



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 056 668 A1** 2007.05.31

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 056 668.5**

(22) Anmeldetag: **28.11.2005**

(43) Offenlegungstag: **31.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12P 1/00** (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

(71) Anmelder:

BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(74) Vertreter:

Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679 München

(72) Erfinder:

Pompejus, Markus, Dr., Seoul, KR; Freyer, Stephan, Dr., 67434 Neustadt, DE; Lohscheidt, Markus, Dr., 69121 Heidelberg, DE; Zelder, Oskar, Dr., 67346 Speyer, DE; Boy, Matthias, Dr., 63225 Langen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Fermentative Herstellung organischer Verbindungen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung wenigstens einer organischen Verbindung mit mindestens 3 C-Atomen oder mit mindestens 2 C-Atomen und mindestens 1 N-Atom durch Fermentation, umfassend die folgenden Schritte:

a1) Vermahlen einer Stärkequelle unter Erhalt eines Mahlguts, das wenigstens einen Teil der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle enthält;

a2) Suspendieren des Mahlguts in einer wässrigen Flüssigkeit und Hydrolyse des Stärkeanteils im Mahlgut durch enzymatisches Verflüssigen und gegebenenfalls anschließendes Verzuckern, wobei man ein erstes, Mono- oder Oligosaccharide enthaltendes Flüssigmedium (1) erhält; und

b) Zugabe des Flüssigmediums (1) zusammen mit verstoffwechselbaren Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden oder einer Zusammensetzung, die verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthält und die im Wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen, zu einem Fermentationsmedium, das einen Mikroorganismus enthält, welcher zur Überproduktion der organischen Verbindung befähigt ist, unter Fermentationsbedingungen.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die fermentative Herstellung organischer Verbindungen mit mindestens 3 C-Atomen oder mit mindestens 2 C-Atomen und mindestens 1 N-Atom unter Einsatz eines zuckerhaltigen Mediums, das zumindest einen Teil der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle umfasst, zur Kultivierung der Mikroorganismen.

[0002] Zuckerhaltige Flüssigmedien sind eine grundlegende Nährstoffquelle für viele Fermentationsverfahren; die in den Medien enthaltenen Zuckeranteile werden von den eingesetzten Mikroorganismen verstoffwechselt, wobei man organische Wertprodukte erhält. Die Palette derart hergestellter mikrobieller Stoffwechselprodukte, d.h. organischer Verbindungen, umfasst hierbei z.B. niedermolekulare flüchtige Verbindungen wie Ethanol, nichtflüchtige Stoffwechselprodukte wie Aminosäuren, Vitamine und Carotenoide sowie eine Vielzahl weiterer Stoffe.

[0003] Für solche allgemein bekannten mikrobiellen Fermentationsverfahren werden in Abhängigkeit von den verschiedenen Verfahrensbedingungen unterschiedliche Kohlenstoffquellen genutzt. Diese reichen von reiner Saccharose über Rüben- und Zuckerrohrmelasse, sogenannten „high test molasses“ (invertierte Zuckerrohrmelasse) bis hin zu Glucose aus Stärkehydrolysaten. Für die biotechnologische Herstellung von L-Lysin werden darüber hinaus Essigsäure und Ethanol als großtechnisch einsetzbare Co-Substrate genannt (Pfefferle et al., *Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 79 (2003), 59–112).

[0004] Auf Basis der genannten Kohlenstoffquellen sind verschiedene Methoden und Vorgehensweisen zur zuckerbasierten, fermentativen Herstellung mikrobieller Stoffwechselprodukte etabliert. Am Beispiel des L-Lysins werden diese beispielsweise von Pfefferle et al. (a.a.O.) im Hinblick auf Stammentwicklung, Prozessentwicklung und großtechnische Produktion beschrieben.

