



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0619020-0 A2**

(22) Data de Depósito: 27/11/2006
(43) Data da Publicação: 04/12/2012
(RPI 2187)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 19/14
C12P 13/08
C12P 13/14

(54) **Título:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE PELO MENOS UM COMPOSTO ORGÂNICO

(30) **Prioridade Unionista:** 28/11/2005 DE 10 2005 056 667.7

(73) **Titular(es):** BASF SE

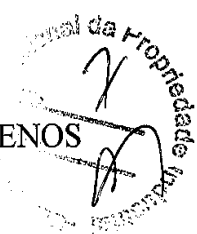
(72) **Inventor(es):** Matthias Boy, Stephan Freyer

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006068928 de 27/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/060235de 31/05/2007

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE PELO MENOS UM COMPOSTO ORGÂNICO. A invenção refere-se a um método para produzir por fermentação pelo menos um composto orgânico compreendendo pelo menos 3 átomos de C ou pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N. O citado método compreende as seguintes etapas: i) uma carga de alimentação de amido é moída com o objetivo de obter um material de moagem que contém pelo menos uma parte dos componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido; ii) o material de moagem é suspenso em um líquido aquoso em uma quantidade tal que o teor de massa seca na suspensão é pelo menos 45% em peso, iii) o componente amiláceo é hidrolisado no material de moagem por liquefação e opcionalmente, subsequente, adoçamento, com o objetivo de obter um meio aquoso M, que contém os componentes amiláceos hidrolisados e pelo menos uma parte dos componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido, é obtida; e iv) a substância aquosa M obtida em etapa iii) é usada para fermentação com o objetivo de cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico; a suspensão obtida em etapa ii) é aquecida em etapa iii) pela introdução de vapor na suspensão, com o objetivo de obter temperaturas maiores do que a temperatura de empastamento do amido obtido nos materiais de moagem.



“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE PELO MENOS UM COMPOSTO ORGÂNICO”

A presente invenção refere-se à produção fermentativa de compostos orgânicos possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N usando, para cultivar os microorganismos, um meio contendo açúcar que compreende pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido.

Tais meios líquidos contendo açúcar são uma fonte de nutriente básica para uma multiplicidade de processos fermentativos; os componentes de açúcar que estão presentes nos meios são metabolizados pelos microorganismos empregados, produzindo produtos orgânicos valiosos. A variedade de metabólitos microbianos assim preparada, i.e. compostos orgânicos, compreende por exemplo compostos voláteis de peso molecular baixo tal como etanol, metabólitos não-voláteis tais como aminoácidos, vitaminas e carotenóides, e uma multiplicidade de outras substâncias.

Dependendo das várias condições de processo, diferentes cargas de alimentação de carbono são exploradas por tais processos fermentativos microbianos geralmente conhecidos. Se estendem desde sacarose pura via beterraba, e melaços de cana-de-açúcar que são conhecidos como melaços de teste alto (melaços de cana-de-açúcar invertidos) a glicose dos hidrolisados de amido. Além disso, ácido acético e etanol são mencionados como co-substratos que podem ser empregados em uma escala industrial para a produção biotecnológica de L-lisina (Pfefferle et al., “Biotechnological Manufacture of Lysine”, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 79 (2003), 59-112).

Baseado nas cargas de alimentação acima mencionadas, vários métodos e procedimentos para a produção fermentativa, baseada em açúcar, de metabólitos microbianos estão estabelecidos. Tomando L-lisina como um exemplo, estes são descritos por exemplo por Pfefferle et al. (loc. cit.) com



relação ao desenvolvimento de cepa, desenvolvimento de processo e produção industrial.

Uma carga de alimentação de carbono importante para a produção fermentativa mediada por microorganismo de metabólitos microbianos é amido. O último tem que ser primeiro liquefeito e sacarificado nas etapas de reação precedente antes de ele poder ser explorado como carga de alimentação de carbono em uma fermentação. Para este fim, o amido é normalmente obtido na forma pré-purificada de uma carga de alimentação de amido natural tal como batatas, mandioca, cereais, por exemplo trigo, milho, cevada, centeio, tritcale ou arroz, e subsequente e enzimaticamente liquefeito e sacarificado, depois do que ele é empregado na fermentação real para a produção de metabólitos desejados.

Em adição ao uso de tais cargas de alimentação de amido pré-purificadas, o uso de cargas de alimentação de amido não-pré-tratadas para a preparação de cargas de alimentação de carbono para a produção fermentativa de metabólitos microbianos também tem sido descrito. Tipicamente, as cargas de alimentação de amido são inicialmente cominuídas por moagem. A massa moída base é então submetida à liquefação e à sacarificação. Visto que esta massa moída base naturalmente compreende, além de amido, uma série de constituintes de não-amido que podem afetar adversamente a fermentação, estes constituintes são normalmente removidos antes da fermentação. A remoção pode ser efetuada quer diretamente após a moagem (WO 02/077252; JP 2001-072701; JP 56-169594; CN 1218111), após a liquefação (WO 02/077252; CN 1173541) quer subsequente e à sacarificação (CN 1266102; Beukema et al.: "Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potato saccharification to give culture medium" (Conference Abstract), Symp. Biotechnol. Res. Neth. (1983), 6; NL8302229). Contudo, todas as variantes envolvem o uso de um hidrolisado de amido substancialmente puro na fermentação.



Novos procedimentos para a produção fermentativa de compostos orgânicos compreendem em particular uma purificação de cargas de alimentação de amido antes da fermentação, por exemplo a purificação de soluções de amido liquefeito e sacarificado (JP 57159500), ou proporcionam métodos que são intencionados para tornar possível a preparação de meios de fermentação a partir de fontes renováveis (EP 1205557).

Cargas de alimentação de amido não processadas, em contraste, são conhecidamente aplicadas em uma grande escala na produção fermentativa de bioetanol. Aqui, as cargas de alimentação de amido, normalmente grãos de cereais integrais, são primeiro submetidas à moagem seca, e o constituinte amido da carga de alimentação de amido é subsequente hidrolisado usando enzimas. Aqui, a hidrólise pode ser realizada em batelada, por exemplo em vasos agitados, se não continuamente, por exemplo em cozinhadore a jato. Descrições de processos adequados podem ser encontradas por exemplo em "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Jaques et al. (Ed.), Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735, Chapter 2, pp. 7 a 23, e em McAloon et al., "Determining the cost of producing ethanol of corn starch and lignocellulosic feedstocks", NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory, October 2000.

Visto que a produção fermentativa de bioetanol o produto de valor é obtido por destilação, o uso de cargas de alimentação de amido do processo de moagem seca na forma não-pré-purificada não constitui um problema sério. Contudo, quando se usa um método de moagem seca para a produção de outros metabólitos microbianos, a corrente de sólidos que é introduzida na fermentação via a solução de açúcar é problemática porque não apenas pode ter um efeito adverso sobre a fermentação, por exemplo em relação à taxa de transferência de oxigênio ou o requerimento de oxigênio dos microorganismos empregados (cf., neste contexto, Mersmann, A. et al.:



“Selection and Design of Aerobic Bioreactors”, Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357-370), mas também pode complicar consideravelmente o processamento subsequente.

Além disso, como um resultado da introdução de sólidos, a viscosidade da suspensão pode alcançar um valor crítico até mesmo quando a suspensão contendo amido estiver sendo preparada, como um resultado do qual por exemplo uma suspensão contendo mais do que 30% em peso de farinha de milho não é mais miscível em água (Industrial Enzymology, 2nd Ed., T. Godfrey, S. West, 1996). Isto limita a concentração de glicose em procedimentos tradicionais. Com relação à produção fermentativa de bioetanol, isto não é mais relevante em até o ponto que concentrações maiores não podem ser convertidas de qualquer maneira em um modo significativo como o resultado da toxicidade dos produtos para as leveduras empregadas para a fermentação.

Alimentação dos meios contendo açúcar de fermentação com uma concentração de açúcar baixa é em princípio desvantajosa na produção fermentativa de metabólitos orgânicos diferentes de etanol porque este procedimento resulta em uma diluição desproporcional do licor de fermentação e, como uma consequência, a concentração final alcançável dos produtos de interesse é reduzida que primeiramente resulta em custos aumentados quando estes produtos são obtidos do meio de fermentação e secundariamente o rendimento de espaço-tempo diminui. Estas considerações são de importância em particular no caso onde um hidrolisado de amido que é produzido para uma produção de bioetanol em volume grande e que tradicionalmente possui concentrações baixas de açúcar ou de glicose de até aproximadamente 30 ou 33% em peso é intencionado para ser alimentado em parte em uma fermentação secundária de volume menor para a produção de outros compostos químicos.

Devido a estas dificuldades e limitações, métodos de moagem



seca como têm sido empregados amplamente para a produção de bioetanol, têm até agora permanecido sem importância econômica particular na produção fermentativa de metabólitos microbianos diferentes de etanol.

Até hoje, tentativas para aplicar o conceito de moagem seca e as vantagens que existem em princípio em conexão com este método, na produção em escala industrial de metabólitos microbianos têm sido apenas descritas usando Mandioca como carga de alimentação de amido. Assim, enquanto que JP 2001/275693 descreve um método para a produção fermentativa de aminoácidos no qual tubérculos de mandioca descascados que têm sido moídos no estado seco são empregados como carga de alimentação de amido, é necessário, para realizar o processo, ajustar o tamanho de partícula da massa moída base para $\leq 150 \mu\text{m}$. Na etapa de filtração que é empregada para este propósito, partes da massa moída base, incluindo constituintes contendo não-amido, são removidas antes de o amido presente ser liquefeito / sacarificado e subsequente fermentado. Neste processo, concentrações de açúcar moderadas são obtidas. Um processo similar é descrito JP 2001/309751 para a produção de um aditivo de alimento contendo aminoácido.

Concentrações de açúcar aumentadas no meio líquido empregado para a fermentação podem ser alcançadas pelo uso de uma massa moída base, para a sacarificação, que largamente compreende o constituinte sólido não-amiláceo da carga de alimentação de amido, pelo processo descrito em WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) da companhia requerente. Surpreendentemente, tem emergido que os constituintes sólidos não-amiláceos que estão presentes na carga de alimentação de amido não necessitam ser removidos antes da fermentação. Um processo similar usando carga de alimentação de amido selecionada dentre grãos de cereais é descrito em PCT/EP2006/066057 (pedido de patente inicial DE 10 2005 042 541,0) da companhia requerente. Contudo, este processo é comparativamente

complicado para a provisão contínua de meios contendo açúcar com uma concentração de açúcar alta.

Um objetivo da presente invenção é proporcionar outro processo para a produção fermentativa de compostos orgânicos que requer nenhuma remoção prévia, pelo menos remoção não completa, dos constituintes sólidos não-amiláceos presentes na carga de alimentação de amido. Em particular, o processo deve tornar possível uma hidrólise contínua do componente amido da carga de alimentação de amido. Além disso, foi para ser distinguido pelo manuseio fácil dos meios usados e por seu uso não problemático no processo de fermentação. Em particular, o processo foi para permitir o uso de cereais como carga de alimentação de amido.

Surpreendentemente, tem sido verificado que um processo fermentativo para a produção de compostos orgânicos pode ser realizado eficientemente a despeito da introdução inerentemente alta de sólidos quando o açúcar que é requerido para a fermentação é proporcionado na forma de um meio aquoso obtido pelas etapas de:

i) moer uma carga de alimentação de amido, assim obtendo uma massa moída base que compreende pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido;

ii) suspender a massa moída base em um líquido aquoso em uma tal quantidade que resulte o teor de matéria seca na suspensão de pelo menos 45% em peso,

iii) hidrolisar o constituinte amiláceo na massa moída base por liquefação e, se apropriado, subsequente sacarificar, por meio do qual é obtido um meio aquoso M que compreende os constituinte amiláceos hidrolisados da carga de alimentação de amido e pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido, onde a hidrólise compreende aquecer a suspensão da massa moída base pela introdução de amido na suspensão em temperaturas acima da temperatura de gelatinização





do amido presente na massa moída base.

A invenção assim proporciona um processo para a produção fermentativa de pelo menos um composto orgânico possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos um 1 átomo de N, compreendendo, em adição às etapas i) e ii), as seguintes etapas de:

iii) hidrolisar o constituinte amiláceo na massa moída base por liquefação e, se apropriado, subsequente sacarificar, o que dá um meio aquoso M que compreende os constituintes amiláceos hidrolisados da carga de alimentação de amido e pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido; e

iv) use do meio aquoso M obtido em etapa iii) na fermentação para cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico;

onde, em etapa iii), a suspensão obtida em etapa ii) é aquecida para temperaturas acima da temperatura de gelatinização do amido presente na massa moída base pela introdução de amido na suspensão.

A despeito do teor de matéria seca alto em uma suspensão empregada para a hidrólise, a hidrólise pode ser realizada sem problemas na maneira de acordo com a invenção, e, conseqüentemente, concentrações altas de açúcares metabolizáveis são obtidas. Surpreendentemente, não importa se o açúcar após a hidrólise está presente na forma de mono- ou dissacarídeos ou na forma de oligossacarídeos (= dextrinas). Surpreendentemente, o teor alto de constituintes sólidos, não-amiláceos da carga de alimentação de amido no meio obtido não interfere com a fermentação. Além disso, problemas de viscosidade que podem ocorrer sob liquefação da carga de alimentação de amido em concentrações de massa moída base mais altas são largamente evitados como o resultado do processo de acordo com a invenção. Como o resultado da concentração alta de açúcares metabolizáveis no meio de



fermentação, que é o resultado do teor alto de matéria seca, o meio pode ser empregado particularmente vantajosamente na fase de alimentação da fermentação, pela qual uma diluição indesejada é largamente evitada ou pelo menos marcadamente reduzida. Naturalmente, o meio M que é obtível de acordo com a invenção é adequado como carga de alimentação de açúcar na fase em batelada da fermentação.

Aqui e aqui abaixo, os termos “componente amido” e “constituente amiláceo” são usados sinonimamente.

Com relação ao meio aquoso M obtido em etapa iii), os termos “meio aquoso”, “meio líquido” e “líquido aquoso contendo açúcar” são usados sinonimamente.

