a temperaturas en el intervalo de 90 a 150 °C y especialmente en el intervalo de 100 a 140 °C.

En el caso del vapor de agua empleado para el calentamiento se trata, normalmente, de vapor de agua sobrecalentado que presenta una temperatura de al menos 105 °C, en particular al menos 110 °C, por ejemplo de 110 a 210 °C. Preferentemente se incluye el vapor con sobrepresión en la suspensión. Por consiguiente, el vapor presenta, preferentemente, una presión de al menos 0,15 MPa (1,5 bar), por ejemplo de 0,15 MPa a 1,6 MPa (1,5 a 16 bar), en particular de 0,2 a 1,2 MPa (2 a 12 bar).

La introducción de vapor de agua en la suspensión, por norma general, se realiza de tal manera que se introduce el vapor con sobrepresión, preferentemente una sobrepresión de 0,1 a 1 o 1,1 MPa (1 a 10 u 11 bar), en particular de 0,15 a 0,5 MPa (1,5 a 5 bar) y preferentemente con elevada velocidad en la suspensión. Gracias a la introducción del vapor se calienta la suspensión instantáneamente a temperaturas por encima de 90 °C, es decir, temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización.

Preferentemente se realiza el calentamiento con vapor de agua en un dispositivo que trabaja de forma continua, al que se alimenta la suspensión de forma continua con una determinada presión de transporte que resulta a partir de la viscosidad de la suspensión, la velocidad de transporte y la geometría del dispositivo y al que se alimenta en la zona de la alimentación de la suspensión el vapor caliente con sobrepresión, en relación con la presión de transporte, a través de una tobera regulable. Gracias a la alimentación del vapor con sobrepresión, la suspensión no solamente se calienta, sino que se aporta también energía mecánica al sistema, que favorece una trituración adicional de las partículas de producto molido, causa una aportación de energía particularmente uniforme y, por tanto, tiene como consecuencia una gelatinización particularmente uniforme de las partículas de almidón granulares en el producto molido. Normalmente, estos dispositivos tienen una geometría tubular. Preferentemente se realiza la introducción del vapor en dirección del eje longitudinal del dispositivo tubular. El suministro de la suspensión se realiza, por norma general, en un ángulo de al menos 45° o perpendicularmente con respecto a esto. La tobera regulable presenta, normalmente, una geometría cónica que se estrecha en dirección del flujo del vapor. En esta tobera está dispuesta una aguja o un cono dispuesto sobre una barra desplazable en dirección longitudinal. La aguja o el cono forman con el cono de la tobera una hendidura. Mediante el desplazamiento de la aguja o de la barra en dirección longitudinal se puede ajustar de forma sencilla el tamaño de la hendidura y, por tanto, el área de corte transversal de la abertura de la tobera, por lo que se puede regular de forma sencilla la velocidad de la introducción del vapor.

Normalmente, estos dispositivos además presentan un tubo de mezclado en el que se transporta la suspensión después de la introducción del vapor y se extrae del dispositivo. Este tubo de transporte está dispuesto, habitualmente, en dirección de la introducción del vapor y en perpendicular con respecto a la alimentación. El tubo de mezclado forma normalmente con la tobera una hendidura, a través de la cual se transporta la suspensión. A través de esta hendidura actúan durante el transporte fuerzas adicionales de cizalla sobre la suspensión y aumenta, por tanto, la aportación de energía mecánica a la suspensión. El tubo de mezclado puede estar dispuesto de forma desplazable en dirección longitudinal. Gracias al desplazamiento del tubo de mezclado se puede ajustar de forma sencilla el tamaño de la abertura de la hendidura y, por tanto, el gradiente de presión en el dispositivo.

Tales dispositivos son conocidos con la denominación cocedores de chorro por el estado de la técnica, por ejemplo, el dispositivo representado en "The Alcohol Textbook", capítulo 2, en el lugar citado, Figura 13 y están disponibles en el mercado, por ejemplo con la denominación HYDROHEATER® de la empresa Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, EE.UU.

Con una conducción continua de la reacción, la suspensión tratada con vapor de agua por norma general después de esto se traspa a una zona de reacción posterior, para continuar la gelificación de los constituyentes de almidón. En la zona de reacción posterior normalmente existe sobrepresión, normalmente una presión absoluta en el intervalo de 0,2 a 0,8 MPa (2 a 8 bar). Las temperaturas en la zona de reacción posterior se encuentran, normalmente, en el intervalo de 90 a 150 °C. El tiempo de permanencia en esta zona de reacción posterior, dependiendo de la temperatura de la suspensión, puede encontrarse en el intervalo de 1 min a 4 h. Las zonas de reacción posterior presentan normalmente una geometría tubular o con forma de columna. En una forma de realización, la zona de reacción posterior presenta la geometría de una columna dispuesta perpendicularmente. En este caso, la suspensión después de abandonar el dispositivo para el tratamiento con vapor se aplica en la zona superior de la columna y se extrae por la zona inferior. En otra forma de realización, la zona de reacción posterior presenta una geometría tubular.

Después de abandonar la zona de reacción posterior, por norma general se relaja la suspensión y entonces se lleva a cabo una licuefacción. Preferentemente se lleva a cabo la relajación como evaporación instantánea para refrigerar la suspensión, preferentemente a temperaturas por debajo de 100 °C, en particular por debajo de 85 °C. Por norma general se realiza entonces una licuefacción del almidón disgregado de este modo en un recipiente de reacción independiente. La licuefacción se puede llevar a cabo de la forma que se ha descrito anteriormente.

En una forma de realización preferente se añade al menos una parte o la cantidad total, por norma general al menos el 50 %, en particular al menos el 80 % de la cantidad total o la cantidad total de la enzima que licua el almidón antes del calentamiento con vapor de agua a la suspensión del producto molido en el líquido acuoso. De este modo se realiza la licuefacción ya durante el calentamiento a temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización. El calentamiento con vapor de agua y la fase de reacción posterior se llevan a cabo correspondientemente. Se puede prescindir de una licuefacción posterior en un recipiente de reacción independiente. Sin embargo, preferentemente se llevará a cabo una licuefacción de este tipo para completar la degradación del almidón hasta dar dextrinas.

Para la estabilización de las enzimas empleadas se puede ajustar, dado el caso, la concentración de iones Ca^{2+} , por ejemplo, con $CaCl_2$, hasta un valor óptimo específico de enzima. Se pueden determinar por el experto en experimentos rutinarios valores adecuados de concentración. Si se emplea, por ejemplo, Termamyl como α -amilasa,

entonces es ventajoso ajustar una concentración de Ca^{2+} de, por ejemplo, 10 a 100 ppm, preferentemente de 20 a 80 ppm y de forma particularmente preferente de aproximadamente 30 a 70 ppm en el medio líquido, siendo la indicación ppm en relación con el peso y significando g/1000 kg.

5 Para la degradación completa del almidón hasta dar dextrinas, la mezcla de reacción se mantiene a la temperatura ajustada hasta que la comprobación de almidón con yodo o, dado el caso, otro ensayo para la comprobación de almidón resulte negativo o al menos sustancialmente negativo. En este caso dado el caso se pueden añadir todavía una o varias cantidades parciales adicionales de α -amilasa, por ejemplo en el intervalo del 0,001 al 0,5 % en peso y preferentemente del 0,002 al 0,2 % en peso, en relación con la cantidad total de la fuente empleada de almidón, a la mezcla de reacción.

10 De este modo se obtiene un hidrolizado acuoso de almidón que contiene la parte de almidón licuada del producto molido, normalmente dextrinas y dado el caso otros oligosacáridos y mono- o disacáridos, así como los constituyentes que no contienen almidón del producto molido, en particular los constituyentes sólidos que no contienen almidón del producto molido empleado para la licuefacción.

15 Después de la licuefacción terminada del almidón se puede llevar a cabo, de forma en sí conocida, de forma continua o discontinua una sacarificación de las dextrinas contenidas en el medio líquido, es decir, su degradación hasta dar glucosa. El medio licuado se puede sacarificar por completo en un tanque de sacarificación especial antes de que se suministre, por ejemplo, a una posterior etapa de fermentación.

20 En una primera forma de realización, antes de la posterior fermentación se lleva a cabo solo una sacarificación parcial. Por ejemplo, se puede proceder de tal manera que se sacrifica una cantidad parcial de las dextrinas contenidas en el medio líquido, por ejemplo en el intervalo del 10 al 90 % en peso y en particular en el intervalo del 20 al 80 % en peso, en relación con el peso total de las dextrinas (o del almidón original) y se emplea el medio líquido que contiene azúcar resultante en la fermentación. En el medio de fermentación entonces se puede realizar una sacarificación adicional *in situ*. La sacarificación, además, se puede llevar a cabo prescindiendo de un tanque independiente de sacarificación directamente en el fermentador (*in situ*).

25 Las ventajas de la sacarificación *in situ*, es decir, una sacarificación que se realiza parcial o completamente en el fermentador, por un lado son costes reducidos de inversión, por otro lado mediante una liberación retardada de la glucosa dado el caso se puede disponer una mayor concentración de glucosa en la preparación (lote), sin que aparezca una inhibición o cambio metabólico de los microorganismos empleados. En caso de *E. coli* una concentración de glucosa demasiado alta, por ejemplo, conduce a la formación de ácidos orgánicos (acetato), mientras que *Saccharomyces cerevisiae* en este caso, por ejemplo, cambia a fermentación anaerobia a pesar de que en fermentadores aireados está presente suficiente oxígeno (efecto de Crabtree). Se puede ajustar una liberación retardada de glucosa mediante la regulación de la concentración de glucoamilasa. Por ello se pueden reprimir los efectos que se han mencionado anteriormente y se puede disponer más sustrato, de tal manera que se puede reducir la dilución resultante de la corriente de alimentación suministrada.