[0005] Eine wichtige Kohlenstoffquelle für die durch Mikroorganismen vermittelte fermentative Herstellung mikrobieller Stoffwechselprodukte ist Stärke. Diese muss in vorgelagerten Reaktionsschritten zunächst verflüssigt und verzuckert werden, bevor sie als Kohlenstoffquelle in einer Fermentation genutzt werden kann. Hierzu wird die Stärke aus einer natürlichen Stärkequelle wie Kartoffeln, Cassava, Getreide, z.B. Weizen, Mais, Gerste, Roggen, Triticale oder Reis üblicherweise in vorgereinigter Form gewonnen und anschließend enzymatisch verflüssigt und verzuckert, um dann in der eigentlichen Fermentation zur Produktion der gewünschten Stoffwechselprodukte eingesetzt zu werden.

[0006] Neben dem Einsatz derartig vorgereinigter Stärkequellen ist auch die Verwendung nicht aufgereinigter Stärkequellen zur Herstellung von Kohlenstoffquellen für die fermentative Produktion mikrobieller Stoffwechselprodukte beschrieben worden. Typischerweise werden die Stärkequellen dabei zunächst durch Mahlen zerkleinert. Das Mahlgut wird dann einer Verflüssigung und Verzuckerung unterworfen. Da dieses Mahlgut naturgemäß neben Stärke noch eine Reihe von nicht-stärkehaltigen Bestandteilen enthält, welche die Fermentation nachteilig beeinflussen können, werden diese Bestandteile üblicherweise vor der Fermentation abgetrennt. Die Entfernung kann entweder direkt nach dem Mahlen (WO 02/277252; JP 2001-072701; JP 56169594; CN 1218111), nach der Verflüssigung (WO 02/277252; CN 1173541) oder im Anschluss an die Verzuckerung (CN 1266102; Beukema et al.: *Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potatoe saccharification to give culture medium* (Conference Abstract), *Symp. Biotechnol. Res. Neth.* (1983), 6; NL8302229) erfolgen. In allen Varianten wird jedoch ein weitgehend reines Stärkehydrolysat in der Fermentation eingesetzt.

[0007] Neuere Verfahren zur fermentativen Herstellung von organischen Verbindungen umfassen insbesondere eine Aufreinigung der Stärkequellen vor der Fermentation z.B. die Aufreinigung von verflüssigten und verzuckerten Stärkelösungen (JP 57159500), oder stellen Methoden bereit, welche die Herstellung von Fermentationsmedien aus erneuerbaren Ressourcen (EP 1205557) ermöglichen sollen.

[0008] Nicht aufgereinigte Stärkequellen hingegen werden in großem Umfang bei der fermentativen Herstellung von Bioethanol eingesetzt. Hierbei werden die Stärkequellen, üblicherweise ganze Getreidekörner, zunächst trocken vermahlen und anschließend der Stärkebestandteil der Stärkequelle unter Einwirkungen von Enzymen hydrolysiert. Dabei kann die Hydrolyse sowohl diskontinuierlich, z.B. in Rührkesseln, als auch kontinuierlich, z.B. in Jet-Kochern durchgeführt werden. Entsprechende Prozessbeschreibungen finden sich z.B. in „The Alcohol Textbook – A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries“, Jaques et al. (Hg.), Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735, Kapitel 2, S. 7 bis 23, und in McAloon et al., „De-

termining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks", NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory, October 2000.

[0009] Da bei der fermentativen Herstellung von Bioethanol das Wertprodukt durch Destillation gewonnen wird, stellt der Einsatz von Stärkequellen aus dem Dry-Milling-Prozess in nicht vorgereinigter Form kein gravierendes Problem dar. Bei der Anwendung eines Dry-Milling-Verfahrens zur Herstellung anderer mikrobieller Stoffwechselprodukte ist jedoch der über die Zuckerlösung in die Fermentation eingetragene Feststoffstrom problematisch, da dieser sich sowohl negativ auf die Fermentation auswirken kann, z.B. im Hinblick auf die Sauerstofftransferrate bzw. den Sauerstoffbedarf der eingesetzten Mikroorganismen (vgl. hierzu Mersmann, A. et al.: Selection and Design of Aerobic Bioreactors, Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357–370) als auch die anschließende Aufarbeitung nicht unerheblich erschweren kann.