Aqui e aqui abaixo, o termo “liquefação” significa a degradação hidrolítica de amido para dar oligossacarídeos, em particular dextrinas.

Aqui e aqui abaixo, os termos “sacarificação” ou “para sacarificar” significam a hidrólise de dextrinas para dar monossacarídeos, em particular para dar monossacarídeos tal como glicose. Como uma consequência, uma “enzima de sacarificação” é entendida com o significado de uma enzima que hidrolisa dextrinas para dar monossacarídeos.

Aqui e aqui abaixo, o termo “dextrina” significa oligossacarídeos obtidos como o resultado da degradação hidrolítica de amido, cujos oligossacarídeos consistem, como uma regra, de 3 a 18, em particular 6 a 12, unidades de monossacarídeo, em particular de unidades de glicose.

Os termos “teor equivalente de glicose” e “concentração de açúcar” referem-se à concentração total de mono-, di- e oligossacarídeos no meio que está potencialmente disponível para uma fermentação. O termo “equivalentes de glicose” também compreende as unidades de açúcar ou açúcares metabolizáveis que são diferentes de glicose.



Aqui e aqui abaixo, os termos “superproduzir” ou “superprodução” são usados para se referir a um microorganismo com o objetivo de identificar sua característica de produção de um ou mais de seus metabólitos em uma quantidade que ultrapassa a quantidade requerida para a multiplicação do microorganismo, que resulta em um acúmulo no meio de fermentação, sendo possível o acúmulo ocorrer fora ou dentro das células.

Adequadas como cargas de alimentação de amido para a moagem são, principalmente, sementes ou cereais secos onde o amido totaliza pelo menos 40% em peso e preferivelmente pelo menos 50% em peso no estado sólido. São encontrados em muitas plantas de cereal que são correntemente crescidas em grande escala, tais como milho, trigo, aveia, cevada, centeio, tritcale, arroz, beterraba, batatas, mandioca e várias espécies de sorgo e de painço, por exemplo sorgo e milho. A carga de alimentação de amido é preferivelmente selecionada dentre cereal, especialmente preferivelmente dentre milho, centeio, tritcale e grãos de trigo. Em princípio, o processo de acordo com a invenção também pode ser realizado com cargas de alimentação de amido similares tais como, por exemplo, uma mistura de várias sementes ou cereais contendo amido.

Para preparar o meio líquido (1) contendo açúcar, a carga de alimentação de amido em questão é moída em etapa i), com ou sem a adição de líquido, por exemplo água, preferivelmente sem a adição de líquido. Também é possível combinar moagem seca com uma subsequente etapa de moagem.

Aparelhagens que são tipicamente empregadas para moagem seca são moinhos de martelo, moinhos de rotor ou moinhos de rolo; aquelas que são adequadas para moagem úmida são misturadores de pá, moinhos de bola agitados, moinhos de circulação, moinhos de disco, moinhos de câmara anular, moinhos oscilatórios ou moinhos planetários. Em princípio, outros moinhos são também adequados. A quantidade de líquido requerida para



moagem úmida pode ser determinada pelo trabalhador experiente em experimentos de rotina. É normalmente ajustada em uma tal maneira que o teor de matéria seca está dentro da faixa de 10 a 20% em peso.

5 A moagem acarreta um tamanho de partícula que é adequado para as etapas de processo subseqüentes. Neste contexto, tem se provado vantajoso quando a massa moída base obtida na etapa de moagem, em particular a etapa de moagem seca, em etapa i) possui partículas de farinha, i.e. constituintes particulados, com um tamanho de partícula dentro da faixa de 100 a 630 μm em uma quantidade de 30 a 100% em peso, preferivelmente 10 40 a 95% em peso e especialmente preferivelmente 50 a 90% em peso. Preferivelmente, a massa moída base obtida compreende 50% em peso de partículas de farinha com um tamanho de partícula de maior do que 100 μm . Como uma regra, pelo menos 95% em peso das partículas de farinha moídas possuem um tamanho de partícula menor do que 2 mm. Neste contexto, o 15 tamanho de partícula é medido por meio de análise de peneiração usando um analisador de vibração. Em princípio, um tamanho de partícula pequeno é vantajoso para obter um rendimento de produto alto. Contudo, um tamanho de partícula indevidamente pequeno pode resultar em problemas, em particular problemas devido à aglomeração/formação de grumos, quando a massa moída base é transformada em massa fluida durante liquefação ou processamento, 20 por exemplo durante secagem dos sólidos após a etapa de fermentação.

Normalmente, farinhas são caracterizadas pela taxa de extração ou pelo grau de farinha, cuja correlação de um com o outro é tal que a característica do grau de farinha aumenta com o aumento da taxa de 25 extração. A taxa de extração corresponde à quantidade em peso de farinha obtida baseada em 100 partes em peso de massa moída base aplicada. Embora, durante o processo de moagem, farinha ultra-fina, pura, por exemplo do interior do grão de cereal, é inicialmente obtida, com moagem adicional, i.e. com o aumento da taxa de extração a quantidade de teor de casca e fibra



bruta na farinha aumenta e o teor de amido diminui. A taxa de extração é portanto também refletida no que é conhecido como o grau de farinha, que é usado como um número para classificar farinhas, em particular farinhas de cereais, e que é baseado no teor de cinza da farinha (conhecido como escala de cinza). O grau de farinha ou o número de tipo indica a quantidade de cinza (minerais) em mg que é deixada para trás quando 100 g de sólidos de farinha são incinerados. No caso de farinhas de cereais, um número de tipo mais alto significa uma taxa de extração maior porque o núcleo do grão de cereal compreende aproximadamente 0,4% em peso de cinza, enquanto que a casca compreende aproximadamente 5% em peso de cinza. No caso de uma taxa de extração menor, as farinhas de cereais portanto consistem predominantemente do endosperma cominuído, i.e. o teor de amido dos grãos de cereais; no caso de uma taxa de extração maior, as farinhas de cereais também compreendem a camada de aleurona contendo proteína, cominuída dos grãos; no caso de farinha grossa, também compreendem os constituintes do embrião contendo gordura e contendo proteína e das cascas de sementes, que compreendem fibra bruta e cinza. Para os propósitos da invenção, farinhas com uma taxa de extração alta, ou um número de tipo alto, são preferidas em princípio. Se cereal é empregado como carga de alimentação de amido, é preferido que os grãos intactos junto com suas cascas sejam moídos e processados, se apropriado após remoção mecânica antecipada do embrião e das cascas.

De acordo com a invenção, a massa moída base usada compreende pelo menos algum, preferivelmente pelo menos 20% em peso, em particular pelo menos 50% em peso, especificamente pelo menos 90% em peso e muito especificamente pelo menos 99% em peso de constituintes sólidos não-amiláceos que estão presentes nos grãos de cereais moídos, correspondendo à taxa de extração. Baseado nos constituintes amiláceos da massa moída base (e portanto na quantidade de açúcar metabolizável no meio M), os constituintes sólidos não-amiláceos na massa moída base



preferivelmente totalizam pelo menos 10% em peso e em particular pelo menos 15% em peso, por exemplo entre 15 e 75% em peso e especificamente entre 20 e 60% em peso.

5 Subseqüentemente, a massa moída base em etapa ii) é misturada com um líquido aquoso, por exemplo água fresca, água de processo recirculada, por exemplo de fermentação subsequente, ou com uma mistura de líquidos, dando uma suspensão aquosa. Este procedimento é freqüentemente também referido como transformação em massa fluida.

10 Como uma regra, uma tal quantidade da carga de alimentação de amido, ou da massa moída base, será misturada com o líquido aquoso de modo que a suspensão obtida possua o teor de matéria seca de pelo menos 45% em peso, freqüentemente pelo menos 50% em peso, em particular pelo menos 55% em peso, especificamente pelo menos 60% em peso, por exemplo 45 a 80% em peso, preferivelmente 50 a 75% em peso, em particular 55 a 15 70% em peso e especificamente 60 a 70% em peso.

20 Em princípio, é possível pré-aquecer o fluido aquoso usado para suspender a massa moída base sólida para uma temperatura moderadamente aumentada, por exemplo na faixa de 40 a 70°C. É preferido que a temperatura do líquido seja escolhida em uma tal maneira que a suspensão obtida possua uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização, preferivelmente pelo menos 5 K abaixo da temperatura de gelatinização do amido. Preferivelmente, a temperatura da suspensão não ultrapassará 60°C, em particular 55°C.

25 Suspensão da massa moída base particulada no líquido aquoso pode ser realizada quer em batelada quer continuamente na aparelhagem convencionalmente usada para este propósito, por exemplo em batelada em misturadores agitados ou em dispositivos de mistura continuamente operados para misturar sólidos com líquidos, por exemplo em misturadores que operam pelo princípio de rotor/estator.

Para realizar a hidrólise da suspensão aquosa compreendendo a massa moída base é primeiro aquecida para uma temperatura acima da temperatura de gelatinização do amido presente na carga de alimentação de amido ou na massa moída base pela introdução de vapor. A temperatura

5 requerida para o amido específico para este propósito é conhecida por uma pessoa experiente na técnica (veja "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", chapter 2, p. 11, que tem sido mencionado no início ou pode ser determinada por ele por

10 experimentação rotineira. Tipicamente, a suspensão será aquecida em uma temperatura que está pelo menos 10 K e em particular pelo menos 20 K, por exemplo 10 a 100 K, em particular 20 a 80 K, acima da temperatura de gelatinização em questão. Em particular, a suspensão é aquecida para temperaturas dentro da faixa de 90 a 150°C, especificamente dentro da faixa de 100 a 140°C.

15 O vapor empregado para aquecer a suspensão é tipicamente vapor superaquecido com uma temperatura de pelo menos 105°C, em particular pelo menos 110°C, por exemplo 110 a 210°C. O vapor é preferivelmente introduzido na suspensão em uma pressão superatmosférica. Conseqüentemente, o vapor preferivelmente possui uma pressão de pelo

20 menos 150 kPa, por exemplo 150 a 1.600 kPa, em particular 200 a 1,200 kPa.

Como uma regra, vapor é introduzido na suspensão em uma tal maneira que o vapor é introduzido na suspensão na pressão superatmosférica, preferivelmente na pressão superatmosférica de 100 a 1.000 ou 1.100 kPa, em particular 150 a 500 kPa, preferivelmente em velocidade alta. O resultado da

25 introdução do vapor é que a suspensão é instantaneamente aquecida para temperaturas de acima de 90°C, isto é temperaturas acima da temperatura de gelatinização.

Aquecimento com vapor é preferivelmente realizado em um dispositivo de operação contínua que é carregado com a suspensão

Propriedade da Propriedade

continuamente em uma pressão de alimentação específica que é o resultado da viscosidade da suspensão, da vazão de alimentação e da geometria do dispositivo e que, na zona de carregamento de suspensão, é carregada com vapor quente via um bocal ajustável em pressão elevada baseada na pressão de alimentação. Alimentação do vapor em pressão elevada significa que não apenas a suspensão aquecida, mas também energia mecânica é introduzida no sistema, e esta energia mecânica promove uma cominuição adicional das partículas de massa moída base, produz um fornecimento de energia particularmente uniforme, e assim produz gelatinização especialmente uniforme das partículas de amido granular na massa moída base. Estes dispositivos tipicamente possuem uma geometria tubular. O vapor é preferivelmente alimentado ao longo do eixo longitudinal do dispositivo tubular. Como uma regra, a suspensão é fornecida em um ângulo de pelo menos 45° ou em um ângulo reto. O bocal ajustável tipicamente possui uma geometria cônica que se afila na direção de fluxo do vapor. Uma agulha, ou um cone que está arranjado sobre um bastão longitudinalmente deslocável, está arranjado dentro deste bocal. Agulha, ou cone, junto com o cone do bocal, forma uma abertura. Pelo deslocamento da agulha, ou do bastão, longitudinalmente, o tamanho da abertura, e assim a área da seção transversal da extremidade do bocal pode ser ajustada em uma maneira simples, pelo qual a velocidade na qual vapor é fornecido pode ser controlada em uma maneira simples.

Estes dispositivos também são tipicamente equipados com um tubo de mistura para dentro do qual a suspensão é transportada após o vapor ter sido fornecido e no qual a suspensão deixa o dispositivo. Este tubo de mistura está normalmente arranjado ao longo do fornecimento de vapor e perpendicular a alimentação. O tubo de mistura e o bocal juntos tipicamente formam uma abertura através da qual a suspensão é transportada. Como o resultado desta abertura, forças cisalhantes adicionais atuam sobre a



suspensão durante o processo de transporte e assim aumentam o fornecimento de energia mecânica para a suspensão. O tubo de misturação pode ser arranjado em uma tal maneira que é longitudinalmente deslocável. Deslocamento do tubo de misturação é um modo simples de ajustar o tamanho da abertura e assim da queda de pressão dentro do dispositivo.

Tais dispositivos são conhecidos da técnica anterior sob o nome cozinhador a jato comercial, por exemplo o dispositivo que é mostrado em "The Alcohol Textbook", Chapter 2, loc. cit., Figure 13, e comercialmente disponível, por exemplo sob o nome comercial HYDROHEATER® de Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, USA.

Quando a reação é realizada continuamente, a suspensão tratada com vapor é, como uma regra, subseqüentemente transferida para dentro de uma zona de pós-reação com o propósito de continuar a gelatinização dos constituintes do amido. Tipicamente, uma pressão superatmosférica, tipicamente uma pressão absoluta dentro da faixa de 200 a 800 kPa, prevalece na zona de pós-reação. As temperaturas na zona de pós-reação estão tipicamente dentro da faixa de 90 a 150°C. O tempo de residência nesta zona de pós-reação pode estar dentro da faixa de 1 minuto a 4 horas, dependendo da temperatura da suspensão. As zonas de pós-reação tipicamente possuem uma geometria tubular ou colunar. Em uma modalidade, a zona de pós-reação possui a geometria de uma coluna verticalmente arranjada. Aqui, a suspensão, uma vez tendo deixado o dispositivo de tratamento com vapor, é aplicada na zona superior da coluna e removida na zona inferior. Em outra modalidade da invenção, a zona de pós-reação possui uma geometria tubular.