35 La sacarificación de las dextrinas (es decir, oligosacáridos) en la solución licuada de almidón se realiza por vía enzimática, es decir, con ayuda de al menos una enzima que sacrifica las dextrinas. Para esto se pueden emplear básicamente todas las glucoamilasas (clase de enzima EC 3.2.1.3), en particular glucoamilasas, que se han obtenido de *Aspergillus* y especialmente las que se usan para la sacarificación de materiales obtenidos mediante procedimientos de molienda en seco en el marco de la preparación de bioetanol. Las glucoamilasas adecuadas para la sacarificación también están disponibles en el mercado, por ejemplo en Novozymes con la denominación Dextrozyme GA; o en Genencor con la denominación Optidex. Se puede usar también una combinación de distintas glucoamilasas.

45 La al menos una enzima de sacarificación, en particular al menos una glucoamilasa, se añade al medio líquido que contiene dextrina obtenido después de la licuefacción habitualmente en una cantidad del 0,001 al 5,0 % en peso, preferentemente del 0,005 al 3,0 % en peso y de forma particularmente preferente del 0,01 al 1,0 % en peso en relación con la cantidad total de la fuente empleada de almidón.

50 Siempre que se lleve a cabo la sacarificación en el fermentador, se refrigerará la solución licuada de almidón por norma general a temperatura de fermentación, es decir, de 32 a 37 °C antes de que se suministre al fermentador. La glucoamilasa (o la al menos una enzima de sacarificación) para la sacarificación en este caso se añade directamente al caldo de fermentación. La sacarificación del almidón licuado de acuerdo con la etapa a2) se realiza, en este caso, en paralelo con respecto a la metabolización del azúcar por los microorganismos.

En el caso de la sacarificación en un tanque de sacarificación, la solución licuada de almidón se enfría o atempera habitualmente al óptimo de temperatura de la enzima de sacarificación o ligeramente por debajo, por ejemplo a 50 a 70 °C, preferentemente de 60 a 65 °C, y a continuación se mezcla con glucoamilasa.

55 Ventajosamente, antes de la adición de la enzima de sacarificación, en particular de la glucoamilasa, el valor de pH del medio líquido se ajusta a un valor en el intervalo de acción óptimo de la glucoamilasa empleada, preferentemente en el intervalo entre 3,5 y 6,0; de forma particularmente preferente entre 4,0 y 5,5 y de forma muy particularmente preferente entre 4,0 y 5,0. Sin embargo, también es posible ajustar, en particular al llevar a cabo la

- 5 sacarificación directamente en el fermentador, el valor de pH fuera de los intervalos que se han mencionado anteriormente, por ejemplo, en el intervalo de más de 6,0 a 8,0. Esto puede ser necesario, por ejemplo, en caso de la preparación fermentativa de lisina, pantotenato y vitamina B₂ a pesar de la actividad limitada de glucoamilasas convencionales en este intervalo de pH en total de forma ventajosa o a causa de las condiciones de fermentación a ajustar.
- En una forma de realización preferente se realiza la sacarificación en un tanque especial de sacarificación. Para esto, la solución licuada de almidón se atempera a una temperatura óptima para la enzima o ligeramente por debajo y se ajusta el valor de pH de la forma que se ha descrito anteriormente a un valor óptimo para la enzima.
- 10 Después de la adición de la enzima de sacarificación, la suspensión que contiene dextrina se mantiene preferentemente durante un periodo de tiempo de, por ejemplo, 2 a 72 horas o más, en caso necesario, en particular de 5 a 48 horas a la temperatura ajustada, sacarificándose las dextrinas hasta dar monosacáridos. El avance de la sacarificación se puede seguir con procedimientos conocidos por el experto, por ejemplo HPLC, ensayos enzimáticos o tiras de ensayo de glucosa. La sacarificación ha terminado cuando la concentración de los monosacáridos ya no aumenta sustancialmente o vuelve a caer.
- 15 Ya que para la preparación del medio líquido (1) que contiene azúcar se emplea por norma general producto molido que contiene al menos una parte o todos los constituyentes de la fuente de almidón (es decir, una separación de los constituyentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón no se efectúa o no por completo) el medio líquido (1) obtenido comprende también una parte o todos los constituyentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón. Esto con frecuencia causa la introducción de una parte no despreciable de fitato, por ejemplo de la cariópside. Para evitar el efecto inhibitorio resultante a partir de esto, se añade ventajosamente en la etapa a2) al medio líquido al menos una fitasa antes de que el medio líquido que contiene azúcar se suministre a una etapa de fermentación.
- 20 La adición de la fitasa se puede realizar antes, durante o después de la licuefacción o la sacarificación, siempre que presente la estabilidad térmica respectivamente requerida.
- 25 Se pueden emplear fitasas discrecionales, siempre que su actividad en las condiciones de reacción respectivamente esté limitada como mucho de forma no esencial. Se prefieren fitasas con una estabilidad a temperatura (T₅₀) > 50 °C y de forma particularmente preferente > 60 °C.
- La cantidad de fitasa habitualmente es de 1 a 10000 unidades/kg de fuente de almidón y, en particular, de 10 a 4000 unidades/kg de fuente de almidón.
- 30 Para aumentar el rendimiento total de azúcar o para la obtención de aminoácidos libres se pueden añadir a la mezcla de reacción durante la preparación del medio líquido que contiene azúcar además otras enzimas, por ejemplo, pululanasa, celulasas, hemicelulasas, glucanasas, xilanasas, glucosidasas o proteasas. La adición de estas enzimas puede influir positivamente en la viscosidad, es decir, reducirla (por ejemplo, mediante escisión de glucanos de cadena larga (también denominadas como de cadena más larga) y/o de (arabino-)xilanos), que causan la liberación de glucósidos metabolizables y la liberación de almidón (residual). El empleo de proteasas tienen efectos positivos análogos, pudiéndose liberar adicionalmente aminoácidos como factores de crecimiento para la fermentación.
- 35 Mediante la aplicación descrita en el presente documento de las etapas a1) y a2) se prepara, dependiendo de si se ha llevado a cabo o no una sacarificación, un medio líquido que contiene dextrina o mono- o disacárido con una concentración total de mono-, di- y/u oligosacáridos en los intervalos que se han mencionado anteriormente.
- 40 En el caso de los azúcares contenidos en el medio líquido (1) después de la sacarificación se trata, en particular, de glucosa, pudiendo estar contenidos también otros monosacáridos tales como hexosas y pentosas distintas de la glucosa, por ejemplo, fructosa, manosa, galactosa, sorbosa, xilosa, arabinosa y ribosa. La parte de monosacáridos distintos de la glucosa puede variar dependiendo de la fuente de almidón usada y de los constituyentes que no contienen almidón contenidos en la misma y se puede influir en la misma mediante la conducción del procedimiento, por ejemplo mediante disgregación de constituyentes de celulosa mediante adición de celulasas. Ventajosamente, los monosacáridos del medio líquido que contiene azúcar comprenden una parte de glucosa de al menos el 60 % en peso, frecuentemente al menos el 70 % en peso, en particular al menos el 80 % en peso y especialmente al menos el 85 % en peso en relación con la cantidad de azúcar total contenida en el medio líquido que contiene azúcar.
- 45 Habitualmente, la parte de glucosa se encuentra en el intervalo del 75 al 99,9 % en peso, en particular del 80 al 99 % en peso y especialmente del 85 al 97 % en peso en relación con la cantidad de azúcar total contenida en el medio líquido que contiene azúcar. Siempre que no se haya llevado a cabo una sacarificación, la parte de dextrinas en los mono-, di- y oligosacáridos contenidos en el medio (1) se corresponde esencialmente con la parte de glucosa.
- 50 Siempre que no se haya llevado a cabo una sacarificación, los equivalentes de glucosa metabolizables están presentes esencialmente en forma de oligosacáridos, en particular dextrinas. El constituyente principal de estos oligosacáridos o dextrinas normalmente es glucosa, pudiendo contener el medio también reducidas cantidades de mono- y/o disacáridos y unidades de oligosacáridos estructuradas a partir de otras unidades de monosacáridos. Normalmente, los constituyentes que contienen azúcar en el medio líquido (1), es decir, los mono-, di- y
- 55

