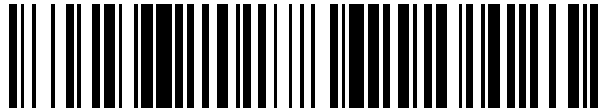


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 666**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/02** (2006.01)

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12P 7/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2005 E 05725774 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 1756292**

54 Título: **Proceso para fermentar azúcares que contienen sacáridos oligómeros**

30 Prioridad:

**31.03.2004 US 558266 P**

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

**21.10.2014**

73 Titular/es:

**CARGILL, INCORPORATED (100.0%)  
15407 McGinty Road West  
Wayzata, MN 55391, US**

72 Inventor/es:

**BEACOM, DANIEL R.;  
KOLSTAD, JEFFREY L.;  
REEDER, DAVID H. y  
RUSH, BRIAN J.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 510 666 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

Proceso para fermentar azúcares que contienen sacáridos oligómeros

Esta invención se refiere a un proceso para fermentar monosacáridos que contienen cantidades de materiales de polisacárido.

5 Se utilizan comercialmente procesos de fermentación a gran escala para producir moléculas orgánicas tales como etanol, ácido cítrico y ácido láctico. En estos procesos se proporciona un carbohidrato a un microorganismo que es capaz de metabolizarlo hasta el producto de fermentación deseado. El carbohidrato y el microorganismo se seleccionan conjuntamente con el fin de que el microorganismo sea capaz de digerir eficazmente el carbohidrato para formar con buen rendimiento el producto que se desea. En estos procesos cada vez es más común el utilizar  
10 microorganismos genéticamente modificados, con objeto de optimizar los rendimientos y las variables del proceso o permitir que se metabolicen carbohidratos particulares.

El almidón es una fuente de carbohidratos muy asequible y barata. Es asequible de una gran diversidad de fuentes vegetales tales como el maíz, el trigo, el arroz, la cebada y similares. Muchos microorganismos no son capaces de metabolizar directamente el almidón o, en otro caso, lo metabolizan lenta e ineficazmente. En consecuencia, es  
15 común tratar el almidón antes de alimentarlo al proceso de fermentación, con objeto de que se descomponga en monosacáridos que el microorganismo pueda fermentar fácilmente.

Normalmente, el almidón es hidrolizado para formar una mezcla que contiene principalmente glucosa (es decir, dextrosa). Sin embargo, la hidrólisis completa hasta glucosa añade un coste significativo, por lo que la mayoría de los productos de glucosa comercialmente asequibles tienden a contener una pequeña cantidad de fructosa y  
20 diversos polisacáridos oligómeros. Desafortunadamente, muchos microorganismos tampoco pueden metabolizar los oligómeros y, por lo tanto, se desperdician estos valores de carbohidrato. Además, la presencia de estos oligómeros complica la recuperación del producto de fermentación deseado del medio de fermentación.

Se conocen los llamados procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF; del inglés, simultaneous saccharification and fermentation), en los que se alimenta almidón no hidrolizado a un proceso de fermentación junto con enzimas que catalizan la descomposición del almidón hasta monosacáridos. Los monosacáridos se producen y fermentan simultáneamente hasta el producto deseado. Los procesos SSF adolecen de varias desventajas. Típicamente, el almidón que se alimenta a los procesos SSF no es estéril. Lo mismo ocurre con las enzimas. Por lo tanto, se debe llevar a cabo una esterilización en el recipiente de fermentación. Esto tiende a ser ineficaz y consumir mucha energía. Además, conforme se produce glucosa, ésta tiende a desactivar las enzimas y a lentificar las  
25 velocidades de producción globales.

En consecuencia, sería deseable un proceso mejorado mediante el cual se pudieran fermentar eficazmente materias primas de monosacárido que contienen cantidades de azúcares oligómeros.