[0010] Zudem kann durch den Feststoffeintrag bereits bei der Herstellung der stärkehaltigen Suspension die Viskosität der Suspension einen kritischen Wert erreichen, wodurch z.B. eine Suspension mit mehr als 30 Gew.-% Maismehl in Wasser nicht mehr homogen mischbar ist (Industrial Enzymology, 2. Aufl., T. Godfrey, S. West, 1996). Dadurch ist bei herkömmlichem Vorgehen die Glucosekonzentration begrenzt. Dies ist im Hinblick auf die fermentative Bioethanol-Herstellung insofern nicht weiter relevant, da höhere Konzentrationen aufgrund der Toxizität des Produkts für die zur Fermentation eingesetzten Hefen ohnehin nicht sinnvoll umgesetzt werden könnten.

[0011] Bei der fermentativen Herstellung anderer organischer Stoffwechselprodukte als Ethanol ist es prinzipiell von Nachteil, der Fermentation zuckerhaltige Medien mit geringer Zuckerkonzentrationen zuzuführen, weil dies zu einer überproportionalen Verdünnung der Fermentationsbrühe führt und sich folglich die erreichbare Endkonzentration der Wertprodukte verringert, was einerseits erhöhte Kosten bei deren Gewinnung aus dem Fermentationsmedium verursacht und die Raum-Zeit-Ausbeute abnimmt. Diese Erwägungen sind insbesondere für den Fall maßgeblich, wenn ein für eine großvolumige Bioethanol-Produktion hergestelltes Stärkehydrolysat, das herkömmlicherweise geringe Zucker- bzw. Glucosekonzentrationen von bis zu etwa 30 oder 33 Gew.-% aufweist, teilweise einer geringervolumigen Nebenfermentation zur Herstellung anderer Chemikalien zugeführt werden soll.

[0012] Aufgrund der dargestellten Schwierigkeiten und Einschränkungen sind Dry-Milling-Verfahren, wie sie für die Bioethanolherstellung in breitem Umfang eingesetzt werden, bei der fermentativen Herstellung anderer mikrobieller Stoffwechselprodukte als Ethanol bislang ohne wesentliche wirtschaftliche Bedeutung geblieben.

[0013] Versuche zur Übertragung des Dry-Milling-Konzepts und der mit diesem Verfahren verbundenen prinzipiellen Vorteile auf die großtechnische Herstellung mikrobieller Stoffwechselprodukte sind bisher lediglich unter Verwendung von Cassava als Stärkequelle beschrieben worden. So beschreibt die JP 2001/275693 ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, bei dem man als Stärkequelle geschälte Cassavaknollen einsetzt, die trocken vermahlen wurden. Zur Durchführung des Verfahrens ist es jedoch erforderlich, eine Teilchengröße des Mahlgutes von $\leq 150 \mu\text{m}$ einzustellen. Bei der dazu angewendeten Filtration werden Teile des eingesetzten Mahlguts, einschließlich nicht-stärkehaltiger Bestandteile, vor der Verflüssigung/Verzuckerung der enthaltenen Stärke und der anschließenden Fermentation abgetrennt. Bei diesem Verfahren werden mäßige Zuckerkonzentrationen erreicht. Ein ähnliches Verfahren wird in der JP 2001/309751 zur Herstellung eines aminosäurehaltigen Futterzusatzes beschrieben.