Após a suspensão ter deixado a zona de pós-reação, a pressão é liberada, como uma regra, e uma liquefação é subseqüentemente realizada. Liberação da pressão é preferivelmente realizada na forma de uma evaporação rápida com o objetivo de esfriar a suspensão para, preferivelmente,

temperaturas abaixo de 100°C, em particular abaixo de 85°C. Como uma regra, o amido assim desintegrado é então liquefeito em um vaso de reação separado. A liquefação pode ser realizada como descrito acima.

5 A liquefação pode ser realizada na maneira costumeira. Como uma regra, a liquefação em etapa ii) é realizada na presença de pelo menos uma enzima liquefatora de amido que é, como uma regra, selecionada dentre α -amilases. Outras enzimas que liquefazem amido ativo e estável sob as condições de reação também podem ser empregadas.

10 Para liquefazer a porção de amido na massa moída base, é possível em princípio para empregar todas as enzimas liquefadoras de amido, em particular α -amilases (classe de enzima EC 3.2.1.1), por exemplo as α -amilases que têm sido obtidas de *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus stearothermophilus*, e especificamente aquelas que são usadas para liquefazer substâncias obtidos pelos métodos de moagem seca dentro do escopo da
15 produção de bioetanol. Enzimas preferidas são estáveis à temperatura, i.e. não perdem sua atividade enzimática até mesmo em temperaturas acima da temperatura de gelatinização. as α -amilases que são adequadas para a liquefação também estão comercialmente disponíveis, por exemplo de Novozymes sob o nome comercial Termamyl 120 L, tipo L; ou de Genencor
20 sob o nome comercial Spezyme. Também é possível empregar uma combinação de diferentes α -amilases para a liquefação.

Vantajosamente, as quantidades de enzima liquefatora de amido, em particular α -amilases, são selecionadas em uma tal maneira que é alcançada uma degradação rápida e completa do amido em oligossacarídeos.
25 A quantidade total de enzima liquefatora de amido, em particular α -amilases, está normalmente dentro da faixa de 0,002 a 3,0% em peso, preferivelmente de 0,01 a 1,5% em peso e especialmente preferivelmente de 0,02 a 0,5% em peso, baseado na quantidade total de carga de alimentação de amido empregada, as α -amilases (ou a enzima liquefatora de amido usada) podem

ser inicialmente introduzidas no vaso de reação se não adicionadas durante a etapa de liquefação.

Para uma atividade ótima das α -amilases (ou da enzima liquefatora de amido usada), etapa ii) é preferivelmente realizada - pelo menos por algum tempo - em um valor de pH dentro do pH ótimo da enzima liquefatora, freqüentemente em um valor de pH na faixa fracamente ácida, preferivelmente entre 4,0 e 7,0, especialmente preferivelmente entre 5,0 e 6,5, onde o pH é normalmente ajustado antes da ou no início da etapa ii); este pH é preferivelmente checado usando a liquefação e, se apropriado, reajustado. O pH é preferivelmente ajustado usando ácidos minerais diluídos tais como H_2SO_4 , H_3PO_4 , ou soluções de hidróxido de metal alcalino diluídas tal como NaOH ou KOH.

Para estabilizar as enzimas empregadas, a concentração de íons Ca^{2+} pode, se apropriado, ser ajustada para um valor ótimo específico para enzima, por exemplo usando $CaCl_2$. Valores de concentração adequados podem ser determinados pelo trabalhador experiente em experimentos de rotina. Se, por exemplo Termamyl é empregada como α -amilases, é vantajoso ajustar a concentração de Ca^{2+} para, por exemplo, 10 a 100 ppm, preferivelmente 20 a 80 ppm e especialmente preferivelmente aproximadamente 30 a 70 ppm no meio líquido, a unidade ppm estando baseada em peso e significando g/1.000 kg.

Para totalmente degradar o amido em dextrinas, a mistura reacional é mantida na temperatura ajustada até que a detecção de amido por meio de iodo ou, se apropriado, outro teste para detectar amido for negativo ou pelo menos essencialmente negativo. Se apropriado, uma ou mais outras porções de α -amilases, por exemplo na faixa de 0,001 a 0,5% em peso e preferivelmente de 0,002 a 0,2% em peso, baseado na quantidade total da carga de alimentação de amido empregada, podem ser agora adicionadas na mistura reacional.

Em uma modalidade preferida da invenção, pelo menos alguma ou toda, geralmente pelo menos 50%, em particular pelo menos 80%, se não toda a enzima liquefatora de amido é adicionada na suspensão da massa moída base no líquido aquoso antes do processo de aquecimento com vapor. Nesta maneira, o processo de liquefação já ocorre enquanto a mistura é aquecida para temperaturas de acima da temperatura de gelatinização. Aquecimento com vapor, e a fase de pós-reação, são realizados apropriadamente. Uma etapa de liquefação subsequente em um vaso de reação separado pode ser eliminada. Contudo, uma tal etapa de liquefação etapa será realizada para completar a degradação do amido em dextrinas.

Isto dá um hidrolisado de amido aquoso que compreende porção amilácea liquefeita da massa moída base, tipicamente dextrinas e, se apropriados, outros oligossacarídeos e mono- e dissacarídeos, e os constituintes não-amiláceos da massa moída base, em particular os constituintes sólidos, não-amiláceos da massa moída base empregada para a liquefação.

Este hidrolisado pode ser alimentado diretamente em uma fermentação para a preparação do composto orgânico como o meio aquoso M. Frequentemente, contudo, a sacarificação será realizada. A sacarificação pode ser realizada analogamente aos processos de sacarificação conhecidos da técnica anterior.

A sacarificação pode ser realizada continuamente ou em batelada. Para este fim, o meio líquido é tipicamente sacarificado completamente em um tanque de sacarificação específico antes de ser alimentado por exemplo a uma etapa de fermentação subsequente. Para este fim, o líquido aquoso obtido após a liquefação será tratado com uma enzima que acarreta a sacarificação, tipicamente uma glicoamilase, sob as condições normalmente empregadas para este propósito.

Para a sacarificação das dextrinas (i.e. oligossacarídeos) pode

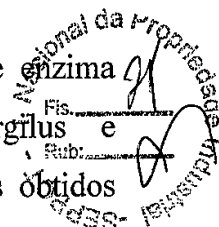
ser feito uso, em princípio, de todas as glicoamilases (classe de enzima EC 3.2.1.3), em particular glicoamilases obtidas de *Aspergillus* especificamente aquelas que são usadas para sacarificar materiais obtidos pelos métodos de moagem seca em conexão com a produção de bioetanol. As

- 5 glicoamilases que são adequadas para a sacarificação também estão comercialmente disponíveis, por exemplo de Novozymes sob o nome comercial Dextrozyme GA; ou de Genencor sob o nome comercial Optidex. Uma combinação de diferentes glicoamilases também pode ser usada.

- 10 A enzima de sacarificação é adicionada no hidrolisado contendo dextrina obtido após a liquefação em uma quantidade de normalmente 0,001 a 5,0% em peso, preferivelmente 0,005 a 3,0% em peso e especialmente preferivelmente 0,01 a 1,0% em peso, baseado na quantidade total da carga de alimentação de amido empregada.

- 15 Como uma regra, a sacarificação é realizada em temperaturas dentro da faixa da temperatura ótima da enzima de sacarificação ou ligeiramente abaixo, por exemplo a 50 a 70°C, preferivelmente a 60 a 65°C. O produto aquoso da liquefação preferivelmente será primeiro trazido para estas temperaturas e subsequenteiramente tratado com a enzima que acarreta a sacarificação. É vantajoso antes adicionar a enzima de sacarificação, por
- 20 exemplo a glicoamilase, para ajustar o pH do hidrolisado líquido para um valor na faixa de atividade ótima da enzima empregada, preferivelmente dentro da faixa de entre 3,5 e 6,0; especialmente preferivelmente entre 4,0 e 5,5 e muito especialmente preferivelmente entre 4,0 e 5,0.

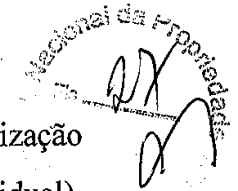
- 25 Após a adição da enzima de sacarificação, a suspensão contendo dextrina é preferivelmente aquecida na temperatura ajustada por um período de, por exemplo, de 2 a 72 horas ou mais longo, se requerido, em particular de 5 a 48 horas, durante cujo tempo as dextrinas são sacarificadas para dar monossacarídeos. O progresso do processo de sacarificação pode ser monitorado pelo trabalhador experiente usando métodos conhecidos, por



exemplo HPLC, ensaios de enzima ou tiras de teste de glicose. A sacarificação tem terminado quando a concentração de monossacarídeo não mais aumenta substancialmente ou cai de novo.

Visto que massa moída base que compreende essencialmente todos os constituintes da carga de alimentação de amido, ou pelo menos, além do amido, também um pouco dos constituintes sólidos não-amiláceos, é empregado para a preparação do meio líquido contendo açúcar (1) (i.e. os constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido não são totalmente removidos), o hidrolisado líquido obtido após a liquefação e opcionalmente sacarificação também compreende um pouco dos ou a quantidade total dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido. Isto freqüentemente acarreta a introdução de uma quantidade de fitato, por exemplo de cereal, cuja quantidade não é omitida. Para evitar o efeito inibitório que assim resulta, é vantajoso adicionar uma ou mais fitases no hidrolisado antes de submeter o último a uma etapa de fermentação. A fitase pode ser adicionada antes da, durante a ou após a liquefação se se for suficientemente estável nas respectivas temperaturas altas. Quaisquer fitases podem ser empregadas desde que sua atividade seja em cada caso não maior do que marginalmente afetada sob as condições de reação. Fitases usadas preferivelmente possuem uma estabilidade térmica (T_{50}) > 50°C e especialmente preferivelmente > 60°C. A quantidade de fitase é normalmente de 1 a 10,000 unidades/kg de carga de alimentação de amido e em particular 10 a 4.000 unidades/kg de carga de alimentação de amido.

Para aumentar o rendimento de açúcar total, ou para obter aminoácidos livres, outras enzimas, por exemplo pululanases, celulasas, hemicelulasas, glicanases, xilanases, glicosidases ou proteases, podem ser adicionadas durante a liquefação ou durante a sacarificação. A adição destas enzimas pode ter um efeito positivo sobre a viscosidade, i.e. viscosidade reduzida (por exemplo por clivagem de glicanos de cadeia longa (também



referidos como de cadeia mais longa) e/ou de (arabino-)xilanos, e realização da liberação de glicosídeos metabolizáveis e a liberação de amido (residual). O uso de proteases possui efeitos positivos análogos, adicionalmente sendo possível liberar aminoácidos que atuam como fatores de crescimento para a fermentação.

Em outra modalidade da invenção, nenhuma sacarificação, ou um sacarificação apenas parcial será realizada antes da fermentação. Neste caso, a sacarificação é realizada pelo menos em parte durante a fermentação, i.e. in situ. Por exemplo, pode ser seguido um procedimento no qual uma parte das dextrinas presentes no meio líquido, por exemplo na faixa de 10 a 90% em peso e em particular dentro da faixa de 20 a 80% em peso, baseado no peso total das dextrinas (ou do amido original) é sacarificada e o meio contendo açúcar resultante é empregado na fermentação. Uma sacarificação adicional pode ser então efetuada in situ no meio de fermentação. Além disso, a sacarificação pode ser realizada diretamente no fermentador, dispensando com um tanque de sacarificação separado.

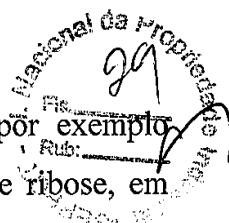
A sacarificação in-situ pode ser realizada com adição de enzimas de sacarificação como descrito acima de se não na ausência de tais enzimas, visto que muitos microorganismos são em si mesmos capazes de metabolizarem oligossacarídeos. Em um tal caso, as dextrinas são capturadas como tais pelo microorganismo e metabolizadas quer hidrolisadas, após uma sacarificação precedente, por enzimas de sacarificação que são intrínsecas à cepa, por exemplo glicoamilases que são intrínsecas à cepa, e então são metabolizadas. Um aspecto particularmente vantajoso do último caso é que a velocidade de sacarificação, em particular de uma liberação de glicose, durante a fermentação é adaptada automaticamente ao requerimento dos microorganismos, primeiramente pela quantidade de biomassa e secundariamente pelo nível de expressão das enzimas de sacarificação que são intrínsecas à cepa.



Vantagens da sacarificação in-situ são em primeiro lugar um gasto de investimento reduzido; em segundo lugar, uma liberação retardada da glicose pode, se apropriada, permitir que seja introduzida uma concentração mais alta de glicose na batelada sem ocorrência de inibição ou de mudanças metabólicas nos microorganismos empregados. Em E. coli, por exemplo, uma concentração de glicose indevidamente alta acarreta a formação de ácidos orgânicos (acetato), enquanto que *Saccharomyces cerevisiae* em um tal caso muda para fermentação, a despeito da presença de oxigênio suficiente em fermentadores aerados (Efeito de Crabtree). Uma liberação retardada de glicose pode ser ajustada pelo controle da concentração de glicoamilase. Isto torna possível suprimir os efeitos acima mencionados, e mais substrato pode ser introduzido inicialmente de modo que diluição, que é o resultado da corrente de alimentação fornecida, pode ser reduzida.

O hidrolisado aquoso obtido após a liquefação e, se apropriado, após qualquer sacarificação que tem sido realizada, i.e. o meio M, tipicamente possui o teor de matéria seca de pelo menos 45% em peso, freqüentemente pelo menos 50% em peso, em particular pelo menos 55% em peso, especificamente pelo menos 60% em peso, por exemplo 45 a 80% em peso, preferivelmente 50 a 75% em peso, em particular 55 a 70% em peso e especificamente 60 a 70% em peso. Conseqüentemente, o meio aquoso M obtido após a hidrólise possui, como uma regra, uma concentração de açúcar - calculada como equivalentes de glicose - de pelo menos 35% em peso, freqüentemente pelo menos 40% em peso, em particular pelo menos 45% em peso, especificamente pelo menos 50% em peso, por exemplo 35 a 70% em peso, em particular 40 a 65% em peso, em particular 45 a 60% em peso e especificamente 50 a 60% em peso, baseado no peso total do meio M.