La invención se refiere a un proceso para fermentar un sustrato de fermentación en presencia de un microorganismo, que comprende

- 35 (A) formar un caldo de fermentación de partida que contiene un producto de hidrólisis de almidón que contiene 80-98% en peso (basado en carbohidratos) de glucosa y 1-20% en peso (basado en carbohidratos) de oligómeros de glucosa que no son fermentables por el microorganismo, en donde el caldo de fermentación de partida contiene al menos 30 g/l de glucosa;
- 40 (B) fermentar el caldo de fermentación de partida en presencia del microorganismo bajo unas condiciones suficientes para que fermente la glucosa y se reduzca la concentración de glucosa en el caldo de fermentación a menos de 30 g/l;
- (C) añadir luego al caldo de fermentación una cantidad eficaz de al menos una enzima que despolimerice al menos un oligómero de glucosa en el caldo de fermentación para formar glucosa;
- 45 (D) y someter luego el caldo de fermentación a unas condiciones suficientes para, simultáneamente, despolimerizar los oligómeros de glucosa y fermentar la glucosa para formar el producto de fermentación deseado.

Se ha hallado sorprendentemente que se puede producir la despolimerización enzimática de sacáridos oligómeros a buenas velocidades en presencia de concentraciones significativas de monosacáridos. Esto permite la fermentación y la despolimerización simultáneas de oligómeros sin una inactivación significativa de las enzimas ni una nueva formación de oligómeros 1→6. Este proceso proporciona un método de fermentación eficaz en el que se pueden emplear materias primas de carbohidrato relativamente baratas y con el que se obtiene el producto de fermentación deseado con altísimos rendimientos a velocidades comercialmente razonables.

El "oligómero de glucosa no fermentable por el microorganismo" es un oligómero de glucosa en que dos o más unidades de glucosa están unidas entre sí a través de enlaces éter. El oligómero de glucosa es "no fermentable", lo que significa que no puede ser fermentado por el microorganismo hasta el producto de fermentación deseado o que, en otro caso, la velocidad de su fermentación no es superior a aproximadamente el 5% de la velocidad a la cual el microorganismo fermenta la glucosa bajo las condiciones utilizadas en el proceso. El grado de polimerización es preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, especialmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, lo más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3. En el caso de oligómeros, son adecuados aquellos que tienen enlaces éter 1→4 o 1→6, aunque se prefieren aquellos que tienen enlaces éter 1→4. Son oligómeros no fermentables especialmente preferidos los de glucosa, maltosa, maltotriosa e isomaltotriosa (que tienen todos enlaces éter 1→4), isomaltosa (que tienen un enlace 1→6), y panosa (que tienen enlaces tanto 1→4 como 1→6).

Los productos de hidrólisis del almidón comercialmente asequibles contienen aproximadamente 80-98% en peso (basado en carbohidratos), especialmente alrededor de 90-96% en peso, de glucosa y aproximadamente 1-20% (basado en carbohidratos), especialmente alrededor de 1-9%, de oligómeros de glucosa que tienden a ser no fermentables. Estos productos de hidrólisis también pueden contener pequeñas cantidades (hasta aproximadamente 2% en peso, basado en carbohidratos) de fructosa y otros carbohidratos. Dichos productos de hidrólisis del almidón son un sustrato de fermentación particularmente preferido para uso en esta invención.

En esta invención se producen una fermentación y una despolimerización enzimática de oligómeros simultáneas. En el proceso se añaden enzimas activas a un caldo de fermentación que contiene hasta aproximadamente 30 g/l de glucosa. Unas mayores concentraciones de glucosa tienden a reducir la eficacia de la reacción de despolimerización enzimática y, por lo tanto, son indeseables. Además, algunas de las enzimas catalizarán la formación de 16 oligómeros de polisacárido en presencia de altas concentraciones de glucosa. La concentración de glucosa es preferiblemente hasta aproximadamente 26 y más preferiblemente hasta aproximadamente 20 g/l.

El caldo contiene hasta aproximadamente 10 g/l de los oligómeros de glucosa no fermentables, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 g/l y más preferiblemente alrededor de 3-6 g/l. El caldo de fermentación es luego sometido a unas condiciones bajo las cuales fermenta la glucosa al mismo tiempo que se despolimeriza al menos uno de los oligómeros de glucosa no fermentables. También fermenta la glucosa que se produce en la reacción de despolimerización. La despolimerización enzimática y la fermentación simultáneas proporcionan excelentes rendimientos y buenas velocidades de fermentación.