- oligosacáridos, entonces comprenden una parte de oligosacáridos, en particular dextrinas, de al menos el 60 % en peso, frecuentemente al menos el 70 % en peso, en particular al menos el 80 % en peso, especialmente al menos el 90 % en peso, es decir, la parte de mono- y disacáridos es menos del 40 % en peso, frecuentemente menos del 30 % en peso, en particular menos del 20 % en peso y especialmente menos del 10 % en peso. Habitualmente, la parte de glucosa, en forma libre o unida, entre los equivalentes de glucosa del medio (1) se encuentra en el intervalo del 50 al 99 % en peso, en particular del 75 al 97 % en peso y especialmente del 80 al 95 % en peso en relación con la cantidad total de equivalentes de glucosa.
- De acuerdo con la invención se realiza la posterior fermentación tanto mediante el uso del medio líquido (1) como de una fuente distinta de esto de mono-, di y/u oligosacáridos metabolizables (en lo sucesivo también fuente de azúcar). Los mono-, di- y/u oligosacáridos usados para esto se pueden emplear como tales o en forma de una composición que contiene los mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso, preferentemente en una concentración de al menos el 60 % en peso con respecto al peso total del medio y que, a diferencia del medio líquido (1) acuoso, esencialmente está exenta de sólidos insolubles en agua.
- Los mono-, di- u oligosacáridos contenidos en la fuente de azúcar preferentemente están seleccionados entre monosacáridos que, por norma general, son hexosas y/o pentosas, por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sorbosa, xilosa, arabinosa y ribosa, especialmente de glucosa, fructosa y galactosa, y disacáridos tales como sacarosa, maltosa, lactosa, especialmente sacarosa. También son adecuadas mezclas de monosacáridos y disacáridos así como oligosacáridos con una elevada parte de glucosa incluida y sus mezclas con monosacáridos y/o disacáridos. Los ejemplos de composiciones que contienen mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso y que esencialmente están exentas de sólidos insolubles en agua comprenden sirope de glucosa, sirope de sacarosa, jugos densos, sirope de maltosa, sirope de dextrina, pero también productos de desecho de la producción de azúcar (melazas), en particular melazas de la producción de azúcar de remolacha así como melazas de la producción de azúcar de caña.
- Se prefieren en particular sustancias que contienen sobre todo mono- y/o disacáridos, en particular glucosa y/o sacarosa, así como mezclas que contienen glucosa y/o sacarosa y oligosacáridos con una elevada parte de glucosa incluida, por ejemplo, glucosa, sacarosa, sirope de glucosa, sirope de sacarosa, jugos densos y melazas.
- Los mono-, di- y/u oligosacáridos o las composiciones que contienen los mismos se pueden emplear, al igual que el medio líquido (1), tanto para la preparación del medio de fermentación (fase de lote) como para la alimentación durante la fermentación cuando la misma se lleva a cabo como lote alimentado o de forma semicontinua.
- La cantidad total introducida mediante adición del medio líquido (1) a la fermentación de mono-, di- y/u oligosacáridos asciende, preferentemente, al menos al 40 % en peso, en particular al menos al 50 % en peso, de forma particularmente preferente al menos al 60 % en peso, por ejemplo del 40 al 95 % en peso, en particular del 50 al 90 % en peso y especialmente del 60 al 90 % en peso de la cantidad total de los mono-, di- y oligosacáridos introducidos en la fermentación.
- El medio líquido (1) y los mono-, di- y/o oligosacáridos o las composiciones que contienen los mismos se pueden suministrar por separado unos de otros o conjuntamente a la fermentación.
- De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, el medio líquido (1) y los mono-, di- y/u oligosacáridos o la composición que contiene los mismos antes de la adición a la fermentación se mezclan entre sí. De este modo, con empleo de un medio líquido de concentración baja, que por norma general presenta una concentración total de mono-, di- y oligosacáridos de 100 a 400 g/kg, el contenido total de azúcar del medio líquido (1) que contiene azúcar obtenido después de las etapas a1) y a2) se aumenta y, de hecho, al menos 50 g/kg, en particular al menos 100 g/kg, especialmente al menos 150 g/kg, por ejemplo de 50 a 300 g/kg, en particular de 100 a 250 g/kg y especialmente de 120 a 200 g/kg a más del 40 % en peso, preferentemente a al menos el 45 % en peso, en particular a al menos el 50 % en peso y, de forma particularmente preferente, a al menos el 55 % en peso en relación con el peso total.
- Después de la adición de estas fuentes de azúcar al medio líquido (1), el medio líquido resultante presenta preferentemente un contenido de masa seca en el intervalo del 45 al 80 % en peso y, de forma particularmente preferente, en el intervalo del 50 al 75 % en peso o del 55 al 75 % en peso en relación con el peso total. En este caso es ventajoso regular la viscosidad del medio líquido (1), por ejemplo mediante ajuste de la temperatura, de tal manera que no se superen valores de como máximo 20 Pas, de forma particularmente preferente como máximo 15 Pas y de forma muy particularmente preferente como máximo 8 Pas.
- En una forma de realización preferente de la invención, los mono- y/o disacáridos se añaden en forma de un producto secundario que contiene glucosa o sacarosa de la preparación de azúcar al primer medio líquido (1). Son ejemplo de esto las melazas que se producen durante la producción de azúcar a partir de azúcar de caña o, en particular, de remolacha.
- De acuerdo con la invención, el medio líquido (1) preparado en las etapas a1) y a2) y las fuentes de azúcar distintas de esto se suministran a una fermentación, donde sirven para el cultivo de los microorganismos. En la fermentación se producen los productos metabólicos microbianos por los microorganismos.

La realización de la fermentación se puede realizar de la forma habitual conocida por el experto. Para esto, por norma general se cultivará el microorganismo respectivamente deseado en el medio líquido obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento.

5 El procedimiento de fermentación se puede efectuar de forma tanto discontinua (forma de proceder por lotes) como semicontinua (forma de proceder por lotes alimentados, incluyendo lote alimentado con recogidas intermedias), prefiriéndose la forma de proceder semicontinua.

10 Por ejemplo, el medio líquido (1) obtenido según el procedimiento de acuerdo con la invención o 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 el 50 % en peso y que normalmente está esencialmente exenta de sólidos insolubles en agua o su mezcla, dado el caso después de la dilución con agua y adición de constituyentes de medios habituales tales como tampones, sales nutrientes, fuentes de nitrógeno tales como sulfato de amonio, urea, etc., constituyentes de medios nutrientes complejos que contienen aminoácidos, tales como extractos de levadura, peptona, LCR y similares, se puede inocular con el microorganismo deseado y multiplicar el mismo en condiciones de fermentación hasta que la concentración de microorganismos alcance el estado estacionario deseado para la fermentación. En este caso, el azúcar normalmente el medio líquido (1) se metaboliza y se forma el producto metabólico deseado (la denominada forma de proceder por lotes o fase de lotes).

20 En la forma de proceder por lotes alimentados, entonces, mediante suministro de más medio líquido (1) obtenible según el procedimiento de acuerdo con la invención y de la fuente de azúcar distinta de esto, en particular mediante suministro del medio líquido obtenido mediante mezcla del medio líquido (1) con la fuente de azúcar distinta de esto el proceso de fermentación se continua y el producto metabólico producido en exceso por el microorganismo se acumula en el caldo de fermentación, pudiendo existir el producto metabólico tanto en las células del microorganismo como en la fase acuosa del medio de fermentación.

25 Preferentemente se llevará a cabo la fermentación de forma semicontinua, es decir, como lote alimentado. A este respecto se procederá de tal manera que se multiplica el microorganismo en primer lugar mediante el uso de un medio líquido que contiene azúcar, por ejemplo mediante el uso de un medio líquido (1) u otra fuente de azúcar, hasta que se haya conseguido la concentración deseada de microorganismos en el fermentador. A continuación, el medio líquido (1) junto con la otra fuente de azúcar, es decir, mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables o un medio que contiene mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso y que está esencialmente exenta de sólidos insolubles en agua, se suministra al fermentador. Por ello se mantiene el proceso de fermentación y el producto metabólico producido en exceso por el microorganismo se acumula en el caldo de fermentación (véase anteriormente). A este respecto, la proporción de volumen de medio líquido (1) que contiene azúcar suministrado y la otra fuente de azúcar en relación con el medio de lote dispuesto y que contiene los microorganismos, generalmente se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1:10 a 10:1 y, preferentemente, en aproximadamente 1:5 a 5:1 y especialmente en el intervalo de 1:1 a 5:1. En particular a través de la velocidad de suministro del medio líquido que contiene azúcar se puede regular el contenido de azúcar en el caldo de fermentación. Por norma general se ajustará la velocidad de suministro de tal manera que el contenido de monosacáridos en el caldo de fermentación se encuentre en el intervalo de > 0 % en peso a aproximadamente el 5 % en peso y en particular no supere un valor del 3 % en peso.

40 El medio líquido obtenido en la etapa a2) que contiene azúcar o su mezcla con la otra fuente de azúcar se puede esterilizar dado el caso antes de la fermentación, destruyendo los microorganismos habitualmente mediante procedimientos térmicos o químicos. Para esto se calienta el medio líquido que contiene azúcar habitualmente a temperaturas por encima de 80 °C. La destrucción o la lisis de las células se puede realizar directamente antes de la fermentación. Para esto, todo el medio líquido que contiene azúcar se suministra a la lisis o a la destrucción. Esto se puede realizar de forma térmica, mecánica o química.

45 El experto entiende que la lisina preparada por vía fermentativa se obtiene, respectivamente, en la forma enantiomérica producida por los microorganismos empleados. De este modo, por norma general se obtiene el enantiómero L de la lisina.

50 Los microorganismos empleados en la fermentación pueden ser de origen natural o estar modificados genéticamente. Son ejemplos de microorganismos adecuados y procedimientos de fermentación, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* y los procedimientos descritos por Ikeda (véase: Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003) Adv. Blochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35).