[0014] Erhöhte Zuckerkonzentrationen in dem zur Fermentation eingesetzten Flüssigmedium können bei Einsatz eines Mahlguts zur Verzuckerung, das weitgehend die festen, nicht-stärkehaltigen Bestandteile der Stärkequelle enthält, durch das in der älteren Patentanmeldung PCT/EP2005/005728 der Anmelderin beschriebene Verfahren erreicht werden. Eine Abtrennung der in der Stärkequelle enthaltenen festen, nicht-stärkehaltigen Bestandteile vor der Fermentation hat sich dabei überraschenderweise als nicht erforderlich erwiesen. Ein ähnliches Verfahren unter Einsatz von unter Getreidekörnern ausgewählten Stärkequellen wird in der älteren Patentanmeldung DE 10 2005 042 541.0 der Anmelderin beschrieben. In einigen Fällen wurde eine Hemmung oder Verzögerung der Vermehrung der Mikroorganismen beobachtet.

[0015] Es war daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein weiteres Verfahren zur Herstellung organischer Verbindungen durch Fermentation bereitzustellen, das keine oder zumindest keine vollständige vorherige Abtrennung der in der Stärkequelle enthaltenen, nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile erfordert. Außerdem sollte es sich durch eine leichte Handhabbarkeit der verwendeten Medien und deren problemlosen Einsatz in der Fermentation auszeichnen. Insbesondere sollte das Verfahren die Verwendung von Getreide als Stärkequelle erlauben.

[0016] Es wurde überraschend gefunden, dass sich die hier geschilderten Probleme des Standes der Technik dadurch überwinden lassen, indem man zunächst durch Vermahlen, Verflüssigen und Verzuckern von Stärkequellen ohne vorheriges Abtrennen der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle ein erstes zuckerhaltiges Flüssigmedium (1) herstellt und dieses zusammen mit verstoffwechselbaren Mono-, Di- oder Oligosacchariden oder einer Zusammensetzung, welche verstoffwechselbare Mono- oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthält und die im wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen, einer Fermentation zuführt.

[0017] Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung wenigstens einer organischen Verbindung mit mindestens 3 C-Atomen oder mit mindestens 2 C-Atomen und mindestens 1 N-Atom durch Fermentation, umfassend die folgenden Schritte:

- a1) Vermahlen einer Stärkequelle unter Erhalt eines Mahlguts, das wenigstens einen Teil der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle enthält;
- a2) Suspendieren des Mahlguts in einer wässrigen Flüssigkeit und Hydrolyse des Stärkeanteils im Mahlgut durch enzymatisches Verflüssigen und gegebenenfalls anschließendes Verzuckern, wobei man ein erstes, Mono- oder Oligosaccharide enthaltendes Flüssigmedium (1) erhält; und
- b) Zugabe des Flüssigmediums (1) zusammen mit verstoffwechselbaren Mono-, Di- oder Oligosacchariden oder einer Zusammensetzung, die verstoffwechselbare Mono-, Di- oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthält und die im wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen, zu einem Fermentationsmedium, das einen Mikroorganismus enthält, welcher zur Überproduktion der organischen Verbindung befähigt ist, unter Fermentationsbedingungen.

[0018] Der Einsatz des durch enzymatische Hydrolyse erhaltenen Flüssigmediums (1) führt zu einer deutlichen Senkung der Kosten bei der fermentativen Herstellung der organischen Verbindungen. Aufgrund der hierzu parallelen Zugabe an verstoffwechselbaren Zuckern (d.h. den verstoffwechselbaren Mono-, Di- oder Oligosacchariden) in konzentrierter Form wird zudem eine unerwünschte Verdünnung der Fermentationsbrühe vermieden. Zudem können durch das erfindungsgemäße Verfahren Viskositätsprobleme, wie sie beim Verflüssigen der Stärkequelle bei höheren Konzentrationen an Mahlgut auftreten können, vermieden werden. Außerdem können Probleme bei der Vermehrung des Mikroorganismus auf diese Weise vermieden werden.