Dependendo de como o processo é conduzido, os equivalentes de glicose presentes no meio M resultante estão presentes na forma de mono- ou oligossacarídeos, em particular dextrinas. Os componentes principais são



tipicamente monossacarídeos tais como hexoses e pentoses, por exemplo glicose, frutose, manose, galactose, sorbose, xilose, arabinose e ribose, em particular glicose ou oligossacarídeos destes monossacarídeos. A quantidade de monossacarídeos diferentes de glicose na forma livre ou como componente dos oligossacarídeos no meio M pode variar como uma função da carga de alimentação de amido usada e dos constituintes não-amiláceos que ela compreende e pode ser influenciada pelo modo no qual o processo é conduzido, por exemplo a desintegração dos constituintes de celulose pela adição de celulosas. Tipicamente, a porção de glicose, na forma livre ou ligada, dentre os equivalentes de glicose do meio M totaliza de 50 a 99% em peso, em particular de 75 a 97% em peso e especificamente de 80 a 95% em peso, baseado na quantidade total de equivalentes de glicose.

O meio aquoso M obtido em etapa iii) é usado de acordo com a invenção em etapa iv) para a produção fermentativa do composto orgânico desejado. Para este fim, o meio M é submetido à fermentação, onde ele é usado para cultivar os microorganismos empregada na fermentação. O composto orgânico respectivo é obtido neste processo como um metabólito microbiano volátil ou não-volátil.

Como uma regra, o meio contendo dextrina M será esfriado para a temperatura de fermentação, normalmente dentro da faixa de 32 a 37°C, antes de ser fornecido à fermentação.

Se apropriado, o meio aquoso contendo dextrina M pode ser esterilizado antes da fermentação, onde o microorganismos são, como uma regra, destruídos por métodos térmicos ou químicos. Para este fim, o meio aquoso M é normalmente aquecido em temperaturas de acima de 80°C. A destruição, ou lise, das células pode ser realizada imediatamente antes da fermentação. Para este fim, todo o meio M é submetido ao processo de lise, ou destruição. Este pode ser realizado por exemplo térmica ou quimicamente. Contudo, tem se mostrado desnecessário dentro do escopo do processo de



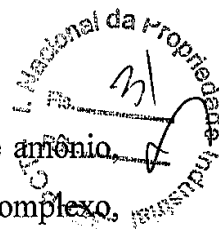
acordo com a invenção realizar a etapa de esterilização como aqui descrito antes da fermentação; em vez disso, tem se provado vantajoso não realizar uma tal etapa de esterilização. Conseqüentemente, uma modalidade preferida da invenção refere-se a um processo no qual o meio M obtido em etapa iii) é
5 fornecido à fermentação diretamente, i.e. sem previamente sofrer um processo de esterilização.

Na fermentação, os açúcares presentes no meio são metabolizados. Se os açúcares presentes no meio estão presentes na forma de oligossacarídeos, especificamente na forma de dextrinas, são capturados pelo
10 microorganismo quer como tais quer após terem sido previamente sacarificados pelas enzimas de sacarificação que quer têm sido adicionadas quer são intrínsecas à cepa, em particular glicoamilases, e metabolizados. Se não são adicionadas enzimas de sacarificação e os açúcares presentes no meio estão presente s na forma de oligossacarídeos, especificamente dextrinas, a
15 sacarificação dos constituintes de amido liquefeito é realizada em paralelo ao metabolismo do açúcar, em particular do monossacarídeo glicose, pelos microorganismos.

A fermentação pode ser realizada na maneira costumeira que é conhecida pelo trabalhador experiente. Para este fim, o microorganismo
20 desejado será, como uma regra, cultivado no meio líquido obtido pelo método aqui descrito.

O método de fermentação pode ser realizado em batelada se não batelada alimentada (incluindo batelada alimentada com colheitas intermediárias), o processo de batelada alimentada sendo preferido.

25 Por exemplo, o meio M obtido pelo método de acordo com a invenção ou uma carga de alimentação de açúcar convencional, i.e. mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis ou media que compreendem mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis, se apropriado após diluição com água e adição de constituintes de meio costumeiros tais como tampões, sais



nutrientes, cargas de alimentação nitrogenadas tais como sulfato de amônio, uréia e semelhantes, constituintes de meio nutriente complexo, compreendendo aminoácidos tais como extratos de levedo, peptonas, CSL e semelhantes, e este microorganismo pode ser multiplicado sob condições de fermentação até que a concentração de microorganismo alcance o estado estacionário que é desejado para a fermentação. Aqui, o açúcar presente no meio de fermentação é metabolizado e o metabólito desejado é formado (também conhecido como processo em batelada ou fase em batelada).

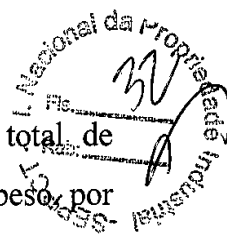
Quando se realiza o processo em batelada alimentada, o meio M é adicionado continuamente ou em batelada no meio de fermentação após a fase em batelada, por exemplo quando a concentração de açúcar total tiver caído abaixo de um valor específico.

Uma modalidade típica do processo de acordo com a invenção é o processo em batelada alimentada que compreende as seguintes etapas de:

v) cultivar o microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico, em um meio de fermentação aquoso F; e

vi) adicionar o meio M no meio de fermentação F no qual os constituintes amiláceos hidrolisados presentes no meio M, i.e. os açúcares, são metabolizadas pelos microorganismos que superproduz o composto orgânico, com geração do composto orgânico.

Em etapa v) é possível, por exemplo, primeiro ajustar um meio contendo açúcar convencional, como uma regra a solução de glicose, para uma concentração de açúcar ajustável pela diluição dele com um líquido aquoso, em particular água, e adicionar os constituintes do meio que são convencionalmente usados para a fermentação, tais como tampões, sais nutrientes, cargas de alimentação de nitrogênio tais como sulfato de amônio, uréia e semelhantes, constituintes de meio nutriente complexo compreendendo aminoácidos tais como extratos de levedo, peptonas, CSL e semelhantes. Aqui, a razão de açúcar para líquido será, como uma regra,



preferivelmente escolhida em um tal modo que a concentração total de monossacarídeos no meio de fermentação F é menor do que 6% em peso, por exemplo está na faixa de > 0 a 5% em peso, calculada como equivalentes de glicose e baseado no peso total do meio de fermentação F. O meio de batelada

5 contendo açúcar assim preparado é inoculado com o microorganismo desejado e o microorganismo é multiplicado no meio de batelada (meio de fermentação F) sob condições de fermentação até que a concentração de microorganismo tenha alcançado um estado estacionário que é desejado para a fermentação. Aqui, o açúcar introduzido no meio de fermentação F é

10 metabolizado, e o metabólito desejado é formado.

A adição de acordo com etapa vi) do meio aquoso M no meio de fermentação F mantém o processo de fermentação, e o metabólito que é superproduzido pelo microorganismo se acumula no licor de fermentação. A razão em volume de meio M que é alimentado no meio de batelada (meio de

15 fermentação F) que foi inicialmente introduzido e que compreende o microorganismos está geralmente dentro da faixa de aproximadamente 1:10 a 10:1 e preferivelmente aproximadamente 1:5 a 5:1 e especificamente dentro da faixa de 1:1 a 5:1. O teor de açúcar no licor de fermentação pode ser controlado em particular via a vazão de alimentação de meio líquido (1)

20 contendo açúcar. Como uma regra, a vazão de alimentação será ajustada em uma tal maneira que o teor de monossacarídeo no licor de fermentação esteja dentro da faixa de $> 0\%$ em peso a aproximadamente 5% em peso e em particular não ultrapassa um valor de 3% em peso.

Em uma modalidade preferida, o meio de fermentação F, em

25 etapa v) (i.e. o meio de batelada no presente caso) compreende essencialmente o meio M, os microorganismos que são capazes de superproduzir o composto orgânico, sais nutrientes, adjuvantes convencionais tais como bases ou tampões e, se apropriado, água para diluição. Para este fim, o meio M será, se apropriado, diluído para a concentração de açúcar



desejada, por exemplo na faixa de 0,1 a 10% em peso, calculada como equivalentes de glicose e baseada no peso total do meio M, usando o diretamente para compor o meio de fermentação F (meio de batelada).

- 5 O teor de açúcar do meio contendo dextrina de acordo com a etapa vi) empregada para manter a fermentação é normalmente mais alto, por exemplo nas faixas acima mencionadas, com o objetivo de minimizar a diluição do meio de fermentação F.

- 10 Preferivelmente, será seguido um procedimento no qual um meio aquoso M com uma concentração de açúcar mais elevada, por exemplo de pelo menos 40% em peso, especificamente pelo menos 45% em peso e muito especificamente pelo menos 50% em peso, calculada como equivalentes de glicose e baseada no peso total do meio aquoso M, é preparado. Este meio M is então usado primeiramente de acordo com a etapa v) após diluição com água para compor o meio de batelada (meio de fermentação F) e secundariamente de acordo com a etapa vi) for adição no meio de fermentação F.

- 20 Naturalmente, de acordo com a invenção, a maior parte do açúcar empregado na fermentação e a ser metabolizado, preferivelmente pelo menos 60% em peso, em particular pelo menos 70% em peso, na fase em batelada e/ou na fase em batelada alimentada origina-se do meio M. Em uma modalidade da invenção, parte do açúcar, por exemplo 1 a 50% em peso, em particular de 5 a 40% em peso e especificamente 10 a 30% em peso, empregada na fermentação a ser metabolizada origina-se das cargas de alimentação de açúcar convencionais. As cargas de alimentação de açúcar convencionais incluem mono- e dissacarídeos tais como glicose e sacarose, mas também meios que compreendem mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que estão essencialmente livres de sólidos que são insolúveis em água, por exemplo xaropes de glicose, xaropes de sacarose, sucos espessos, xaropes de maltose,
- 25



xaropes de dextrina, mas também produtos residuais da produção de açúcar (melaço), em particular melaço da produção de açúcar de beterraba, mas também melaço da produção de cana-de-açúcar.

5 O processo de acordo com a invenção torna possível produzir metabólitos microbianos voláteis e não-voláteis, em particular não-voláteis com pelo menos 3 átomos de C ou com pelo menos 2 átomos de C e 1 átomo de N em um processo fermentativo.

10 Neste contexto, produtos não-voláteis são entendidos com o significado daqueles compostos que não podem ser recuperados por destilação do licor de fermentação sem sofrerem degradação. Como uma regra, estes compostos possuem um ponto de ebulição acima do ponto de ebulição da água, freqüentemente acima de 150°C e em particular acima de 200°C sob pressão atmosférica. Como uma regra, são compostos que estão no estado sólido sob condições padrão (298 K, 101,3 kPa).

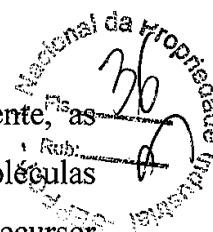
15 Contudo, também é possível empregar o meio líquido M de acordo com a invenção em uma fermentação para a produção de metabólitos microbianos não-voláteis que, sob pressão atmosférica, possuem um ponto de ebulição abaixo do ponto de ebulição da água e/ou uma consistência oleosa.

20 O termo metabólitos microbianos não-voláteis compreende em particular ácidos mono-, di- e tricarboxílicos orgânicos que preferivelmente possuem 3 a 10 átomos de carbono e que, se apropriado, possuem m ou mais, por exemplo 1, 2, 3 ou 4, grupos hidroxila ligados neles, por exemplo ácido tartárico, ácido itacônico, ácido succínico, ácido propiônico, ácido láctico, ácido 3-hidróxi-propionico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido 2,5-furano-
25 dicarboxílico, ácido glutárico, ácido levúlico, ácido glicônico, ácido aconítico e ácido diamino-pimélico, ácido cítrico; aminoácidos proteinogênicos e não-proteinogênicos, por exemplo lisina, glutamato, metionina, fenilalanina, ácido aspártico, triptofano e treonina; bases purina e pirimidina; nucleosídeos e nucleotídeos, por exemplo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e



adenosina-5'-monofosfato (AMP); lipídeos; ácidos graxos saturados e insaturados possuindo preferivelmente 10 a 22 átomos de carbono, por exemplo ácido γ -linolênico, ácido di-homo- γ -linolênico, ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico; dióis possuindo preferivelmente 3 a 8 átomos de carbono, por exemplo propanodiol e butanodiol; alcoóis poliídricos (também referidos como alcoóis de funcionalidade superior) possuindo 3 ou mais, por exemplo 3, 4, 5 ou 6, Grupos OH, por exemplo glicerol, sorbitol, manitol, xilitol e arabinitol; alcoóis de cadeia longa (também referidos como de cadeia mais longa) possuindo pelo menos 4 átomos de carbono, por exemplo 4 a 22 átomos de carbono, por exemplo butanol; carboidratos, por exemplo ácido hialurônico e trealose; compostos aromáticos, por exemplo aminas aromáticas, vanilina e índigo; vitaminas e provitaminas, por exemplo ácido ascórbico, vitamina B₆, vitamina B₁₂ e riboflavina, cofatores e os que são conhecidos como nutracêuticos; proteínas, por exemplo enzimas tais como amilases, pectinases, celulasas ácidas, híbridas ou neutras, esterases tais como lipases, pancreases, proteases, xilanases e óxido-redutases tais como lacase, catalase e peroxidase, glicanases, fitases; carotenóides, por exemplo liconeno, β -caroteno, astaxantina, zeaxantina e cantaxantina; cetonas possuindo preferivelmente 3 a 10 átomos de carbono e, se apropriado, 1 ou mais grupos hidroxila, por exemplo acetona e acetoina; lactonas, por exemplo γ -butirolactona, ciclodextrinas, biopolímeros, por exemplo poli(hidróxi-acetato), poliésteres, por exemplo polilactídeo, polissacarídeos, poliisoprenóides, poliamidas; e precursores e derivados compostos acima mencionados. Outros compostos que são adequados como metabólitos microbianos não-voláteis são descritos por Gutcho em "Chemicals by Fermentation", Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086.