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

En una forma de realización preferente, en el caso del microorganismo empleado en la fermentación se trata de una cepa del género *Corynebacterium*, en particular de una cepa de *Corynebacterium glutamicum*. En particular, se trata de una cepa del género *Corynebacterium*, especialmente de *Corynebacterium glutamicum* que produce la lisina en exceso.

- 5 En otra forma de realización preferente, en el caso del microorganismo empleado en la fermentación se trata de una cepa del género *Escherichia*, en particular de una cepa de *Escherichia coli*. En particular, se trata de una cepa del género *Escherichia*, especialmente de *Escherichia coli* que produce la lisina en exceso.

De acuerdo con la invención, en el caso del producto metabólico producido por los microorganismos en la fermentación se trata de lisina. Para llevar a cabo la fermentación, en este caso se pueden aplicar condiciones y formas de proceder análogas a las que se han descrito para otras fuentes de carbono, por ejemplo en Pfefferle y col., en el lugar citado, y el documento US 3.708.395. En principio se considera una forma de funcionamiento tanto continua como discontinua (lote o lote alimentado), se prefiere una forma de proceder por lote alimentado.

En la fermentación resulta un caldo de fermentación que, además del producto metabólico microbiano deseado, por norma general lisina, contiene esencialmente la biomasa generada durante la fermentación, los constituyentes no metabolizados de la solución sacarificada de almidón y, en particular, los constituyentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón tales como, por ejemplo, fibras y azúcares no utilizados así como tampón y sales de nutrientes no utilizados. Este medio líquido se denomina en la presente solicitud también caldo de fermentación, comprendiendo la expresión caldo de fermentación también el medio líquido (que contiene azúcar), en el que se ha realizado una reacción fermentativa primero parcial o incompleta de los azúcares contenidos en el mismo, es decir, una metabolización microbiana parcial o incompleta del azúcar utilizable (por ejemplo, mono- y disacáridos).

Antes del aislamiento o de la reducción de la concentración del producto metabólico microbiano, por norma general la lisina, o separación de los constituyentes volátiles del caldo de fermentación se lleva a cabo dado el caso una etapa de esterilización de la forma que se ha descrito anteriormente.

Una forma de realización especial de la invención se refiere a un procedimiento en el que se reduce la concentración o aísla el producto metabólico microbiano, por norma general lisina, del caldo de fermentación. Los constituyentes volátiles del caldo de fermentación a continuación se retiran sustancialmente, obteniéndose una composición proteica sólida o semisólida. Una descripción más detallada en relación con la realización de un procedimiento de este tipo y la composición proteica obtenida a este respecto es objeto del documento WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) del solicitante.

El aislamiento o la reducción de la concentración del producto metabólico, por norma general la lisina, del caldo de fermentación se realiza por norma general de tal manera que se reduce la concentración o aísla al menos un producto metabólico de tal manera del caldo de fermentación, que el contenido de este producto metabólico en el caldo de fermentación restante asciende a como mucho el 20 % en peso, en particular como mucho al 10 % en peso, especialmente como mucho al 5 % en peso y muy especialmente como mucho al 2,5 % en peso, respectivamente en relación con el peso total del caldo de fermentación restante.

El aislamiento o la reducción de la concentración del producto metabólico microbiano, por norma general la lisina, del caldo de fermentación se puede realizar en una o varias etapas. A este respecto es una etapa esencial la separación de los constituyentes sólidos del caldo de fermentación. Esto se puede llevar a cabo antes o después del aislamiento del producto de valor. Tanto para el aislamiento de sustancias de valor como para la separación de sustancias sólidas, es decir, la separación de fases sólido-líquido en el campo técnico son conocidos procedimientos habituales que comprenden también etapas para la purificación general y final de las sustancias de valor así como para la confección (por ejemplo, descrito en Belter, P. A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988) y Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5ª ed. en CD-ROM, Wiley-VCH).

Para el aislamiento del producto de valor, por norma general la lisina, de forma ventajosa se puede proceder de tal manera que se retiran en primer lugar los constituyentes sólidos del caldo de fermentación, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración y se aísla a continuación el producto de valor de la fase líquida, por ejemplo mediante cristalización, precipitación o adsorción. Como alternativa se puede aislar el producto de valor también directamente del caldo de fermentación, por ejemplo mediante empleo de procedimientos cromatográficos o procedimientos de extracción. Como procedimiento cromatográfico se ha de mencionar, en particular, la cromatografía de intercambio iónico, en la que se puede aislar el producto de valor selectivamente en la columna de cromatografía. En este caso se realiza la separación de los sólidos del caldo de fermentación restante de forma ventajosa, por ejemplo, mediante decantación, concentración por evaporación y/o secado.

Otra forma de realización especial se refiere a un procedimiento en el que se retiran esencialmente o por completo los constituyentes volátiles del caldo de fermentación sin aislamiento o reducción previa de la concentración de la lisina y dado el caso sin separación previa de constituyentes sólidos, obteniéndose una formulación sólida de la lisina. Se encuentra una descripción más detallada para llevar a cabo un procedimiento de este tipo en el documento PCT/EP2006/066057 (solicitud de patente anterior DE 102005042541.0) del solicitante.

Esencialmente significa que después de la retirada de los constituyentes volátiles queda un residuo sólido o al menos semisólido que se puede convertir dado el caso mediante adición de sólidos en un producto sólido. Por norma general, esto significa que los constituyentes volátiles se retiran hasta un contenido de humedad residual de no más del 30 % en peso, frecuentemente no más del 20 % en peso y en particular no más del 15 % en peso. Por norma general se retiran los constituyentes volátiles del caldo de fermentación ventajosamente hasta un contenido de humedad residual en el intervalo del 0,2 al 30 % en peso, preferentemente del 1 al 20 % en peso, de forma particularmente preferente del 2 al 5 % en peso y de forma muy particularmente preferente del 5 al 15 % en peso, en relación con el peso total establecido después del secado de los constituyentes sólidos, del caldo de fermentación. Se puede determinar el contenido de humedad residual mediante procedimientos habituales conocidos por el experto, por ejemplo, mediante termogravimetría (Hemminger y col., Methoden der thermischen Analyse, Springer Verlag, Berlín, Heidelberg, 1989).

La obtención de la lisina en forma sólida del caldo de fermentación se puede realizar en uno, dos o varios pasos, en particular en una forma de proceder de uno o dos pasos. Por norma general, al menos un paso, en particular el final, para la obtención de la lisina en forma sólida comprenderá una etapa de secado.

Con la forma de proceder de un paso se retirarán los constituyentes volátiles del caldo de fermentación, dado el caso después de la separación previa que se ha mencionado anteriormente, hasta que se haya alcanzado el contenido deseado de humedad residual.

En la forma de proceder de dos o varios pasos, en primer lugar se concentrará el caldo de fermentación, por ejemplo, mediante (micro-, ultra-) filtración o térmicamente mediante evaporación de una parte de los constituyentes volátiles. La parte de los constituyentes volátiles que se retiran en este paso es, por norma general, del 10 al 80 % en peso y en particular del 20 al 70 % en peso en relación con el peso total de los constituyentes volátiles del caldo de fermentación. En uno o varios pasos posteriores se retiran los restantes constituyentes volátiles del caldo de fermentación hasta que se haya alcanzado el contenido deseado de humedad residual.

La retirada de los constituyentes volátiles del medio líquido se realiza de acuerdo con esta forma de realización esencialmente sin una reducción previa de la concentración o incluso aislamiento del producto de valor. Por consiguiente, al retirar los constituyentes volátiles del caldo de fermentación, la lisina esencialmente no se retira junto con los constituyentes volátiles del medio líquido, sino que permanece con al menos una parte, habitualmente con la cantidad principal y en particular con la cantidad total de los restantes constituyentes sólidos del caldo de fragmentación en el residuo obtenido de este modo. Por consiguiente, se pueden retirar sin embargo también partes —preferentemente reducidas— de la lisina, por norma general como máximo el 20 % en peso, por ejemplo, del 0,1 al 20 % en peso, preferentemente no más del 10, en particular no más del 5 % en peso, de forma particularmente preferente como máximo el 2,5 % en peso y de forma muy particularmente preferente como máximo el 1 % en peso en relación con el peso seco total de la lisina al retirar los constituyentes volátiles del caldo de fermentación junto con los mismos. En una forma de realización muy particularmente preferente permanece la lisina en hasta al menos el 90 % en peso, en particular al menos el 95 % en peso, especialmente el 99 % en peso y muy especialmente aproximadamente el 100 % en peso, respectivamente en relación con el peso seco total de la lisina, como sólido en mezcla con la parte obtenida después de la retirada de los constituyentes volátiles o la totalidad de los constituyentes volátiles del medio de fermentación.

En caso de que se desee, antes de la retirada de los constituyentes volátiles se puede separar una parte, por ejemplo, del 5 al 80 % en peso y en particular del 30 al 70 % en peso de los constituyentes sólidos que no contienen almidón del caldo de fermentación, por ejemplo mediante centrifugación o filtración. Dado el caso se llevará a cabo una separación previa de este tipo para retirar partículas sólidas más gruesas, que no contiene lisina o solo partes reducidas. Para la filtración previa se pueden aplicar procedimientos habituales conocidos por el experto, por ejemplo, mediante el uso de tamices de malla gruesa, redes, chapas perforadas o similares. Dado el caso se puede realizar una separación de partículas sólidas gruesas también en un separador de fuerza centrífuga. Los aparatos empleados en este caso, tales como decantadores, centrífugas, sedicanter y separadores asimismo son conocidos por el experto. De este modo se obtiene un residuo sólido o semisólido, por ejemplo pastoso, que contiene la lisina y los constituyentes no volátiles, por norma general sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón o al menos grandes partes de los mismos, frecuentemente al menos el 90 % en peso o la cantidad total de los constituyentes sólidos que no contiene almidón.