Normalmente es más económico comenzar una fermentación con una concentración mucho mayor de glucosa. Por lo tanto, una realización preferida de la invención es un proceso en que se fermenta un caldo de fermentación de partida que contiene más de 30 g/l (preferiblemente al menos 40 g/l, más preferiblemente al menos 50 g/l, especialmente al menos 55 g/l) de glucosa hasta que la concentración de glucosa se reduce a menos de 30 g/l, preferiblemente a menos de 26 g/l y más preferiblemente a menos de 5 g/l). Luego se añade(n) la(s) enzima(s) y se llevan a cabo la fermentación y la fermentación de oligómeros simultáneas. Esta realización de la invención permite sacar provecho de la mejor economía que acarrea el uso de mayores concentraciones de partida de los materiales de partida.

En este proceso se puede emplear cualquier enzima que sea capaz de despolimerizar el (los) oligómero(s) de glucosa no fermentable(s). El tipo específico de enzima que se emplea se selecciona en relación con los oligómeros de glucosa particulares que están presentes en el caldo de fermentación. Las enzimas de particular interés atacan un enlace éter 1→4 o un enlace éter 1→6 (o ambos) de un oligómero de glucosa. Una enzima preferida para despolimerizar oligómeros con enlaces 1→4 es una  $\alpha$ -glucosidasa (glucoamilasa). Una enzima preferida para despolimerizar oligómeros con enlaces 1→6 es una trans-glucosidasa. Se prefieren las mezclas de  $\alpha$ -glucosidasa y trans-glucosidasa cuando están presentes sacáridos oligómeros de cada tipo. Estas enzimas son comercialmente asequibles de, por ejemplo, Enzyme Biosystems [G-ZYME 99 SP (un producto de  $\alpha$ -glucosidasa)] y Genencor (Transglucosidasa L-500). En ciertos casos, los grados comerciales de  $\alpha$ -glucosidasa no están muy refinados y contienen diversas cantidades de otras enzimas que atacan los enlaces 1→4 y/o 1→6 de sacáridos oligómeros. Estos grados "crudos" de  $\alpha$ -glucosidasa están entre los tipos preferidos de enzimas. Un ejemplo de dicho grado "crudo" es GC702 de Genencor.

La cantidad de enzima que se emplea dependerá en cierta medida de la enzima particular, la deseada velocidad de reacción y el (los) oligómero(s) de glucosa particular(es) que está(n) presente(s). Típicamente, la enzima se utiliza en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente 5-10.000  $\mu$ l de enzima/l de caldo de fermentación. Una cantidad más preferida es aproximadamente 10-1000  $\mu$ l/l y una cantidad aún más preferida es aproximadamente 25-500  $\mu$ l/l.

El etanol, el ácido láctico, el ácido cítrico, el ácido malónico, el ácido hidroxibutírico y el ácido acético son ejemplos de sustancias químicas que se producen en los productos de fermentación comerciales.

El microorganismo es uno que puede fermentar la glucosa hasta el producto de fermentación deseado. Como tal, el microorganismo particular empleado se selecciona en relación con el sustrato de fermentación así como con el producto de fermentación que se desea. El microorganismo puede ser de origen natural o puede ser una cepa mutante o recombinante. Los ejemplos de microorganismos incluyen diversas especies de bacilos, lactobacilos y levaduras, incluyendo tipos silvestres y tipos mutados o recombinantes.

Los adecuados microorganismos útiles para producir ácido láctico incluyen bacterias de tipo silvestre de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* y hongos de tipo silvestre del género *Rhizopus*. Además, son adecuadas las cepas de levadura recombinantes de los géneros *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Trichosporon* y *Yamadazyma*, que tienen genes LDH exógenos. Dichas cepas de levadura recombinantes se describen, por ejemplo, en los Documentos WO 99/14335, WO 00/71738 y WO 02/42471.