O termo "cofator" compreende compostos não-proteináceos que são requeridos para a ocorrência de uma atividade de enzima normal.



Estes compostos podem ser orgânicos ou inorgânicos; preferivelmente, as moléculas de cofator da invenção são orgânicas. Exemplos de tais moléculas são NAD e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP); o precursor destes cofatores é niacina.

5 O termo “nutracêutico” compreende aditivos de alimento que promovem saúde em plantas e animais, em particular humanos. Exemplos de tais moléculas são vitaminas, antioxidantes e certos lipídeos, por exemplo ácidos orgânicos poliinsaturados.

10 Os metabólitos produzidos são selecionados em particular dentre enzimas, aminoácidos, vitaminas, dissacarídeos, ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C, alcoóis possuindo 4 a 10 átomos de C e alcanodióis possuindo 3 a 10 e em particular 3 a 8 átomos de C.

15 Está claro que o trabalhador experiente que os compostos assim produzidos fermentativamente são obtidos em cada caso na forma enantiomérica produzida pelos microorganismos empregados (se enantiômeros diferentes existirem). Assim, como uma regra, o respectivo L-enantiômero é obtido no caso de aminoácidos.

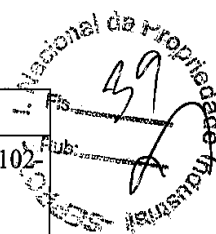
20 Os microorganismos empregados na fermentação dependem em uma maneira per se conhecida dos metabólitos microbianos em questão, como especificado em detalhe aqui abaixo. Podem ser de origem natural ou geneticamente modificados. Exemplos de microorganismos adequados e de processos de fermentação são aqueles dados em Tabela A aqui abaixo:

25 Tabela A:

Substâncias	Microorganismo	Referência
Ácido tartárico	Lactobacilli, (por exemplo Lactobacillus delbrueckii)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),

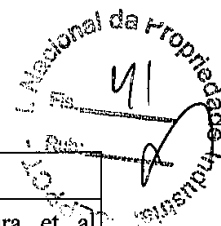
Substâncias	Microorganismo	Referência
Ácido itacônico	Aspergillus terreus, Aspergillus itaconicus	Jakubowska, em Smith e Pateman (Eds.), Genetics and Physiology of Aspergillus, London: Academic Press 1977; Miall, em Rose (Ed.), Economic Microbiology, Vol. 2, pp. 47 – 119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
Ácido succínico	Actinobacillus sp. 130Z, Anaerobiospirillum succiniproducens, Actinobacillus succinogenes, E. coli	Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498 –504 (1976); EP 249773 (1987), Inventores: Lemme e Datta; US 5504004 (1996), Inventores: Guettler, Jain e Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 –342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., “Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain of the bovine rumen”. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan; 49 Pt 1:207-16; US 5.723.322, US 5,573.931, US 5,521.075, WO 99/06532, US 5,869,301, US 5,770,435
Ácido hidróxi-propiónico	Lactobacillus delbrückii, L. leichmannii ou Sporolactobacillus inulinus	RÖMPP Online Version 2.2
Ácido propiónico	Propionibacterium, por exemplo P. arabinosum, P. schermanii, P. freudenreichii, Clostridium propionicum,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido diamino-pimélico	Corynebacterium glutamicum	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido cítrico	Aspergillus niger, Aspergillus wentii	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221–234 (1993); 10, 13–27 (1996).
Ácido aconítico	Aspergillus niger, Aspergillus wentii	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221–234 (1993); 10, 13–27 (1996).; Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995;
Ácido málico	Aspergilli, por exemplo Aspergillus flavus, A. niger, A. oryzae, Corynebacterium	US 3.063.910
Ácido glicônico	Aspergilli, por exemplo A. niger	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido butírico	Clostridium (por exemplo Clostridium acetobutylicum, C. butyricum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995;

Substâncias	Microorganismo	Referência
Ácido láctico	Lactobacillus por exemplo L. delbrückii, L. leichmannii,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995;
Lisina	Corynebacterium glutamicum	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Glutamato	Corynebacterium glutamicum	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Metionina	Corynebacterium glutamicum	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Fenilalanina	Corynebacterium glutamicum, E.coli	Trends Biotechnol. 3, 64 -68 (1985); J. Ferment. Bioeng. 70, 253-260 (1990).
Treonina	E. coli	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Ácido aspártico	E. coli	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35 e referência citadas no mesmo, Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Bases purina e pirimidina	Bacillus subtilis	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	Bacillus subtilis	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Adenosina-5'-monofosfato (AMP)	Bacillus subtilis	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
ácido g-linolênico	Mucor, Mortiella, Aspergillus spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10,2002 (URN etd-1111102-205855).
Dihomo-ácido g-linolênico	Mortiella, Conidiobolus, Saprolegnia spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State



Substâncias	Microorganismo	Referência
		University, 31.10,2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido araquidônico	Mortiella, Phytium spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10,2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido eicosapentaenóico	Mortiella, Phytium spp., Rhodopseudomonas, Shewanella spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10,2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido docosahexaenóico	Thraustochytrium, Entomophthora spp., Rhodopseudomonas, Shewanella spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10,2002 (URN etd-1111102-205855).
Propanodiol	E. coli	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309
Butanodiol	Enterobacter aerogenes, Bacillus subtilis, Klebsiella oxytoca	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), H.G. SCHLEGEL and H.W. JANNASCH, 1981; Afschar et al.: Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol [Microbial production of 2,3-butanediol. CIT 64 (6), 2004, 570-571
Butanol	Clostridium (e. g. Clostridium acetobutylicum, propionicum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Glicerol	Yeast, Saccharo-mycetes rouxii	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Manitol	Aspergillus candida, Torulopsis mannito-faciens	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Arabitol	Saccharomyces rouxii, S. mellis, Sclerotium glucanicum, Pichia ohmeri	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),

Substâncias	Microorganismo	Referência
Xilitol	Saccharomyces cerevisiae	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido hialurônico	Streptococcus spp.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995;
Trealose	Brevibacterium, Corynebacterium, Microbacterium, Arthrobacter spp., Pleurotus genus, Filobasidium floriforme	JP 05099974, JP 06311891, FR 2671099, EP 0555540, JP 3053791, Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: Threalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, Filobasidium floriforme. Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
Ácido ascórbico	Gluconobacter melanogenes	RÖMPP Online Version 2.2
Vitamina B ₁₂	Propionibacterium spp., Pseudomonas denitrificans	Chem. Ber. 1994, 923 –927; RÖMPP Online Version 2.2
Riboflavina	Bacillus subtilis, Ashbya gossypii	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: “New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin”. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48.
Vitamina B ₆	Rhizobium tropici, R. meliloti	EP0765939
Enzimas	Aspergilli (por exemplo Aspergillus niger A. oryzae), Trichoderma, E.coli, Hansenula ou Pichia (por exemplo Pichia pastorius), Bacillus (por exemplo Bacillus licheniformis B. subtilis) and muitos outros	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Zeaxantina	Dunaliella salina	Jin et al (2003) Biotech.Bioeng. 81:115–124
Cantaxantina	Brevibacterium	Nelis et al (1991) J Appl Bacteriol 70:181–191
Liconeno	Blakeslea trispora, Candida utilis	WO 03/056028, EP 01/201762, WO 01/12832, WO 00/77234, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
β-caroteno	Blakeslea trispora, Candida utilis	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene of Blakeslea trispora com Span 20, Biotechnology Letters, Vol 19, Na 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and morphology of Blakeslea trispora in a stirred tank reactor: mathematical modelling, Biochemical Engineering Journal 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226–1229



Substâncias	Microorganismo	Referência
Astaxantina	Phaffia rhodozyma; Candida utilis	US 5,599,711; WO 91/02060, Miura et al. (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
Poliidróxi- alcanoatos, poliésteres	Escherchia coli, Alcaligenes latus, and many outros	S. Y. Lee, "Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria", Tibtech, Vol. 14, (1996), pp. 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (Ed.), Biopolímeros, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim e referência citadas no mesmo
Polissacarídeos	Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, Xanthomonas campestris, and many outros	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Poliisoprenóides	Lactarius sp., Hygrophorus sp., Russula sp.	Steinbüchel (Ed.), Biopolímeros, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim e referência citadas no mesmo
Acetona	Clostridium (for exemplo Clostridium acetobutylicum, C. propionicum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Acetoína	Enterobacter aerogenes, Clostridium acetobutylicum, Lactococcus lactis	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Eds., Biology of the Prokaryotes, Thieme, Stuttgart (1999), p. 307; RÖMPP Online-Edition
Vanilina	Pseudomonas putida, Amycolatopsis sp.	Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296-314 (2001)
Turingensina	Bacillus thuringiensis	Jian-Zhong Jong et al.: Fed-batch culture of Bacillus thuringiensis for thuringensin production in a tower type bioreactor. Biotechnology and Bioengineering 48 (3) (2004), 207-213.
Policetídeos	Streptomyces fradiae, Sorangium cellulosum	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. Pure & Appl. Chem. 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle et al.: Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of Sorangium cellulosum So ce26 in Streptomyces lividans. Microbiology 150 (8), (2004), 2761-74.
Ácido giberélico	Gibberella fujikuroi	Hollmann et al.: Extractive fermentation of Gibberellic acid using Gibberella fujikuroi. CIT 7 (1995), 892-895.
Índigo	Escherichia coli JB 102	Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech índigo. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28 (2002), 127-133.

Em modalidades preferidas da invenção, o composto orgânico que tem sido selecionado dentre ácidos mono-, di- e tricarboxílico que opcionalmente possuem grupos hidroxila ligados neles e que possuem 3 a 10 átomos de C, dentre aminoácidos proteinogênicos e não-proteinogênicos, bases purina, bases pirimidina; nucleosídeos, nucleotídeos, lipídeos; ácidos graxos saturados e insaturados; dióis possuindo 4 a 10 átomos de C, alcoóis poliídricos possuindo 3 ou mais grupos hidroxila, alcoóis de cadeia mais longa possuindo pelo menos 4 átomos de C, carboidratos, compostos aromáticos, vitaminas, provitaminas, cofatores, nutracêuticos, proteínas, carotenóides, cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C, lactonas, biopolímeros e ciclodextrinas.

Uma primeira modalidade preferida da invenção relates to o uso de um meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de enzimas tais como fitases, xilanases ou glicanases.

Uma segunda modalidade preferida da invenção relates to o uso de um meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de aminoácidos tais como lisina, metionina, treonina e glutamato.

Uma outra modalidade preferida da invenção relates to o uso de um meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de vitaminas tais como ácido pantotênico e riboflavina, e os precursores e derivados.

Modalidades adicionalmente preferidas da invenção relate to o uso de um meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de

- ácidos mono-, di- e tricarboxílico, em particular ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, tais como ácido propiônico, ácido fumárico e ácido succínico;



- ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, tal como ácido láctico;
- alcoóis de cadeia mais longa como mencionados acima de, em particular alcoóis possuindo 4 a 10 átomos de C, tal como butanol;
- 5 - dióis como mencionado acima de, em particular alcanodíóis possuindo 3 a 10, em particular 3 a 8, átomos de C, tal como propanodiol;
- cetonas como mencionado acima de, em particular cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C, tal como acetona; e
- carboidratos como mencionado acima de, em particular
- 10 dissacarídeos tal como trealose.

Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação são poli(hidróxi-alcanoatos) tais como poli(3-hidróxi-butirato) e copoliésteres com outros ácidos hidróxi-carboxílicos orgânicos tais como ácido 3-hidróxi-valérico, ácido 4-hidróxi-butírico e outros que são descritos em Steinbüchel (loc. cit.), incluindo por exemplo ácidos hidróxi-carboxílicos de cadeia longa (também referidos como de cadeia mais longa) tais como ácido 3-hidróxi-octanóico, ácido 3-hidróxi-decanóico e ácido 3-hidróxi-tetradecanóico, e misturas destes. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos

15 análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em S.Y. Lee, "Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria", Tibtech, Vol. 14, (1996), pp. 431-438, podem ser empregados.

Em uma modalidade preferida, os microorganismos que são

25 empregados na fermentação são portanto selecionados dentre microorganismos naturais ou recombinantes que superproduzem pelo menos um dos seguintes metabólitos:

- enzimas tais como fitase, xilanase ou glicanase;
- aminoácidos tais como lisina, treonina ou metionina;

- vitaminas tais como ácido pantotênico e riboflavina e seus precursores e/ou derivados;
- dissacarídeos tal como trealose;
- ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, tais como ácido propiônico, ácido fumárico e ácido succínico;
- ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C tal como ácido láctico;
- poli(hidróxi-alcanoatos) tais como poli(3-hidróxi-butirato) e copoliésteres de ácido 3-hidróxi-butírico;
- cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C tal como acetona;
- alcoóis possuindo 4 a 10 átomos de C tal como butanol; e alcanodióis possuindo 3 a 8 átomos de C tal como propanodiol.

Microorganismos adequados são normalmente selecionados dentre os gêneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* e *Clostridium*, em particular dentre cepas de *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* ou *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhizopus arrhizus* e *Rhizopus oryzae*.

Em uma modalidade preferida, o microorganismo empregado na fermentação é uma cepa do gênero *Corynebacterium*, em particular uma cepa de *Corynebacterium glutamicum*. Em particular, é uma cepa do gênero *Corynebacterium*, especificamente de *Corynebacterium glutamicum*, que superproduz um aminoácido, especificamente lisina, metionina ou glutamato.

Em uma outra modalidade preferida, o microorganismo



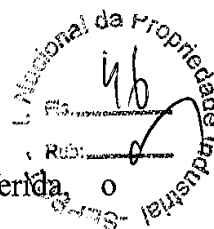
empregado na fermentação é uma cepa do gênero *Escherichia*, em particular uma cepa de *Escherichia coli*. Em particular, é uma cepa do gênero *Escherichia*, especificamente de *Escherichia coli*, que superproduz um aminoácido, especificamente lisina, metionina ou treonina.