Mediante adición de coadyuvantes de formulación tales como materiales de soporte y revestimiento, aglutinantes así como otros aditivos se pueden confeccionar las propiedades de la lisina seca y existente junto con los constituyentes sólidos de la fermentación de forma dirigida en relación con distintos parámetros, tales como contenido de principio activo, tamaño de grano, forma de partícula, tendencia a la formación de polvo, higroscopía, estabilidad, en particular estabilidad en almacenamiento, color, olor, comportamiento de flujo, tendencia a la aglomeración, carga electrostática, sensibilidad a luz y temperatura, estabilidad mecánica y redispersabilidad de forma en sí conocida.

A los coadyuvantes de formulación usados habitualmente pertenecen, por ejemplo, aglutinantes, materiales de soporte, coadyuvantes de espolvoreo/flujo, además pigmentos de color, biocidas, dispersantes, antiespumantes, agentes reguladores de la viscosidad, ácidos, lejías, antioxidantes, estabilizantes de enzimas, inhibidores de enzimas, adsorbatos, grasas, ácidos grasos, aceites o mezclas de los mismos. Tales coadyuvantes de formulación

se emplean ventajosamente, en particular, con aplicación de procedimientos de formulación y secado tales como secado por pulverización, lecho fluidizado y liofilización como coadyuvantes de secado. En relación con otros detalles se hace referencia al documento PCT/EP2006/066057 (solicitud anterior DE 102005042541.0).

5 La parte de los aditivos que se han mencionado anteriormente y dado el caso otros aditivos, tales como materiales de revestimiento, puede variar intensamente según los requisitos de la lisina así como dependiendo de las propiedades de los aditivos empleados y encontrarse, por ejemplo, en el intervalo del 0,1 al 80 % en peso y en particular en el intervalo del 1 al 30 % en peso, respectivamente en relación con el peso total del producto terminado de formular o mezcla de sustancias.

10 La adición de coadyuvantes de formulación se puede realizar antes, durante o después del tratamiento del caldo de fermentación (denominado también formulación de producto o diseño de sólido) y, en particular, durante el secado. Una adición de coadyuvantes de formulación antes del tratamiento del caldo de fermentación o de la lisina puede ser particularmente ventajosa para mejorar la procesabilidad de las sustancias o los productos a tratar. Los coadyuvantes de formulación se pueden añadir tanto a la lisina obtenida en forma sólida como a una solución o suspensión que contiene la lisina, por ejemplo, después de la fermentación terminada directamente al caldo de fermentación o a una solución o suspensión obtenida en el transcurso del tratamiento antes de la etapa final de secado.

15 De este modo se pueden introducir mediante mezcla los coadyuvantes, por ejemplo, en una suspensión de la lisina; una suspensión de este tipo se puede poner también sobre un material de soporte, por ejemplo, mediante pulverización o entremezclado. La adición de coadyuvantes de formulación durante el secado puede desempeñar, por ejemplo, un papel cuando se pulveriza una solución o suspensión que contiene la lisina. En particular después del secado se realiza una adición de coadyuvantes de formulación, por ejemplo, con la aplicación de recubrimientos o revestimientos/capas de revestimiento sobre partículas secas. Tanto después del secado como después de una eventual etapa de revestimiento se pueden añadir otros coadyuvantes al producto.

25 La retirada de los constituyentes volátiles del caldo de fermentación se realiza de forma en sí conocida mediante procedimientos habituales para la separación de fases sólidas de fases líquidas, incluyendo procedimientos de filtración y procedimientos para la evaporación de constituyentes volátiles de las fases líquidas. Tales procedimientos, que pueden comprender también etapas para la purificación gruesa de las sustancias del valor así como etapas para la confección, se describen, por ejemplo, en Belter, P. A, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons (1988) y *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5ª ed. en CD-ROM, Wiley-VCH. Los procedimientos, aparatos, coadyuvantes conocidos por el experto o formas de realización generales y especiales, aplicable en el marco de la formulación de producto o el tratamiento después de la fermentación finalizada, se describen además en los documentos 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.

30 En una primera variante de esta forma de realización se pasará la lisina, siempre que esté presente disuelta en la fase líquida, desde la fase líquida a la fase sólida, por ejemplo, mediante cristalización o precipitación. A continuación se realiza una separación de los constituyentes sólidos no volátiles incluyendo la lisina, por ejemplo, mediante centrifugación, decantación o filtración.

35 En una segunda variante de esta forma de realización se retiran los constituyentes volátiles mediante evaporación. La evaporación se puede realizar de forma en sí conocida. Son ejemplos de procedimientos adecuados para la evaporación de constituyentes volátiles el secado por pulverización, secado o aglomeración en lecho fluidizado, liofilización, secadores de flujo y contacto así como secado por extrusión. Se puede efectuar también una combinación de los procedimientos que se han mencionado anteriormente con procedimientos de conformado tales como extrusión, formación de pellas o granulación. En esos procedimientos mencionados en último lugar se emplean, preferentemente, mezclas de sustancias que contienen lisina parcial o esencialmente pre-secadas.

40 En una forma de realización preferente, la retirada de los constituyentes volátiles del caldo de fermentación comprende un procedimiento para el secado por pulverización o un procedimiento de secado en lecho fluidizado, incluyendo la granulación en lecho fluidizado. Para esto, el caldo de fermentación, dado el caso después de una separación previa para la retirada de partículas sólidas gruesas, que no contienen lisina o solo partes reducidas, se suministra a uno o varios aparatos de secado por pulverización o lecho fluidizado. El transporte o el suministro del caldo de fermentación cargado con sólidos se realiza, de forma apropiada, mediante dispositivos de transporte habituales para líquidos que contienen sólidos, por ejemplo, bombas tales como bombas de tornillo sin fin excéntrico (por ejemplo de la empresa Delasco PCM) o bombas de alta presión (por ejemplo de la empresa LEWA Herbert Ott GmbH).

La realización de una fermentación se puede realizar también de tal manera que

55 (i) se extrae del medio líquido (1) obtenido en la etapa a2) o su mezcla con la otra fuente de azúcar una cantidad parcial de no más del 50 % en peso, por ejemplo en el intervalo del 5 al 45 % en peso en relación con el peso total y se suministra la cantidad residual, dado el caso junto con otra fuente de azúcar, tal como se ha definido anteriormente, a una fermentación para la preparación de una lisina (A); y

(ii) se suministra la cantidad parcial extraída, dado el caso después de una separación previa completa o parcial de los constituyentes sólidos que no contienen almidón de la fuente de almidón, dado el caso junto con otra fuente de azúcar, tal como se ha definido anteriormente, a una fermentación para la preparación de otra lisina (B).

5 En el caso de la separación de los constituyentes sólidos que no contienen almidón de acuerdo con (ii), el contenido del sólidos de la parte restante del medio líquido preferentemente asciende como máximo al 50 % en peso, en particular como máximo al 30 % en peso, de forma particularmente preferente como máximo al 10 % en peso y de forma muy particularmente preferente a como máximo el 5 % en peso. En particular, en este caso se prefiere separar todos los sólidos antes de la fermentación para la preparación de la otra lisina (B).

10 Esta forma de proceder es particularmente ventajosa cuando para distintas aplicaciones de la lisina se han de plantear distintas exigencias a la pureza. Según esto, la lisina (A) que se puede usar, por ejemplo, como aditivo de piensos, mediante empleo del caldo de fermentación que contienen sólidos y la lisina (B) que se puede emplear, por ejemplo, como aditivo alimentario, se prepara mediante el empleo del caldo de fermentación reducido en concentración de sólidos de acuerdo con (ii). Mediante la separación completa o parcial de los constituyentes sólidos que no contienen almidón se puede reducir la complejidad de la purificación durante el tratamiento de la lisina, cuyo ámbito de aplicación requiere una mayor pureza, por ejemplo, como aditivo alimentario.

15 En otra forma de realización preferente de esta forma de proceder se puede proceder, por ejemplo, del siguiente modo. Se implementa una fermentación preferentemente de gran volumen para la preparación de lisina A, por ejemplo, de forma correspondiente a los procedimientos descritos en el documento WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) o PCT/EP2006/066057 (la anterior solicitud de patente DE 102005042541.0). De acuerdo con (i) se extrae una parte del medio líquido (1) obtenido en la etapa a2) o su mezcla con la otra fuente de azúcar. La parte extraída de acuerdo con (i) se puede liberar de acuerdo con (ii) mediante procedimientos habituales, por ejemplo centrifugación o filtración, por completo o parcialmente de los sólidos, dependiendo de las exigencias de la fermentación para la preparación de lisina B. El medio líquido (1) obtenido de este modo, liberado dado el caso por completo o parcialmente de los sólidos, se suministra de acuerdo con (ii), dado el caso junto con otra fuente de azúcar, tal como se ha definido anteriormente, a una fermentación para la producción de la lisina B. Una corriente de sólidos separada de acuerdo con (ii) se devuelve ventajosamente a la corriente del medio líquido que contiene azúcar de la fermentación de gran volumen.