[0019] Als Stärkequelle kommen für das erfindungsgemäße Verfahren vor allem trockene Kornfrüchte oder Samen in Betracht, die in getrocknetem Zustand mindestens 40 Gew.-% und bevorzugt mindestens 50 Gew.-% Stärkeanteil aufweisen. Diese finden sich in vielen der heutzutage in großem Maßstab kultivierten Getreidepflanzen wie Mais, Weizen, Hafer, Gerste, Roggen, Triticale, Reis sowie in Zuckerrüben und Kartoffeln und verschiedenen Hirsesorten, z.B. Sorghum und Milo. Bevorzugt ist die Stärkequelle unter Getreide und speziell unter Mais-, Roggen-, Triticale- und Weizenkörnern ausgewählt. Grundsätzlich lässt sich das erfindungsgemäße Verfahren auch mit analogen Stärkequellen durchführen, wie beispielsweise einer Mischung verschiedener stärkehaltiger Kornfrüchte oder Samen.

[0020] Zur Herstellung des Flüssigmediums (1) wird im Schritt a1) die jeweilige Stärkequelle mit oder ohne Zusatz von Flüssigkeit, z.B. Wasser, vermahlen, bevorzugt ohne Zusatz von Flüssigkeit. Es kann auch eine Trockenvermahlung mit einer anschließenden Nassvermahlung kombiniert werden.

[0021] Zur trockenen Vermahlung werden typischerweise Hammermühlen, Rotormühlen oder Walzen-Schrotmühlen eingesetzt; zur Nassvermahlung eignen sich Rührmixer, Rührwerkskugelmühlen, Zirkulationsmühlen, Scheibenmühlen, Ringkammermühlen, Schwingmühlen oder Planetenmühlen. Grundsätzlich kommen auch andere Mühlen in Betracht. Die zur Nassvermahlung erforderliche Flüssigkeitsmenge kann der Fachmann in Routineexperimenten ermitteln. Üblicherweise wird sie so eingestellt, dass der Gehalt an Trockensubstanz im Bereich von 10 bis 20 Gew.-% liegt.

[0022] Durch das Mahlen wird eine für die sich anschließenden Verfahrensschritte geeignete Korngröße eingestellt. Hierbei hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn das beim Vermahlen, insbesondere bei trockener Vermahlung, im Schritt a1) erhaltene Mahlgut Mehlpartikel, d.h. teilchenförmige Bestandteile, mit einer Korngröße im Bereich von 100 bis 630 µm in einem Anteil von 30 bis 100 Gew.-%, bevorzugt 40 bis 95 Gew.-% und besonders bevorzugt 50 bis 90 Gew.-% aufweist. Vorzugsweise enthält das erhaltene Mahlgut 50 Gew.-% an Mehlpartikeln mit einer Korngröße von mehr als 100 µm. In der Regel weisen mindestens 95 Gew.-% der ermahlten Mehlpartikel eine Korngröße von weniger als 2 mm auf. Die Messung der Korngröße erfolgt dabei mittels Siebanalyse unter Verwendung einer Vibrations-Analysenmaschine. Eine geringe Korngröße ist grundsätzlich zur Erzielung einer hohen Produktausbeute vorteilhaft. Eine zu geringe Teilchengröße kann jedoch zu Problemen, insbesondere durch Klumpenbildung/Agglomeration, beim Anmischen des Mahlguts während

der Verflüssigung bzw. bei der Aufarbeitung, z.B. bei der Trocknung der Feststoffe nach dem Fermentations-schritt, führen.