- 5 Em uma modalidade preferida específica, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é lisina. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em Pfefferle et al., loc. cit. e US 3.708.395, podem ser empregados. Em princípio, ambos um
- 10 modo de operação contínua e um modo de operação descontínua (batelada ou batelada alimentada) são adequados, com o modo em batelada alimentada sendo preferido.

- Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é metionina.
- 15 Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em WO 03/087386 e WO 03/1.00072, podem ser empregados.

- Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é ácido
- 20 pantotênico. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em WO 01/021772, podem ser empregados.

- Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é riboflavina.
- 25 Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1.186.664 e Fujioka, K.: "New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin". *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48, podem ser empregados.

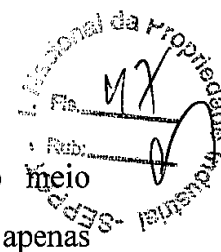


Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é ácido fumárico. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em Rhodes et al, "Production of Fumaric Acid in 20-L Fermentors", Applied Microbiology, 1962, 10 (1), 9-15, podem ser empregados.

Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é ácido succínico. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498 -504 (1976); EP 249773 (1987), de Lemme e Datta; US 5504004 (1996), de Guettler, Jain e Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 -342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., "Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain of the bovine rumen". Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:207-16; US 5.723.322, US 5,573.931, US 5.521.075, WO 99/06532, US 5.869.301 ou US 5.770.435, podem ser empregados.

Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é uma fitase. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em WO 98/55599, podem ser empregados.

A fermentação gera um licor de fermentação que, em adição ao metabólito microbiano desejado, essencialmente compreende a biomassa produzida durante a fermentação, os constituintes não-metabolizados da solução de amido liquidificado e, em particular, os constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido tais como, por exemplo, fibras e açúcares não utilizados, e também tampão e sais nutrientes não utilizados. No presente pedido, este meio líquido também é referido como licor de



fermentação, o licor de fermentação também compreendendo o meio contendo dextrina (I) no qual os açúcares presentes têm sido apenas submetidos à conversão fermentativa parcial ou incompleta, i.e. no qual uma metabolização microbiana parcial ou incompleta dos açúcares utilizáveis (por exemplo mono- e dissacarídeos) tem ocorrido.

Antes do isolamento ou da depleção de um metabólito microbiano ou antes da remoção dos constituintes voláteis do licor de fermentação, uma etapa de esterilização, se apropriado, realizada na maneira acima descrita.

Uma modalidade específica (I) da invenção refere-se a um processo no qual pelo menos um metabólito microbiano é exaurido ou isolado do licor de fermentação. A maior parte dos constituintes voláteis do licor de fermentação é subsequenteiramente removida, produzindo uma composição de proteína sólida ou semi-sólida. Uma descrição mais detalhada para realizar um tal processo, e da composição de proteína obtida, é tema de WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) da companhia requerente, à qual se faz referência com relação a outros detalhes.

O isolamento ou depleção dos metabólitos do licor de fermentação, i.e. o composto orgânico possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos um átomo de N (aqui abaixo também referido como produto de valor) é normalmente realizado em um tal modo que pelo menos um metabólito é exaurido ou isolado do licor de fermentação de modo que o teor deste metabólito no licor de fermentação que permanece não seja maior do que 20% em peso, em particular não maior do que 10% em peso, especificamente não maior do que 5% em peso e muito especificamente não maior do que 2,5% em peso, em cada caso baseado no peso total do licor de fermentação restante.

O metabólito microbiano pode ser isolado ou exaurido do licor de fermentação em uma ou mais etapas. Uma etapa essencial neste contexto é



a remoção dos constituintes sólidos do licor de fermentação. Esta pode ser realizada quer antes quer depois do isolamento do produto de valor. Métodos convencionalmente usados na técnica que também compreendem etapas para a limpeza grosseira e a purificação fina dos produtos de valor e para a
5 formulação são conhecidos tanto para o isolamento dos produtos de valor quanto para a remoção de sólidos, i.e. separação de fases sólida-líquida (por exemplo descrita em Belter, P.A., "Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology", John Wiley & Sons (1988), e "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", 5th ed. em CD-ROM CD-ROM, Wiley-VCH).

10 Para isolar o produto de valor, um procedimento pode ser vantajosamente seguido no qual os constituintes sólidos são primeiro removidos do licor de fermentação, por exemplo por meio de centrifugação ou filtração, e o produto de valor é subsequenteiramente isolado da fase líquida, por exemplo por cristalização, precipitação, adsorção ou destilação. Como
15 uma alternativa, o produto de valor também pode ser isolado diretamente do licor de fermentação, por exemplo pelo uso de métodos extrativos ou métodos cromatográficos. Um método cromatográfico que tem que ser mencionado em particular é cromatografia de troca iônica, onde o produto de valor pode ser isolado seletivamente na coluna de cromatografia. Neste caso, a remoção dos
20 sólidos do licor de fermentação que permanece é vantajosamente realizada por exemplo por decantação, evaporação e/ou secagem.

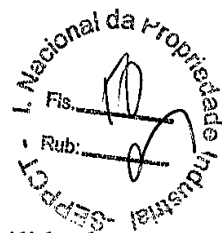
No caso de compostos oleosos ou voláteis, é, como uma regra, necessário monitorar as temperaturas máximas durante processamento, em particular durante secagem. Estes compostos também podem ser
25 vantajosamente preparados por formulação delas na forma pseudo-sólida sobre adsorventes. Adsorventes que são adequados para este propósito são detalhados por exemplo em WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) da companhia requerente. Exemplos de compostos que podem ser vantajosamente preparados nesta maneira são ácido γ -linolênico, ácido di-



homo- γ -linolênico, ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico, ácido docosaheptaenóico, ademais ácido propiônico, ácido láctico, propanodiol, butanol e acetona. Estes compostos na formulação pseudo-sólida também são entendidos como sendo, para os propósitos da presente invenção, metabólitos microbianos não-voláteis na forma sólida.

Uma outra modalidade específica (II) refere-se a um processo no qual os constituintes voláteis do licor de fermentação são substancialmente removidos, sem isolamento ou depleção prévia de um metabólito microbiano não-volátil, e, se apropriado, sem remoção prévia de pelo menos alguns constituintes sólidos, produzindo uma formulação sólida de um metabólito microbiano não-volátil. Uma descrição mais detalhada para realizar um tal processo pode ser encontrada em PCT/EP2006/066057 (pedido de patente inicial DE 10 2005 042 541,0) da companhia requerente.

"Substancialmente" significa que, uma vez tendo sido removidos os constituintes voláteis, um resíduo sólido ou pelo menos semi-sólido permanece que pode, se apropriado, ser convertido em produto sólido pela adição de sólidos. Como uma regra, isto significa a remoção dos constituintes voláteis decrescentemente para um teor de umidade residual de não maior do que 30% em peso, freqüentemente não maior do que 20% em peso e em particular não maior do que 15% em peso. Como uma regra, os constituintes voláteis do licor de fermentação vantajosamente serão removidos do licor de fermentação decrescentemente para um teor de umidade residual dentro da faixa de 0,2 a 30% em peso, preferivelmente 1 a 20% em peso, especialmente preferivelmente 2 a 15% em peso e muito especialmente preferivelmente 5 a 15% em peso, baseado no peso total dos constituintes sólidos determinado após secagem. O teor de umidade residual pode ser determinado por métodos convencionais com os quais o trabalhador experiente está familiarizado, por exemplo, por meio de termogravimetria (Hemminger et al., "Methoden der thermischen Analyse" [Métodos de



Análise Térmica], Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989).

Obtenção de metabólito(s) não-volátil(eis) na forma sólida do licor de fermentação pode ser efetuada em uma, duas ou mais etapas, em particular em procedimentos de uma ou duas etapas. Como uma regra, pelo menos um etapa, em particular a etapa final, para obter o metabólito na forma sólida compreenderá uma etapa de secagem.

No procedimento de uma etapa, os constituintes voláteis do licor de fermentação serão removidos, se apropriado após a remoção preliminar acima mencionada, até que o teor de umidade residual desejado seja alcançado.

No procedimento de duas ou multi-etapas, o licor de fermentação primeiro será concentrado, por exemplo por filtração (microfiltração, ultrafiltração) ou termicamente por evaporação de uma parte dos constituintes voláteis. A quantidade de constituintes voláteis que é removida nesta etapa totaliza, como uma regra, a 10 a 80% em peso e em particular 20 a 70% em peso, baseado na matéria seca dos constituintes voláteis do licor de fermentação. Em uma ou mais etapas subseqüentes, os constituintes voláteis restantes do licor de fermentação são removidos até que o teor de umidade residual desejado tenha sido alcançado.

De acordo com esta modalidade (II), os constituintes voláteis são essencialmente removidos do meio líquido sem depleção prévia ou realmente isolamento do produto de valor. Como uma consequência, quando se removem os constituintes voláteis do licor de fermentação, o metabólito não-volátil essencialmente não é removido junto com os constituintes voláteis do meio líquido, mas permanece no resíduo resultante junto com pelo menos uma parte, normalmente com a maior parte dos e em particular com todos os outros constituintes sólidos do licor de fermentação. Conseqüentemente, contudo, também é possível remover quantidades - preferivelmente pequenas - do metabólito microbiano não-volátil desejado, como uma regra não mais do

que 20% em peso, por exemplo 0,1 a 20% em peso, preferivelmente não mais do que 10, em particular não mais do que 5% em peso, especialmente preferivelmente não mais do que 2,5% em peso e muito especialmente preferivelmente não mais do que 1% em peso, baseado na matéria seca total do metabólico, junto com os constituintes voláteis do licor de fermentação quando se removem estes constituintes. Em uma modalidade muito especialmente preferida, o metabólito microbiano não-volátil desejado permanece em pelo menos 90% em peso, em particular pelo menos 95% em peso, especificamente 99% em peso e muito especificamente aproximadamente 100% em peso, em cada caso baseado no peso seco total do metabólito, como sólido em mistura com a porção dos constituintes sólidos do meio de fermentação que tem sido obtido após a remoção dos constituintes voláteis, ou com todos os constituintes sólidos do meio de fermentação.

Se desejado, uma porção, por exemplo 5 a 80% em peso e em particular 30 a 70% em peso, dos constituintes sólidos não-amiláceos pode ser separada do licor de fermentação, por exemplo por meio de centrifugação ou filtração, antes de os constituintes voláteis serem removidos. Se apropriado, uma tal separação preliminar será realizada com o objetivo de remover partículas sólidas mais grossas que não compreendem ou compreendem apenas quantidades pequenas de, metabólito microbiano não-volátil. Esta filtração preliminar pode ser realizada usando métodos convencionais que são conhecidos pelo trabalhador experiente, por exemplo usando peneiras grossas, redes, placas de orifício perfurado ou semelhantes. Se apropriado, partículas sólidas grossas também podem ser separadas em um separador de força centrífuga. O equipamento aqui empregado, tal como decantador, centrífugas, sedimentador-decantador e separadores também são conhecidos pelo trabalhador experiente. Nesta maneira, um resíduo sólido ou semi-sólido, por exemplo pastoso é obtido que compreende o metabólito não-volátil e os constituintes não-voláteis, geralmente sólidos, não-amiláceos da carga de

alimentação de amido ou pelo menos grandes porções do mesmo, freqüentemente pelo menos 90% em peso ou todos os constituintes sólidos não-amiláceos.

5 As propriedades dos metabólitos secos, que está presente junto com os constituintes sólidos da fermentação, podem ser formuladas em uma maneira per se conhecida especificamente com relação à variedade de parâmetros tais como teor de substância ativa, tamanho de partícula, forma de partícula, tendência a empoar, higroscopicidade, estabilidade, em particular estabilidade de armazenagem, cor, odor, comportamento de fluidez, tendência
10 para aglomerar, carga eletrostática, sensibilidade à luz e sensibilidade à temperatura, estabilidade mecânica e redispersibilidade, pela adição de auxiliares de formulação tais como veículo e materiais de revestimento, aglutinantes e outros aditivos.

Os auxiliares de formulação que são convencionalmente
15 usados incluem, por exemplo, aglutinantes, materiais veículo, adjuvantes de fluxo / de polvilhação, ademais pigmentos de cor, biocidas, dispersantes, antiespumantes, reguladores de viscosidade, ácidos, álcalis, antioxidantes, estabilizadores de enzima, inibidores de enzima, absorbatos, gorduras, ácidos graxos, óleos ou misturas destes. Tais auxiliares de formulação são
20 vantajosamente empregados como auxiliares de secagem em particular quando se usam métodos de secagem e formulação tais como secagem por pulverização, secagem em leito fluidizado e secagem por congelamento. Outros detalhes são encontrados em PCT/EP2006/066057 (pedido inicial DE 10 2005 042 541,0).

25 A quantidade dos aditivos acima mencionados e, se apropriados, outros aditivos tais como materiais de revestimento pode variar grandemente, dependendo dos requerimentos específicos do metabólito em questão e das propriedades dos aditivos empregados e pode estar por exemplo na faixa de 0,1 a 80% em peso e em particular dentro da faixa de 1 a 30% em

peso, em cada caso baseado no peso total da mistura de produto ou substância em sua forma formulada acabada.

5 A adição de auxiliares de formulação pode ser efetuada antes do, durante o ou após o processamento do licor de fermentação (também referido como design de sólidos ou formulação de produto), em particular durante secagem. Uma adição de auxiliares de formulação antes do processamento do licor de fermentação ou do metabólito pode ser vantajosa em particular para melhorar a processabilidade das substâncias ou dos produtos a serem processados. Os auxiliares de formulação podem ser 10 adicionados no metabólito obtido na forma sólida se não em uma solução ou suspensão compreendendo o metabólito, por exemplo diretamente no licor de fermentação após a fermentação ter sido completada ou em uma solução ou suspensão obtida durante o processamento ou antes da etapa de secagem final.