20 Los sólidos separados, en el marco del procedimiento de fermentación que se hace funcionar en paralelo, de gran volumen, se pueden obtener junto con la lisina (A).

Después del secado y/o la formulación o la confección se pueden añadir a la formulación de producto o la composición proteica granos de cereales enteros o molidos, preferentemente maíz, trigo, cebada, mijo, triticale y/o centeno.

25 Los siguientes ejemplos sirven para aclarar aspectos individuales de la presente invención, pero no se han de entender de ningún modo como limitantes.

Ejemplos

I. Molienda de la fuente de almidón

Los productos molidos empleados a continuación se prepararon del siguiente modo. Granos enteros de maíz se molieron por completo mediante el uso de un molino de rotor. Mediante el empleo de distintos mecanismos de sacudida, soleras de molino o insertos de criba a este respecto se consiguieron tres finuras distintas. Un análisis de criba del producto molido mediante un tamiz vibratorio de laboratorio (máquina de análisis de vibración: Retsch Vibrotronic Tipo VE1; tiempo de cribado 5 min; amplitud: 1,5 mm) dio los resultados indicados en la Tabla I.

Tabla I

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

II. Licuefacción y sacarificación enzimática de almidón

II.1. Sin fitasa en la etapa de sacarificación

II.1a) Licuefacción enzimática de almidón

5 A partir de 320 g de harina de maíz molida en seco (T71/03) se preparó, con agitación constante, una suspensión en 480 g de agua y se mezcló con 310 mg de cloruro de calcio. La agitación se continuó durante toda la realización del ensayo. Después del ajuste del valor de pH con H₂SO₄ a 6,5 y calentamiento a 35 °C se añadieron 2,4 g de Termamyl 120L Tipo L (Novozymes A/S). A lo largo de 40 min se calentó la mezcla de reacción a una temperatura de 86,5 °C, reajustándose el pH dado el caso con NaOH hasta el valor ajustado previamente. En el intervalo de 30 min se añadieron otros 400 g de la harina de maíz molida en seco (T71/03), aumentándose la temperatura a 91 °C.

10 La mezcla de reacción se mantuvo aproximadamente durante 100 min a esta temperatura. A continuación se añadieron otros 2,4 g de Termamyl 120L y se mantuvo la temperatura durante aproximadamente 100 min. El avance de la licuefacción se siguió con la reacción de yodo-almidón durante el tiempo de la realización. Finalmente se aumentó la temperatura a 100 °C y se coció la mezcla de reacción durante otros 20 min. En este momento ya no se pudo comprobar más almidón. El reactor se refrigeró a 35 °C.

15 II.1b) Sacarificación

La mezcla de reacción obtenida de II.1a) se calentó con agitación constante a 61 °C. La agitación se prolongó durante toda la realización del ensayo. Después del ajuste del valor de pH con H₂SO₄ a 4,3 se añadieron 10,8 g (9,15 ml) de Dextrozyme GA (Novozymes A/S). La temperatura se mantuvo aproximadamente a 3 h; siguiéndose la progresión de la reacción con tiras de ensayo de glucosa (S-Glucotest de Boehringer). Los resultados están indicados en la Tabla II situada a continuación. A continuación se calentó la mezcla de reacción a 80 °C y después se refrigeró. Se obtuvieron aproximadamente 1180 g de producto líquido con una densidad de aproximadamente 1,2 kg/l y un contenido determinado mediante estufa de infrarrojos de masa seca de aproximadamente el 53,7 % en peso. El contenido de masa seca (sin ingredientes solubles en agua) después del lavado con agua ascendió aproximadamente al 14 % en peso. La parte determinada mediante HPLC de glucosa en la mezcla de reacción ascendió a 380 g/l (compárese con la Tabla 2, muestra N° 7).

20

25

Tabla II

Muestra N°	min (a partir de la adición de glucoamilasa)	Conc. de glucosa en el sobrenadante [g/l]
1	5 *	135
2	45	303
3	115	331
4	135	334
5	165	340
6	195	359
7	225	380

II.2. Con fitasa en la etapa de sacarificación

II.2a) Licuefacción de almidón

30 Se licuó una muestra de harina de maíz molida en seco de forma correspondiente a II.1a).

II.2b) Sacarificación

La mezcla de reacción obtenida de II.2a) se calentó con agitación constante a 61 °C. La agitación se prolongó durante toda la realización del ensayo. Después del ajuste del valor de pH con H₂SO₄ a 4,3 se añadieron 10,8 g (9,15 ml) de Dextrozyme GA (Novozymes A/S) y 70 µl de fitasa (700 unidades de fitasa, Natuphyt Liquid 10000L de BASF Aktiengesellschaft). La temperatura se mantuvo durante aproximadamente 3 h, siguiéndose la progresión de la reacción con tiras de ensayo de glucosa (S-Glucotest de Boehringer). A continuación se calentó la mezcla de reacción a 80 °C y después se refrigeró. El producto obtenido se secó mediante estufa de infrarrojos y se lavó con agua. Se determinó la parte de glucosa en la mezcla de reacción mediante HPLC.

35

II.3 Otras especificaciones de trabajo para la licuefacción y sacarificación enzimática de almidón

II.3a) Harina de maíz

5 360 g de agua desionizada se dispusieron en un recipiente de reacción. Se añadieron 1,54 ml de solución madre de CaCl_2 (100 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O} / \text{l}$) hasta una concentración final de aproximadamente 70 ppm de Ca^{2+} en el mosto. Con agitación constante se dejó que 240 g de harina de maíz se vertieran lentamente en el agua. Después del ajuste del pH a 6,5 con solución acuosa al 50 % en peso de NaOH se añadieron 4,0 ml (= 2 % en peso enzima/masa seca) de Termamyl 120 L tipo L (Novozymes A/S). Entonces se calentó el mosto rápidamente hasta a 85 °C. En este caso se tuvo que controlar constantemente el pH y, dado el caso, ajustarse.

10 Después de alcanzar la temperatura definitiva se comenzó con la adición de más harina, en primer lugar de 50 g de harina. Adicionalmente se añadieron al mosto 0,13 ml de solución madre de CaCl_2 para mantener la concentración de Ca^{2+} en 70 ppm. Durante la adición se mantuvo la temperatura constante a 85 °C. Se esperó al menos 10 minutos para garantizar una reacción completa antes de añadir otra porción (50 g de harina y 0,13 ml de solución madre de CaCl_2). Después de la adición de dos porciones se añadieron 1,67 ml de Termamyl; a continuación se añadieron dos porciones adicionales (respectivamente 50 g de harina y 0,13 ml de solución madre de CaCl_2). Se consiguió un contenido de masa seca del 55 % en peso. Después de la adición se aumentó la temperatura 100 °C y se coció el mosto durante 10 min.

20 Se extrajo una muestra y se refrigeró la misma a temperatura ambiente. Después de la dilución de la muestra con agua desionizada (aproximadamente 1:10) se añadió una gota de solución concentrada de lugol (mezcla de 5 g de yodo y 10 g de yoduro potásico por litro). Una coloración azul oscuro indicaba un contenido de almidón remanente; aparecía una coloración marrón cuando el almidón se había hidrolizado por completo. Cuando el ensayo indicaba una parte de almidón remanente, se redujo la temperatura de nuevo a 85 °C y se mantuvo constante. Se añadieron otros 1,67 ml de Termamyl hasta que la reacción de yodo-almidón resultó negativa.

25 La mezcla ensayada de forma negativa con respecto a almidón entonces se puso a 61 °C para la posterior reacción de sacarificación. El pH se ajustó mediante adición de ácido sulfúrico al 50 % a 4,3. En el transcurso de la reacción se mantuvo el pH en este valor. La temperatura se mantuvo en 61 °C. Se añadieron 5,74 ml (= 1,5 % en peso enzima/masa seca) de Dextrozym GA (Novozymes A/S) para transformar el almidón licuado en glucosa. Se dejó progresar la reacción durante una hora. Para la inactivación de la enzima se calentó la mezcla a 85 °C. La mezcla caliente se cargó en recipientes estériles y los mismos se almacenaron después del enfriamiento a 4 °C. Se consiguió una concentración final de glucosa de 420 g/l.

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

35 Se dispusieron 360 g de agua desionizada en un recipiente de reacción. Con agitación constante se dejó que 155 g de harina de centeno se vertieran lentamente en el agua. La temperatura se mantuvo constante a 50 °C. Después del ajuste del pH a 5,5 con solución acuosa al 50 % en peso de NaOH se añadieron 3,21 ml (= 0,5 % en peso de enzima/masa seca) de Viscozyme L (Novozymes A/S). Después de 30 min se inició la adición de más harina, en primer lugar se añadieron 55 g de harina. Después de otros 30 min se añadieron de nuevo 50 g de harina; 30 minutos después de nuevo 40 g de harina. 30 minutos después de la última adición se pudo comenzar con la licuefacción.

40 Se añadieron 1,7 ml de solución madre de CaCl_2 (100 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O} / \text{l}$). Después del ajuste del pH a 6,5 con solución acuosa al 50 % en peso de NaOH se añadieron 5,0 ml (= 2 % en peso enzima/masa seca) de Termamyl 120 L tipo L (Novozymes A/S). Entonces se calentó el mosto rápidamente a 85 °C. En este caso se controló constantemente el pH y, dado el caso, se adaptó.