El caldo de fermentación también incluirá agua e incluye preferiblemente nutrientes, tales como proteínas (u otra fuente de nitrógeno), vitaminas y sales, que son necesarias o deseables para la función celular. También pueden estar presentes otros componentes en el caldo de fermentación, tales como agentes de tamponamiento, productos de fermentación (que tienden a acumularse conforme progresa la fermentación) y otros metabolitos. En los casos en que la fermentación es ácida, es habitual tamponar el caldo con una base, tal como hidróxido cálcico o carbonato cálcico, con objeto de mantener un pH en que el microorganismo actúe bien.

Se seleccionan unas condiciones para que se produzcan simultáneamente la fermentación y la despolimerización enzimática de los oligómeros. Aunque las condiciones pueden variar dependiendo del microorganismo, la enzima y el producto de fermentación deseados particulares, las condiciones típicas incluyen una temperatura de aproximadamente 20 °C, preferiblemente de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 50 °C, más preferiblemente de aproximadamente 45 °C. Normalmente se agita la mezcla de reacción. El proceso puede ser llevado a cabo de forma discontinua, semicontinua o continua.

Preferiblemente, se continúa el proceso hasta que se convierta tanto sustrato de fermentación en el producto de fermentación deseado como sea económicamente viable. Sin embargo, se reconoce que, en muchos casos, no será económicamente eficaz intentar fermentar el 100% del sustrato. Se prefiere llevar a cabo el proceso de modo que al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, especialmente al menos el 75%, de los oligómeros de glucosa no fermentables se conviertan en glucosa y fermenten hasta el producto deseado. Las concentraciones finales de oligómeros de glucosa no fermentables son preferiblemente inferiores a aproximadamente 3 g/l, más preferiblemente inferiores a aproximadamente 2 g/l, y especialmente inferiores a aproximadamente 1 g/l. Las concentraciones finales de glucosa son preferiblemente inferiores a 1 g/l, especialmente inferiores a 0,1 g/l.

El producto de fermentación se recupera del caldo de fermentación. La manera de realizar esto dependerá del producto particular. Sin embargo, en general, el microorganismo se separa de la fase líquida, típicamente por medio de una operación de filtración, y el producto se recupera por medio de, por ejemplo, destilación, extracción, cristalización, separación por membrana, ósmosis, ósmosis inversa u otra técnica adecuada.

Se preparan aproximadamente 4000 l de un caldo de fermentación acuoso que contiene lo suficiente de un jarabe de glucosa al 95% para proporcionar 153 g de glucosa/kg de caldo. El jarabe de dextrosa al 95% contiene diversas especies oligómeras, como se expone más adelante en la Tabla 1. El caldo de fermentación incluye un paquete de nutrientes para promover el crecimiento y la actividad del microorganismo.

El caldo se fermenta para producir ácido láctico a 45 °C usando una bacteria en una concentración de aproximadamente 4 g de células/l. Se añade cal según sea necesario para mantener el pH del caldo en un valor de aproximadamente 6,2. Se produce ácido láctico (en forma de sal cálcica) a una velocidad de aproximadamente 1,6 g/kg/h. Se continúa la fermentación hasta que la concentración de glucosa en el caldo se reduce a menos de 7 g/l. Se añaden 400 µl/l de α-glucosidasa y 25 µl/l de trans-glucosidasa. Se toma una muestra del caldo y se analiza en cuanto a glucosa, maltosa, isomaltosa, maltotriosa, panosa e isomaltotriosa, con los resultados siguientes:

Tabla 1

Sacárido	Concentración (g/l)
Glucosa	6,730
Maltosa	3,158
Isomaltosa	1,390
Maltotriosa	0,033
Panosa	0,768
Isomaltotriosa	0,062
Oligómeros totales	5,932

En el momento de la adición de las enzimas la concentración de ácido láctico es 121 g/kg. Después de la adición de las enzimas se continúa la fermentación bajo las mismas condiciones que antes. Se toma una muestra del caldo a diversos intervalos y se analiza en cuanto a sacáridos como antes. Los resultados son los siguientes:

5

Tabla 2

Sacárido	Tiempo			
	4 h	9 h	25,5 h	63 h
Glucosa	1,110	0,090	0,058	~ 0
Maltosa	0,000	0,000	0,000	0,000
Isomaltosa	1,267	1,152	0,353	0,000
Maltotriosa	0,000	0,040	0,000	0,000
Panosa	0,396	0,376	0,028	0,042
Isomaltotriosa	0,100	0,092	0,037	0,050
Oligómeros totales	1,762	1,660	0,418	0,092

Los datos de la Tabla 2 muestran que los cinco sacáridos oligómeros rastreados resultaron sustancialmente despolimerizados después de la adición de las enzimas. La fermentación simultánea viene indicada por los niveles de glucosa, que continuaron cayendo durante todo el proceso aun cuando se estaba generando glucosa adicional conforme se despolimerizaban los oligómeros. Las concentraciones de sustrato globales se redujeron en este ejemplo de 153 g/l a menos de 0,1 g/l. La concentración láctica final es 126 g/kg de caldo.

10

Se lleva a cabo otra fermentación a menor escala utilizando aproximadamente 1,9 l de un caldo de fermentación similar al descrito en la Tabla 1 salvo por que la concentración de glucosa de partida es aproximadamente 125 g/l. La fermentación se lleva a cabo durante aproximadamente 35 horas bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 1, momento en que la concentración de glucosa se ha reducido a 26 g/l. Se toma una muestra en este punto y se analiza en cuanto a sacáridos. Luego se añaden 400  $\mu$ l/l de  $\alpha$ -glucosidasa y se continúa la fermentación bajo las mismas condiciones. Se toman muestras 3, 8 y 27 horas después de la adición de la enzima, con los resultados que se muestran en la Tabla 3.

15

Tabla 3

Sacárido	Tiempo			
	En el momento de la adición de la enzima	3 h	8 h	27 h
Glucosa	26,00	18,90	10,20	0,091
Maltosa	2,905	0,545	0,496	0,309
Isomaltosa	1,420	1,361	1,292	1,095
Maltotriosa	0,188	0,000	0,000	0,000
Panosa	0,505	0,217	0,105	0,131
Isomaltotriosa	0,159	0,111	0,066	0,068
Oligómeros totales	4,367	2,234	1,959	1,603

20

Los datos de la Tabla 3 muestran de nuevo que la fermentación y la despolimerización enzimática de polisacáridos se desarrollan simultáneamente bajo estas condiciones. En este ejemplo, los oligómeros que tienen enlaces éter 1 $\rightarrow$ 4 se convierten en monosacáridos con buen rendimiento. La isomaltosa no resulta significativamente despolimerizada en este ejemplo porque la  $\alpha$ -glucosidasa no promueve eficazmente la hidrólisis del enlace éter 1 $\rightarrow$ 6 que existe en la isomaltosa.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para fermentar un sustrato de fermentación en presencia de un microorganismo, que comprende

- 5 (A) formar un caldo de fermentación de partida que contiene un producto de hidrólisis de almidón que contiene 80-98% en peso (basado en carbohidratos) de glucosa y 1-20% en peso (basado en carbohidratos) de oligómeros de glucosa que no son fermentables por el microorganismo, en donde el caldo de fermentación de partida contiene al menos 30 g/l de glucosa;
- (B) fermentar el caldo de fermentación de partida en presencia del microorganismo bajo unas condiciones suficientes para que fermente la glucosa y se reduzca la concentración de glucosa en el caldo de fermentación a menos de 30 g/l;
- 10 (C) añadir luego al caldo de fermentación una cantidad eficaz de al menos una enzima que despolimerice al menos un oligómero de glucosa en el caldo de fermentación para formar glucosa;
- (D) y someter luego el caldo de fermentación a unas condiciones suficientes para, simultáneamente, despolimerizar los oligómeros de glucosa y fermentar la glucosa para formar el producto de fermentación deseado.