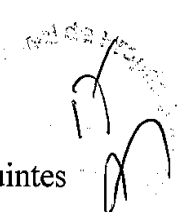
Assim, por exemplo, os auxiliares podem ser misturados com a 15 suspensão de metabólito microbiano; uma tal suspensão também pode ser aplicada em um material veículo, por exemplo por pulverização sobre ou misturação em. A adição de auxiliares de formulação durante secagem pode ser de importância por exemplo quando uma solução ou suspensão compreendendo o metabólito estiver sendo pulverizada. Uma adição de 20 auxiliares de formulação é efetuada em particular após secagem, por exemplo quando se aplicam camadas de revestimento / revestimentos nas partículas secas. Adjuvantes adicionais podem ser adicionados no produto tanto após a secagem quanto após uma etapa de revestimento opcional.

Remoção dos constituintes voláteis do licor de fermentação é 25 efetuada em uma maneira per se conhecida por métodos costumeiros para separação de fases sólidas de fases líquidas, incluindo métodos de filtração e métodos de evaporação de constituintes voláteis das fases líquidas. Tais métodos, que também podem compreender etapas para limpeza grosseira dos produtos de valor e etapas de formulação, são descritos, por exemplo em

Belter, P. A, "Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology", John Wiley & Sons (1988), e "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", 5th ed. em CD-ROM CD-ROM, Wiley-VCH. Métodos, equipamento, auxiliares e modalidades gerais ou específicas que são conhecidos pelo trabalhador experiente que podem ser empregados dentro do escopo da formulação ou processamento de produto após o término da fermentação são adicionalmente descritos em 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 e WO 92/12645.

10 Em uma primeira variante desta modalidade (II), o metabólito microbiano não-volátil, se presente na forma dissolvida na fase líquida, serão convertidos da fase líquida na fase sólida, por exemplo por cristalização ou precipitação. Depois, os constituintes sólidos não-voláteis, incluindo o metabólito, são separados, por exemplo por meio de centrifugação, decantação ou filtração. Metabólitos oleosos também podem ser separados em 15 uma maneira similar, os produtos de fermentação oleosos em questão sendo convertidos em uma forma sólida pela adição de adsorventes, por exemplo sílica, geles de sílica, marga, argila e carvão ativo.

20 Em uma segunda variante desta modalidade (II), os constituintes voláteis são removidos por evaporação. A evaporação pode ser efetuada em uma maneira per se conhecida. Exemplos de métodos adequados para evaporação de constituintes voláteis são secagem por pulverização, secagem em leito fluidizado ou aglomeração em leito fluidizado, secagem por congelamento, secadores pneumáticos e secadores de contato, e secagem por 25 extrusão. Uma combinação dos métodos acima mencionados com métodos conferindo forma tais como extrusão, pelletização ou agregação também pode ser realizada. Nos últimos métodos mencionados, é preferível empregar misturas de substância compreendendo metabólito parcial ou largamente pré-secas.



Em uma modalidade preferida, a remoção dos constituintes voláteis do licor de fermentação compreende um método de secagem por pulverização ou um método de secagem em leito fluidizado, incluindo granulação em leito fluidizado. Para este fim, o licor de fermentação, se

5 apropriado após uma separação preliminar para remover partículas sólidas grossas que compreendem apenas quantidades pequenas de metabólito microbiano não-volátil, se houver, é alimentado a uma ou mais aparelhagens de secagem em leito fluidizado ou de secagem por pulverização. O transporte, ou a alimentação, do licor de fermentação carregado de sólidos é

10 convenientemente efetuado por meio de dispositivos de transporte costumeiros para líquidos compreendendo sólidos, por exemplo bombas, tais como bombas de fuso de rotor único excêntricas (por exemplo de Delasco PCM) ou bombas de pressão alta (por exemplo de LEWA Herbert Ott GmbH).

15 Uma fermentação usando o meio líquido (1) contendo açúcar de acordo com a invenção também pode ser realizada em um tal modo que

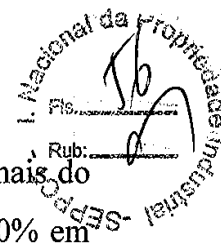
vii) uma porção de não maior do que 50% em peso, por exemplo na faixa de 5 a 45% em peso, baseado no peso total, é removido de o meio M obtido em etapa iii) que compreende constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido, o restante é fornecido a uma

20 fermentação para a produção de um primeiro metabólito (A), por exemplo um metabólito não-volátil (A) na forma sólida ou um metabólito volátil (A); e

viii) esta porção, se apropriado após tendo sido previamente removido todos ou um pouco dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga

25 de alimentação de amido, é fornecida a uma fermentação para a produção de um segundo metabólito (B), que é idêntico ao, ou diferente de, o metabólito (A).

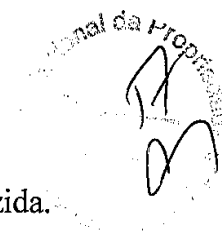
Se os constituintes sólidos não-amiláceos de (vii) são separados, o teor de sólidos da porção restante do meio M totaliza



preferivelmente não mais do que 50% em peso, particularmente não mais do que 30% em peso, especialmente preferivelmente não mais do que 10% em peso e muito especialmente preferivelmente não mais do que 5% em peso. Em um tal caso, é particularmente preferido separar todo o sólido antes da fermentação para a produção do segundo metabólito (B).

Este procedimento torna possível, na fermentação preparada de vii), o uso de microorganismos para os quais certos requerimentos mínimos, por exemplo com relação à taxa de transferência de oxigênio, têm que ser atendidos. Microorganismos adequados que são empregados na fermentação preparada de vii) são, por exemplo, espécies *Bacillus*, preferivelmente *Bacillus subtilis*. Os compostos produzidos por tais microorganismos na fermentação separada são selecionados em particular de vitaminas, cofatores e nutracêuticos, bases purina e pirimidina, nucleosídeos e nucleotídeos, lipídeos, ácidos graxos saturados e insaturados, compostos aromáticos, proteínas, carotenóides, especificamente de vitaminas, cofatores e nutracêuticos, proteínas e carotenóides, e muito especificamente de riboflavina e pantotenato de cálcio.

Uma modalidade preferida deste procedimento refere-se à produção paralela de metabólitos idênticos (A) e (B) em duas fermentações separadas. Isto é vantajoso em particular em um caso onde aplicações diferentes do mesmo metabólito possuem requerimentos de pureza diferentes. Conseqüentemente, o primeiro metabólito (A), por exemplo um aminoácido a ser usado como aditivo de alimento, por exemplo lisina, metionina, treonina, ou glutamato é produzido usando o licor de fermentação contendo sólidos e o mesmo segundo metabólito (B), por exemplo o mesmo aminoácido usado como aditivo de alimento, é produzido usando o licor de fermentação empobrecido em sólidos de viii). Devido à remoção completa ou parcial dos constituintes sólidos não-amiláceos, a complexidade da purificação quando se processa o metabólito cujo campo de aplicação possui o requerimento de



pureza maior, por exemplo como aditivo de alimento, pode ser reduzida.

Em uma outra modalidade preferida, este procedimento pode ser realizado por exemplo como segue. Uma fermentação de volume preferivelmente grande para a produção de metabólitos A, por exemplo aminoácidos tais como lisina, metionina, glutamato ou treonina, de ácido cítrico ou de etanol, é implementada de acordo com os processos descritos em WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) ou PCT/EP2006/066057 (pedido inicial DE 10 2005 042 541,0), ou de acordo com os processos conhecidos para a produção fermentativa de bioetanol. De acordo com vii), algum do meio M obtido em etapa iii) é removido. A porção removida de acordo com vii) pode ser liberada de acordo com viii) completamente ou em parte dos sólidos por métodos costumeiros, por exemplo centrifugação ou filtração, dependendo do que é requerido na fermentação para a produção de B. O meio M obtido neste modo, que é opcionalmente totalmente ou parcialmente liberado dos sólidos, é, de acordo com viii), alimentada a uma fermentação para a produção de um metabólito B. Uma corrente de sólidos separada de acordo com viii) é vantajosamente retornada para a corrente do meio M da fermentação de volume grande.

Se o metabólito microbiano (A) que é produzido na fermentação de volume grande é etanol, o meio M produzido em etapa iii) possui concentrações de mono-, di- ou oligossacarídeos que são usuais na produção fermentativa de etanol (bioetanol), por exemplo na faixa de 25 a 33% em peso. Aqui, também, a separação de sólidos de acordo com a etapa viii) é realizada de acordo com os requerimentos de fermentação para produzir o respectivo metabólito B.

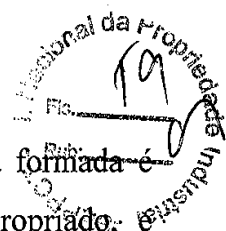
Em uma modalidade preferida do procedimento descrito acima, o metabólito B produzido pelos microorganismos na fermentação é riboflavina. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por



exemplo em WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 e Fujioka, K.: "New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin". *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48, podem ser empregados.

- 5 Para realizar esta variante do processo, uma fermentação preferivelmente de volume grande é implementada para a produção de metabólitos A, por exemplo de aminoácidos tais como lisina, metionina ou glutamato, de ácido cítrico ou de etanol, como descrito acima de. De acordo com vii), algum do meio M obtido em etapa iii) é removido e liberado de
- 10 acordo com viii) completamente ou em parte dos sólidos por métodos costumeiros, por exemplo centrifugação ou filtração. O meio M obtido do mesmo, que está essencialmente totalmente ou parcialmente liberado dos sólidos, is, de acordo com viii), alimentado a uma fermentação para a
- 15 produção de metabólito B, neste caso riboflavina. A corrente de sólidos separada de acordo com viii) é vantajosamente retornada para a corrente do meio M da fermentação de volume grande.

- O licor de fermentação contendo riboflavina que é assim gerado de acordo com viii) pode ser processado por condições e procedimentos análogos aos que têm sido descritos para outras cargas de
- 20 alimentação de carbono, por exemplo em DE 4037441, EP 464582, EP 438767 e DE 3819745. após a lise da massa celular, a riboflavina, que está presente na forma cristalina, é separada, preferivelmente por decantação. outros modos de separação de sólidos, por exemplo filtração, também são possíveis. Depois, a riboflavina é seca, preferivelmente por meio de secadores
- 25 por pulverização e secadores de leito fluidizado. Como uma alternativa, a mistura de fermentação contendo riboflavina produzida de acordo com viii) pode ser processada sob condições análogas e usando procedimentos análogos como descrito em, por exemplo, EP 1048668 e EP 730034. após pasteurização, o licor de fermentação é centrifugado, e a fração contendo



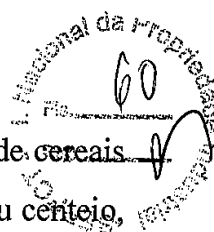
sólidos restante é tratada com um ácido mineral. A riboflavina formada é removida do meio aquoso ácido por filtração, lavada, se apropriado, e subsequente mente seca.

Em uma outra modalidade preferida deste procedimento, o metabólito B produzido pelos microorganismos na fermentação é ácido pantotênico. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em WO 01/021772, podem ser empregados.

Para realizar esta variante de processo, um procedimento tal como descrito acima para riboflavina pode ser seguido. O meio M que tem sido submetido a uma purificação preliminar de acordo com viii) e que tem sido preferivelmente essencialmente liberado de sólidos, é alimentado a uma fermentação de acordo com viii) para a produção de ácido pantotênico. Aqui, o fato de que a viscosidade é reduzida em comparação com o meio líquido contendo sólidos é particularmente vantajoso. A corrente de sólidos separada é preferivelmente retornada para a corrente do meio líquido (1) contendo açúcar da fermentação de volume grande.

O licor de fermentação contendo ácido pantotênico de acordo com viii) pode ser processado sob condições análogas e usando procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em EP 1 050 219 e WO 01/83799. Após todo o licor de fermentação ter sido pasteurizado, os sólidos restantes são separados, por exemplo por centrifugação ou filtração. A corrente límpida obtida na etapa de separação de sólidos é parcialmente evaporada, se apropriado tratado com cloreto de cálcio e seca, em particular seca por pulverização.

Os sólidos que têm sido separados podem ser obtidos juntos com o respectivo metabólito microbiano (A) desejado (A) dentro do escopo do processo de fermentação de volume grande paralelo.



Após a etapa de secagem e/ou formulação, os grãos de cereais moídos preferivelmente de milho, trigo, cevada, painço, triticle e/ou centeio, podem ser adicionados na composição de proteína ou formulação de processo.

- Os exemplos que seguem são intencionados para ilustrarem aspectos individuais da presente invenção, mas em nenhuma maneira não são para serem entendidos como limitantes.

Exemplos

I. Moagem da carga de alimentação de amido

- As massas moídas base empregadas aqui abaixo foram produzidas como segue. Grãos de milho integrais foram moídos completamente usando um moinho de rotor. Usando diferentes batedores, percursos de moagem ou elementos de peneira, foram obtidos três graus diferentes de finura. Uma análise de peneiração da massa moída base por meio de uma peneira de vibração de laboratório (analisador por vibração: Retsch Vibrotronic type VE1; tempo de peneiração de 5 minutos, amplitude: 1,5 mm) deram os resultados listados em Tabela I.