45 Después de alcanzar la temperatura definitiva se comenzó con la adición de más harina, en primer lugar de 60 g de harina. Adicionalmente se añadieron al mosto 0,13 ml de solución madre de CaCl_2 para mantener la concentración de Ca^{2+} en 70 ppm. Durante la adición se mantuvo la temperatura constante a 85 °C. Se esperó al menos 10 min para garantizar una reacción completa antes de añadir otra porción (40 g de harina y 0,1 ml de solución madre de CaCl_2). Se añadieron 1,1 ml de Termamyl; a continuación se añadió otra porción (40 g de harina y 0,1 ml de CaCl_2 de solución madre). Se consiguió un contenido de masa seca del 55 % en peso. Después de la adición se aumentó la temperatura a 100 °C y se coció el mosto durante 10 min.

50 Se extrajo una muestra y se refrigeró a la misma a temperatura ambiente. Después de la dilución de la muestra con agua desionizada (aproximadamente 1:10) se añadió una gota de solución concentrada de lugol (mezcla de 5 g de yodo y 10 g de yoduro potásico por litro). Una coloración azul oscuro indicaba un contenido de almidón remanente; aparecía una coloración marrón cuando se había hidrolizado por completo el almidón. Cuando el ensayo indicaba una parte de almidón remanente, se redujo de nuevo la temperatura a 85 °C y se mantuvo constante. Se añadieron otros 1,1 ml de Termamyl hasta que la reacción de yodo-almidón resultó negativa.

55 La mezcla ensayada de forma negativa con respecto a almidón se puso entonces a 61 °C para la posterior reacción de sacarificación. Se ajustó el pH mediante la adición de ácido sulfúrico al 50 % a 4,3. En el transcurso de la reacción se mantuvo el pH en este valor. La temperatura se mantuvo en 61 °C. Se añadieron 5,74 ml (= 1,5 % en

peso enzima/masa seca) de Dextrozime GA (Novozymes A/S) para transformar el almidón licuado en glucosa. Se dejó progresar la reacción durante una hora. Para la inactivación de la enzima se calentó la mezcla a 85 °C. La mezcla caliente se cargó en recipientes estériles y los mismos se almacenaron después de la refrigeración a 4 °C. Se alcanzó una concentración final de glucosa de 370 g/l.

5 II.3c) Harina de trigo (incluyendo tratamiento previo con xilanasa)

Se dispusieron 360 g de agua desionizada en un recipiente de reacción. El agua se calentó a 55 °C y se ajustó el pH con solución acuosa al 50 % en peso de NaOH a 6,0. Después del ajuste de la temperatura y el pH se añadieron 3,21 ml (= 2,5 % en peso de enzima/masa seca) de Shearzyme 500L (Novozymes A/S). Con agitación constante se dejó que 155 g de harina de trigo se vertieran lentamente en la solución. La temperatura y el pH se mantuvieron constantes. Después de 30 min se inició la adición de más harina, en primer lugar se añadieron 55 g de harina. Después de otros 30 min se añadieron 50 g de harina; 30 minutos después de nuevo 40 g de harina. 30 min después de la última adición se pudo comenzar con la licuefacción.

La licuefacción y la sacarificación se llevaron a cabo como se ha descrito en II.3b. Se consiguió una concentración final de glucosa de 400 g/l.

15 III. Cepa ATCC13032 lysCfbr

En algunos de los siguientes ejemplos se empleó una cepa modificada de *Corynebacterium glutamicum*; que se ha descrito en el documento WO 05/059144 con la denominación ATCC13032 lysCfbr.

Ejemplo 1

Se preparó, tal como se describe en 1) más adelante, respectivamente un hidrolizado de harina de maíz, trigo y centeno. El contenido total de azúcar en cada uno de estos medios se aumentó mediante adición de distintas soluciones de azúcar (que contenían glucosa, azúcar de caña, melaza). Los medios se emplearon en ensayos de matraz agitado con uso de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032 lysC^{fbr}) y *Bacillus* PA824 (descripción más detallada en el documento WO 02/061108) como fuente de carbono.

1) Preparación del hidrolizado de harina

25 a) Hidrolizado de harina de maíz

Se dispusieron 360 g de agua desionizada en un recipiente de reacción. Con agitación constante se dejó que 155 g de harina de maíz se vertieran lentamente en el agua.

- Licuefacción

Después del ajuste del pH a 5,8 con solución acuosa al 50 % en peso de NaOH se añadieron 2,6 ml (= 2 % en peso de enzima/masa seca) de Liquozyme SC (de Novozymes A/S). Entonces, el mosto se calentó rápidamente a 100 °C y se coció durante 10 minutos. En este caso, el pH se controló de forma constante y dado el caso se adaptó.

Se extrajo una muestra y la misma se refrigeró a temperatura ambiente. Después de la dilución de la muestra con agua desionizada (aproximadamente 1:10) se añadió una gota de solución concentrada de lugol (mezcla de 5 g de yodo y 10 g de yoduro potásico por litro). En este caso, una coloración azul oscuro indicaba un contenido de almidón remanente; aparecía una coloración marrón cuando se había hidrolizado por completo el almidón.

- Sacarificación

La mezcla ensayada de forma negativa con respecto a almidón entonces se puso a 61 °C para la siguiente reacción de sacarificación. El pH se ajustó mediante adición de ácido sulfúrico al 50 % a 4,3. En el transcurso de la reacción se mantuvo el pH en este valor: la temperatura se mantuvo en 61 °C. Se añadieron 2,0 ml (= 1,5 % en peso de enzima/masa seca) de Dextrozim GA (de Novozymes A/S) para transformar el almidón licuado en glucosa. Se dejó que la reacción progresara durante una hora. Para la inactivación de la enzima se calentó la mezcla a 85 °C. La mezcla caliente se cargó en recipientes estériles y los mismos se almacenaron después de la refrigeración a 4 °C.

b) Hidrolizado de harina de trigo

- Tratamiento previo con xilanasa

45 360 g de agua desionizada se dispusieron en un recipiente de reacción. El agua se calentó a 55 °C y se ajustó el pH con solución acuosa al 50 % en peso de NaOH a 6,0. Después del ajuste de la temperatura y el pH se añadieron 3,21 ml (= 2,5 % en peso de enzima/masa seca) de Shearzyme 500L (de Novozymes A/S). Con agitación constante se dejó que 155 g de harina de maíz se vertieran lentamente a la solución. La temperatura y el pH se mantuvieron constantes. Después de 30 min se pudo comenzar con la licuefacción.

50 La licuefacción y la sacarificación se llevaron a cabo tal como se ha descrito en 1a).

c) Hidrolizado de harina de centeno

Tratamiento previo con celulasa/hemicelulasa

- 5 Se dispusieron 360 g de agua desionizada en un recipiente de reacción. Con agitación constante se dejó que 155 g de harina de centeno se vertieran lentamente al agua. La temperatura se mantuvo constante en 50 °C. Después del ajuste del pH a 5,5 con ácido sulfúrico al 50 % se añadieron 3,21 ml (= 2,5 % en peso enzima/masa seca) de Viscozyme L (de Novozymes A/S). Después de 30 min se pudo comenzar con la licuefacción.

La licuefacción y sacarificación se llevaron a cabo tal como se ha descrito en 1a).

2) Preparación del inóculo

a) para *Corynebacterium glutamicum*

- 10 Las células se incubaron después de la siembra en agar CM+CaAc estéril (composición: véase la Tabla 1; 20 min a 121 °C) durante una noche a 30 °C. A continuación se rasparon las células de las placas y se resuspendieron en solución salina. 25 ml del medio (véase la Tabla 4) en matraces Erlenmeyer de 250 ml con dos deflectores se inocularon, respectivamente, con tal cantidad de la suspensión celular preparada de este modo, que la densidad óptica alcanzó un valor de $DO_{610} = 0,5$ a 610 nm.

- 15 Tabla 1: composición de las placas de Agar CM+CaAc

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

b) para *Bacillus*

- 20 42 ml del medio de precultivo (véase la Tabla 2) en matraces de Erlenmeyer de 250 ml con dos deflectores se inocularon respectivamente con 0,4 ml de un cultivo congelado y se incubaron durante 24 h a 43 °C con movimiento (250 rpm) en una estufa agitadora humedecida.

Tabla 2: composición del medio de precultivo

Ingrediente	Concentración
Maltosa	28,6 g/l
Harina de soja	19,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,6 g/l
Monoglutamato sódico	4,8 g/l
Citrato sódico	0,95 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	9,5 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,9 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,4 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,9 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,2 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,7 mg/l

(continuación)

Ingrediente	Concentración
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	15,2 g/l
KH ₂ PO ₄	3,9 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,9 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,09 g/l
MOPS	59,8 g/l
pH*	7,2
* ajustar con solución acuosa diluida de KOH	

42 ml del medio de cultivo principal (véase la Tabla 6) en matraces de Erlenmeyer de 250 ml con dos deflectores se inocularon, respectivamente, con 1 ml de precultivo

5 3) Preparación del caldo de fermentación

a) para *Corynebacterium glutamicum*

En la Tabla 4 está indicada la composición del medio del matraz. Debía existir una concentración inicial de azúcar de 60 g/l. A este respecto, la mitad del azúcar procedía del hidrolizado (medio de fermentación (1)), la otra mitad se añadió como solución de azúcar. Para esto se preparó una mezcla de hidrolizado y solución de azúcar y se añadió al medio del matraz. En el medio de control se usó una cantidad correspondiente de solución de glucosa.