Tabela I

Número do experimento	T 70/03	T 71/03	T 72/03
< 2 mm / %	99,4	100	100
< 0,8 mm / %	66	100	99
< 0,63 mm / %	58,6	98,5	91
< 0,315 mm / %	48,8	89	65
< 0,1 mm / %		25	9,6
< 0,04 mm / %		8	3,2
Massa moída base no total	20 kg	11,45 kg	13,75 kg

II. Liquefação enzimática de amido e sacarificação de amido

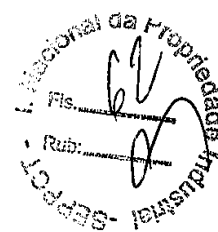
II.1.) Liquefação no cozinhador a jato

- Para continuamente liquefazer uma farinha de milho moída seca, dois tanques agitados possuindo a volume de 250 L são configurados; cada hora, a farinha de milho que tem sido transformada em uma massa fluida com água é alimentada alternadamente de cada um deles no cozinhador a jato. Tipicamente, estes tanques são configurados em um tal modo que 117 kg de água são introduzidos, e uma α -amilase, por exemplo Termamyl SC, é

adicionada na água em uma concentração de 0,10% em peso (baseado na quantidade de farinha empregada). Depois, 133 kg de farinha de milho são alimentados a aproximadamente 45°C em uma pluralidade de etapas e misturados. Após ajuste da concentração de Ca^{2+} de 50 ppm, por exemplo pela adição de CaCl_2 , o pH é ajustado em uma faixa de entre 5,6 e 5,8. Após todos os componentes terem sido adicionados, a suspensão de farinha de milho é misturada totalmente por agitação até ser usada no cozinhador a jato. Esta suspensão é então alimentada ao cozinhador a jato a 250 kg/h em uma pressão de 500 kPa. Aquecimento da suspensão de farinha de milho para além da temperatura de gelatinização a 105°C é realizada pela provisão de 25 kg/h de vapor em paralelo (750 kPa). Em um reator tubular com um tempo de residência de 5 minutos, que está arranjado a jusante do cozinhador a jato, um pouco do amido gelatinizado é degradado em dextrinas (liquefação 1). Depois, a temperatura da mistura reacional é reduzida por evaporação rápida para 90°C, em cujo processo saem aproximadamente 5 kg/h de vapor. Então, a segunda liquefação é realizada a 90°C em um outro reator tubular durante um período de 100 minutos com o objetivo de totalmente degradar o amido em dextrinas. A mistura reacional resultante é então esfriada para a temperatura de sacarificação de 61°C por vaporização rápida renovada, em cujo processo são perdidos aproximadamente 14 kg/h de água.

II.1) Sacarificação

Uma porção da mistura reacional obtida em II.1) foi sacarificada em um teste aleatório. Para este fim, aproximadamente 1.000 g da mistura reacional foram transferidos para um tanque agitado e mantidos a 61°C com agitação constante. Agitação foi continuada durante toda a duração do experimento. Após o pH ter sido ajustado para 4,3 usando H_2SO_4 , 17,9 g (15,2 mL) de Dextrozyme GA (Novozymes A/S) foram adicionados. A temperatura foi mantida por aproximadamente 3 horas, durante cujo processo o curso da reação foi monitorado por HPLC. No final, a concentração de



glicose foi de 420 g/kg.

III. Cepa

ATCC13032 lysC^{fbr}

Em alguns dos seguintes exemplos, foi empregada uma cepa modificada de *Corynebacterium glutamicum*, que havia sido descrita em WO 05/059144 sob o nome comercial ATCC13032 lysC^{fbr}.

Exemplo 1

Hidrolisado de farinha de milho liquefeito e sacarificado que havia sido preparado como descrito em protocolo II foi empregado nos testes de frasco agitado usando *Corynebacterium glutamicum*.

Cepa

Foi usado o tipo selvagem modificado com aspartocinase de retro-alimentação-desregulada ATCC13032 lysC^{fbr}.

Preparação de inóculo

As células foram riscadas sobre ágar estéril CM+CaAc (composição: veja Tabela 1; 20 minutos a 121°C) e então incubadas durante a noite a 30°C. As células foram subsequentemente raspadas das placas e ressuspensas em solução salina. 25 mL do meio (veja Tabela 2) em frascos Erlenmeyer de 250 mL equipados com dois defletores foram inoculadas em cada caso com uma quantidade tal de suspensão celular assim preparada que a densidade óptica alcançou um valor de OD₆₁₀ de 0,5 a 610 nm.

Tabela 1: Composição das placas de ágar CM+CaAc

Concentração	Constituinte
10,0 g/L	D-glicose
2,5 g/L	NaCl
2,0 g/L	Uréia
5,0 g/L	Peptona Bacto (Difco)
5,0 g/L	Extrato de levedo (Difco)
5,0 g/L	Extrato de carne bovina (Difco)
20,0 g/L	Casaminoácidos
20,0 g/L	Ágar

Preparação do licor de fermentação

A composição do meio do frasco é listada em Tabela 2. O teste

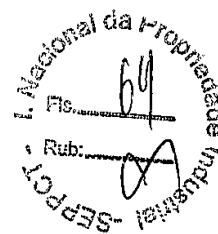
foi realizado em uma determinação tripla.

Tabela 2: Meio do frasco

Hidrolisado de farinha de milho	143	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	g/L
Uréia	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
Ácido cítrico x H ₂ O	0,49	g/L
Ácido 3,4-di-hidróxi-benzóico	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 7 H 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 pantotênico	125	mg/L
Cianocobalamina (Vit B ₁₂)	1	µg/L
Ácido 4-amino-benzóico (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
CSL	40	mL/L
pH*	6,85	

* ajustado com solução aquosa diluída de NaOH

- Após a inoculação, os frascos foram incubados por 48 horas a
- 5 30°C e com agitação (200 rpm) em um agitador umidificado. Após o término da fermentação, o teor de glicose e o teor de lisina foram determinados por HPLC. As análises por HPLC foram realizadas com um sistema Agilent 1100 series LC. A concentração de aminoácido foi determinada por meio de
- 10 HPLC. Derivação de pré-coluna com orto-ftaldeído permite a quantificação do aminoácido formado; a mistura de aminoácido é separada usando uma



coluna Agilent Hypersil AA.

Exemplo 2:

Hidrolisado de farinha de milho liquefeito e sacarificado que havia sido preparado pelo protocolo II foi empregado em experimentos de frasco agitado usando *Aspergillus niger*.

Cepa

Uma cepa de produção de fitase de *Aspergillus niger* com 6 cópias do gene *phyA* de *Aspergillus ficuum* sob o controle do promotor *glaA* foi produzida analogamente à preparação de NP505-7, que é descrita em detalhe em WO98/46772. Uma cepa com 3 amplicons *glaA* modificados (análoga à ISO505), mas sem cassetes de expressão de *phyA* integrados foi usada como o controle.

Preparação de inóculo

20 mL de meio de pré-cultura (veja Tabela 3) em frascos Erlenmeyer de 100 mL equipados com um defletor são inoculados em cada caso com 100 μ L de uma cultura liofilizada e incubados por 24 h a 34°C em um agitador umidificado, com agitação (170 rpm).

Tabela 3: Composição de meio de pré-cultura

Constituinte	Concentração
Glicose	30,0 g/L
Peptona de caseína	10,0 g/L
Extrato de levedo	5,0 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,5 g/L
ZnCl ₂	30 mg/L
CaCl ₂	20 mg/L
MnSO ₄ × 1 H ₂ O	9 mg/L
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	3 mg/L
Tween 80	3,0 g/L
Penicilina	50 000 IU/l
Estreptomicina	50 mg/L
pH*	5,5

* ajustado com ácido sulfúrico diluído

50 mL do meio de cultura principal (veja Tabela 4) em frascos Erlenmeyer de 250 mL equipados com um defletor são inoculados em cada

caso com 5 mL de pré-cultura.

Preparação do licor de fermentação

A composição do meio do frasco é listada em Tabela 4. Dois frascos foram configurados com cada amostra.

5

Tabela 4: Meio do frasco

Hidrolisado de farinha de milho	166 g/L
Peptona de caseína	25,0 g/L
extrato de levedo	12,5 g/L
KH_2PO_4	1,0 g/L
K_2SO_4	2,0 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g/L
ZnCl_2	30 mg/L
CaCl_2	20 mg/L
$\text{MnSO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$	9 mg/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	3 mg/L
Penicilina	50 000 IU/l
Estreptomicina	50 mg/L
pH*	5,6

*a ser ajustado com ácido sulfúrico diluído

Após a inoculação, os frascos foram incubados em um agitador umidificado por 6 dias a 34°C com agitação (170 rpm). Após a interrupção da fermentação, a atividade de fitase foi determinada com ácido fítico como substrato e em um nível adequado de atividade de fitase (padrão: 0,6 U/mL) em tampão ácido acético / acetato de sódio 250 mM / Tween 20 (0,1% em peso), pH 5,5. O ensaio foi padronizado para a aplicação em placas de microtítulo (MTPs). 10 µL da solução de enzima foram misturados com 140 µL de solução de fitato 6,49 mM em tampão acetato de sódio 250 mM, pH 5,5 (fitato: sal de dodecassódio de ácido fítico). Após incubação a 37°C por uma hora, a reação foi interrompida pela adição de um volume igual (150 µL) de ácido tricloroacético. Uma alíquota desta mistura (20 µL) foi transferida para dentro de 280 µL de uma solução compreendendo H_2SO_4 0,32 N, 0,27% em peso de molibdato de amônio e 1,08% em peso de ácido ascórbico. Isto foi seguido pela incubação por 25 minutos a 50°C. A absorção da solução azul foi medida a 820 nm.



REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção fermentativa de pelo menos um composto orgânico possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N, caracterizado pelo fato de
5 compreender as seguintes etapas de:

i) moer uma carga de alimentação de amido, assim obtendo uma massa moída base que compreende pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido;

10 ii) suspender a massa moída base em um líquido aquoso em uma tal quantidade que resulte o teor de matéria seca na suspensão de pelo menos 45% em peso,

15 iii) hidrolisar o constituinte amiláceo na massa moída base por liquefação e, se apropriado, subsequente sacarificar, pelo qual é obtido um meio aquoso M que compreende os constituintes amiláceos hidrolisados da carga de alimentação de amido e pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido; e

iv) usar o meio aquoso M obtido em etapa iii) em uma fermentação para cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico;

20 onde, em etapa iii), a suspensão obtido em etapa ii) é aquecida para temperaturas acima da temperatura de gelatinização do amido presente na massa moída base pela introdução de vapor na suspensão.

25 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o aquecimento com vapor é realizado em um cozinhador a jato.

3. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a suspensão aquecida da massa moída base é esfriada por evaporação rápida para temperaturas abaixo da temperatura de gelatinização e a liquefação do amido é subsequente



realizada na presença de uma enzima liquefatora de amido.

4. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma enzima liquefatora de amido é adicionada na suspensão antes do aquecimento.

5 5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a hidrólise do amido compreende a etapa de sacarificação.

10 6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender as seguintes etapas de:

v) cultivar o microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico em um meio de fermentação aquoso F que compreende açúcares metabolizáveis; e

15 vi) adicionar o meio aquoso M no meio de fermentação F, durante cujo processo os constituintes amiláceos hidrolisados presentes no meio aquoso M são metabolizados pelos microorganismos com formação do composto orgânico.

20 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o meio de fermentação F, em etapa v), essencialmente compreende o meio aquoso M, os microorganismos que são capazes de superproduzir o composto orgânico, sais nutrientes, adjuvantes convencionais e água para diluição.

25 8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a massa moída base empregada em etapa ii) compreende pelo menos 20% de constituintes sólidos, não-amiláceos da carga de alimentação de amido que estão presentes na carga de alimentação de amido.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que grãos de cereais são usados como



a carga de alimentação de amido.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a enzima liquefatora de amido é uma α -amilase.

5 11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o composto orgânico que tem sido selecionado dentre ácidos mono-, di- e tricarboxílicos que opcionalmente possuem grupos hidroxila ligados neles e que possuem 3 a 10 átomos de carbono, dentre aminoácidos proteinogênicos e não-proteinogênicos, bases purina, bases pirimidina; nucleosídeos, nucleotídeos, lipídeos; ácidos graxos saturados e insaturados; dióis possuindo 4 a 10 átomos de carbono, alcoóis poliídricos possuindo 3 ou mais grupos hidroxila, alcoóis de cadeia longa possuindo pelo menos 4 átomos de carbono, carboidratos, compostos aromáticos, vitaminas, provitaminas, cofatores, nutracêuticos, proteínas, carotenóides, cetonas possuindo 3 a 10 átomos de carbono, lactonas, biopolímeros e ciclodextrinas.

15 12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o microorganismo empregado para a fermentação é selecionado dentre microorganismos naturais ou recombinantes que superproduzem pelo menos um dos seguintes metabólitos: enzimas, aminoácidos, vitaminas, dissacarídeos, ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C, alcoóis possuindo 4 a 10 átomos de C, alcanodióis possuindo 20 3 a 8 átomos de C e poli(hidróxi-alcanoatos).

25 13. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre aqueles que superproduzem um ou more aminoácidos.

14. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado



pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre aqueles que superproduzem um ou more ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C.

5 15. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre aqueles que superproduzem um ou more enzimas.

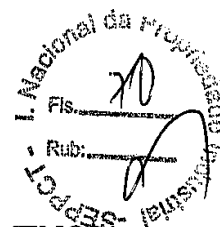
16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre aqueles que superproduzem uma fitase.

10 17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os microorganismos são selecionados dentre os gêneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Clostridium* e *Rhizopus*.

15 18. Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre cepas do gênero *Corynebacterium*.

20 19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que pelo menos um metabólito microbiano é exaurido ou isolado do licor de fermentação e os constituintes voláteis do licor de fermentação são subseqüentemente substancialmente removidos, sendo obtida uma composição de proteína sólida ou semi-sólida.

25 20. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que pelo menos alguns dos constituintes voláteis do licor de fermentação são removidos sem prévio isolamento ou depleção de um metabólito microbiano não-volátil e, se apropriado, sem prévia remoção de constituintes sólidos, sendo obtida uma formulação sólida de um metabólito microbiano não-volátil.



RESUMO

“PROCESSO PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE PELO MENOS UM COMPOSTO ORGÂNICO”

A invenção refere-se a um método para produzir por fermentação pelo menos um composto orgânico compreendendo pelo menos 3 átomos de C ou pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N. O citado método compreende as seguintes etapas: i) uma carga de alimentação de amido é moída com o objetivo de obter um material de moagem que contém pelo menos uma parte dos componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido; ii) o material de moagem é suspenso em um líquido aquoso em uma quantidade tal que o teor de massa seca na suspensão é pelo menos 45% em peso, iii) o componente amiláceo é hidrolisado no material de moagem por liquefação e opcionalmente, subsequente, adoçamento, com o objetivo de obter um meio aquoso M, que contém os componentes amiláceos hidrolisados e pelo menos uma parte dos componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido, é obtida; e iv) a substância aquosa M obtida em etapa iii) é usada para fermentação com o objetivo de cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico; a suspensão obtida em etapa ii) é aquecida em etapa iii) pela introdução de vapor na suspensão, com o objetivo de obter temperaturas maiores do que a temperatura de empastamento do amido obtido nos materiais de moagem.