10

- Preparación de los hidrolizados de harina con adición de azúcar

Se prepararon las siguientes soluciones (véase la Tabla 3):

Tabla 3: preparación de hidrolizados de harina con adición de azúcar

Hidrolizado de harina	Concentración de glucosa en el hidrolizado [g/l]	Hidrolizado por litro de preparación [ml]	Solución de azúcar	Concentración en la solución de azúcar [g/l]	Solución de azúcar por litro de preparación [ml]
Maíz 30 %	250,0	240	Glucosa	626	96
Maíz 30 %	250,0	240	Azúcar no refinado	639	94
Trigo 30 %	258,9	232	Glucosa	626	96
Trigo 30 %	258,9	232	Azúcar no refinado	639	94
Centeno 30 %	217,9	275	Glucosa	626	96
Centeno 30 %	217,9	275	Azúcar no refinado		94

15

Tabla 4: medio de matraz

Hidrolizado de harina con solución de azúcar	500 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l
Urea	5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,113 g/l
K ₂ HPO ₄	0,138 g/l
ACES	52 g/l
MOPS	21 g/l

ES 2 471 376 T3

(continuación)

Hidrolizado de harina con solución de azúcar	500 ml/l
Ácido cítrico x H ₂ O	0,49 g/l
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	3,08 mg/l
NaCl	2,5 g/l
KCl	1 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3 g/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	25 mg/l
MnSO ₄ x 4 - 6 H ₂ O	5 mg/l
ZnCl ₂	10 mg/l
CaCl ₂	20 mg/l
H ₃ BO ₃	150 µg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	100 µg/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	100 µg/l
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	100 µg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25 µg/l
Biotina (Vit. H)	1050 µg/l
Tiamina x HCl (Vit B ₁)	2100 µg/l
Nicotinamida	2,5 mg/l
Ácido pantoténico	125 mg/l
Cianocobalamina (Vit B ₁₂)	1 µg/l
Ácido 4-aminobenzoico (PABA; Vit. H ₁)	600 µg/l
Ácido fólico	1,1 µg/l
Piridoxina (Vit. B ₆)	30 µg/l
Riboflavina (Vit. B ₂)	90 µg/l
Hidrolizado de harina con solución de azúcar	500 ml/l
CSL	40 ml/l
pH*	6,85
* ajustar con solución acuosa diluida de NaOH	

5 Después de la inoculación, los matraces se incubaron durante tres días a 30 °C y con movimiento (200 rpm) en una estufa agitadora humedecida. Después de la interrupción de la fermentación se determinó el contenido de lisina mediante HPLC. Los análisis de HPLC se llevaron a cabo con aparatos de las 1100 Series LC de Agilent. La determinación de la concentración de aminoácidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión en un sistema de HPLC de Agilent 1100 Serie LC. Una derivatización de precolumna con orto-ftalaldehído permite la cuantificación de los aminoácidos formados, la separación de la mezcla de aminoácidos tiene lugar en una columna Hypersil AA (Agilent). Los resultados están compilados en la Tabla 5.

10

ES 2 471 376 T3

Tabla 5: valores medios

Hidrolizado de harina	Solución de azúcar	Lisina [g/l]	Rendimiento*
Maíz	Glucosa	12,50	0,21
	Azúcar no refinado	10,64	0,19
	Melaza	10,06	0,18
Trigo	Glucosa	10,82	0,18
	Azúcar de caña	10,14	0,18
	Melaza	9,67	0,17
Centeno	Glucosa	10,89	0,18
	Azúcar de caña	9,59	0,16
	Melaza	9,67	0,16
Control		11,54	0,20

* en relación con el equivalente de glucosa total

b) para *Bacillus*

5 En la Tabla 6 está indicada la composición del medio del matraz. Debía existir una concentración inicial de glucosa de 28,6 g/l. A este respecto, la mitad del azúcar procedía del hidrolizado, la otra mitad se añadió como solución de glucosa. En el medio de control se usó una cantidad correspondiente de solución de glucosa.

Tabla 6: medios de matraz

Maíz	250 g/l †	57 ml/l ‡	
Trigo	259 g/l †		55 ml/l ‡
Centeno	218 g/l †		67 ml/l ‡
Solución de glucosa (c=626 g/l)		23 ml/l	
Harina de soja		19,0 g/l	
(NH ₄) ₂ SO ₄		7,6 g/l	
Monoglutamato sódico		4,8 g/l	
Citrato sódico		0,95 g/l	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O		9,5 mg/l	
MnCl ₂ x 4 H ₂ O		1,9 mg/l	
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O		1,4 mg/l	
CoCl ₂ x 6 H ₂ O		1,9 mg/l	
CuSO ₄ x 5 H ₂ O		0,2 mg/l	
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O		0,7 mg/l	
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O		15,2 g/l	
KH ₂ PO ₄		3,9 g/l	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O		0,9 g/l	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O		0,09 g/l	
MOPS		59,8 g/l	
pH*		7,2	
* ajustar con solución acuosa diluida de NaOH			
† concentración de glucosa en el hidrolizado			
‡ pesada necesaria de hidrolizado por litro de medio			

ES 2 471 376 T3

5 Después de la inoculación se incubaron los matracos durante 24 h a 43 °C y con movimiento (250 rpm) en una estufa agitadora humedecida. Después de la interrupción de la fermentación se determinó el contenido de glucosa y ácido pantoténico mediante HPLC. La determinación de la glucosa se realizó con ayuda de una columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad. La determinación de la concentración de ácido pantoténico se realizó mediante la separación en una columna Aqua C18 (Phenomenex).

En la Tabla 7 están compilados los resultados.

Tabla 7: valores medios de 24 h

	Ácido pantoténico, t=24 h [g/l]	Rendimiento [g de ácido pantoténico / g de glucosa]
Maíz	2,7	0,09
Trigo	2,4	0,08
Centeno	2,7	0,09
Control	2,7	0,09

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de lisina mediante fermentación, que comprende los siguientes pasos:

5 a1) molienda de granos de cereales como fuente de almidón con obtención de un producto molido que contiene al menos el 50 % en peso de los constituyentes sólidos que no contienen almidón contenidos en los granos de cereales molidos, ascendiendo la parte de los constituyentes sólidos que no contienen almidón en el producto molido al menos al 15 % en peso;

10 a2) suspensión del producto molido en un líquido acuoso e hidrólisis de la parte de almidón en el producto molido mediante licuefacción enzimática y, dado el caso, sacarificación posterior, obteniéndose un primer líquido (1) que contiene mono- u oligosacáridos, que contiene los constituyentes sólidos que no contienen almidón del producto molido y en el que la concentración total de mono-, di- y oligosacáridos se encuentra en el intervalo de 100 a 400 g/kg; y

15 b) adición del líquido (1) que contiene mono- u oligosacáridos junto con mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables o una composición que contiene mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso y que esencialmente está exenta de sólidos insolubles en agua, a un medio de fermentación que contiene un microorganismo que está capacitado para la sobreproducción de la lisina en condiciones de fermentación,

20 aumentándose la concentración total de mono-, di- y oligosacáridos en el primer líquido (1) mediante adición de mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables o mediante adición de un medio que contiene mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables en una concentración de al menos el 50 % en peso y que está esencialmente libre de sólidos insolubles en agua, en al menos 50 g/kg.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, encontrándose la concentración total de mono-, di- y oligosacáridos del líquido (1) obtenido en la etapa a2) en el intervalo de 150 a 350 g/kg.

25 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, siendo la cantidad, introducida mediante adición del líquido (1) en la fermentación, de mono-, di- y/u oligosacáridos del 40 al 95 % en peso de la cantidad total de la cantidad introducida en la fermentación de mono-, di- y oligosacáridos.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, aumentándose la concentración total de mono-, di- y oligosacáridos en el líquido (1) hasta un valor en el intervalo de 450 a 600 g/kg.

30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, empleándose como composición que contiene mono- u oligosacáridos metabolizables un producto secundario de la producción de azúcar que contiene glucosa y/o sacarosa y, dado el caso, dextrinas.

6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, empleándose como composición que contiene mono-, di- y/u oligosacáridos metabolizables melaza de la producción de azúcar de remolacha.

35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, hidrolizándose en la etapa a2) al menos una cantidad parcial del producto molido obtenido en la etapa a1) mediante adición continua o discontinua al líquido acuoso en condiciones de hidrólisis.

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, calentándose en la etapa a2) la suspensión del producto molido mediante introducción de vapor de agua en la suspensión a temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización del almidón contenido en el producto molido.

40 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, reduciéndose la concentración o aislándose la lisina del caldo de fermentación y retirándose a continuación en gran medida los constituyentes volátiles del caldo de fermentación, obteniéndose una composición proteica sólida o semisólida.

45 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, retirándose al menos parcialmente los constituyentes volátiles del caldo de fermentación sin aislamiento o reducción de concentración previos de un producto metabólico microbiano no volátil y, dado el caso, sin separación previa de constituyentes volátiles, obteniéndose una formulación sólida de un producto metabólico microbiano no volátil.