[0023] Üblicherweise werden Mehle durch den Ausmahlungsgrad bzw. durch die Mehltypen charakterisiert, wobei diese so miteinander korrelieren, dass mit zunehmendem Ausmahlungsgrad auch die Kennzahl der Mehltypen zunimmt. Der Ausmahlungsgrad entspricht der Gewichtsmenge des gewonnenen Mehls bezogen auf 100 Gewichtsteile des eingesetzten Mahlguts. Während beim Mahlen zunächst reines, feinstes Mehl, z.B. aus dem Inneren des Getreidekorns, anfällt, nimmt beim weiteren Vermahlen, also mit steigendem Ausmahlungsgrad, der Anteil an Rohfaser- und Schalenanteil im Mehl zu, der Stärkeanteil wird dabei geringer. Der Ausmahlungsgrad spiegelt sich daher auch in der sogenannten Mehltypennummer, die als Zahlenangabe zur Klassifizierung von Mehlen, insbesondere von Getreidemehlen, verwendet wird und die auf dem Aschegehalt des Mehles beruht (sogenannte Ascheskala). Die Mehltypennummer bzw. die Typenzahl gibt hierbei die Menge Asche (Mineralstoffe) in mg an, die beim Verbrennen von 100 g Mehltrockensubstanz zurück bleibt. Für Getreidemehle bedeutet eine höhere Typenzahl einen höheren Ausmahlungsgrad, da der Kern des Getreidekorns in etwa 0,4 Gew.-%, die Schale hingegen etwa 5 Gew.-% Asche enthält. Bei niederem Ausmahlungsgrad bestehen die Getreidemehle also überwiegend aus dem zerkleinerten Mehlkörper, d.h. dem Stärkebestandteil der Getreidekörner; bei höherem Ausmahlungsgrad enthalten die Getreidemehle auch die zerkleinerte, eiweißhaltige Aleuronschicht der Getreidekörner, bei Schrot auch die Bestandteile des eiweiß- und fetthaltigen Keimlings sowie der rohfaser- und aschehaltigen Samenschalen. Für die erfindungsgemäßen Zwecke sind grundsätzlich Mehle mit einem hohen Ausmahlungsgrad bzw. einer hohen Typenzahl bevorzugt. Wird Getreide als Stärkequelle eingesetzt, so werden vorzugsweise die ganzen ungeschälten Körner vermahlen und weiter verarbeitet, gegebenenfalls nach vorheriger mechanischer Abtrennung von Keim und Spelzen.

[0024] Erfindungsgemäß enthält das zur Herstellung des Flüssigmediums (1) verwendete Mahlgut zumindest einen Teil, vorzugsweise wenigstens 20 Gew.-%, insbesondere wenigstens 50 Gew.-%, speziell wenigstens 90 Gew.-% und ganz speziell wenigstens 99 Gew.-% der in den vermahlenden Getreidekörnern enthaltenen nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile, entsprechend dem Ausmahlungsgrad. Bezogen auf die stärkehaltigen Bestandteile des Mahlguts (und damit auf die Menge an Mono-, Di- oder Oligosaccharid im Flüssigmedium (1)) beträgt der Anteil der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile im Mahlgut vorzugsweise wenigstens 10 Gew.-% und insbesondere wenigstens 15 Gew.-%, z.B. von 15 bis 75 Gew.-% und speziell im Bereich von 20 bis 60 Gew.-%.

[0025] Das enzymatische Hydrolyse des Mahlguts gemäß Schritt a2) kann nach üblichen, dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen, z.B. nach den in dem eingangs zitierten „The Alcohol Textbook – A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries“, Kapitel 2, S. 7 bis 23 beschriebenen Methoden.

[0026] Hierzu wird man zunächst das Mahlgut mit einer wässrigen Flüssigkeit, z.B. Frischwasser, rückgeführtem Prozesswasser, z.B. aus einer nachfolgenden Fermentation, oder mit einer Mischung dieser Flüssigkeiten vermischen, wobei man eine wässrige Suspension erhält. Dieser Vorgang wird häufig auch als Anmaischen bezeichnet.

[0027] Die Menge an Mahlgut und wässriger Flüssigkeit werden in der Regel so gewählt, dass man durch die Hydrolyse ein wässriges Flüssigmedium (1) erhält, worin die Gesamtkonzentration an Mono- Di-, und/oder Oligosacchariden im Bereich von 100 bis 750 g/kg, vorzugsweise im Bereich von 150 bis 700 g/kg und insbesondere im Bereich von 200 bis 650 g/kg liegt. Dementsprechend setzt man das Mahlgut typischerweise in einer Menge von 150 bis 800 g/kg, häufig im Bereich von 200 bis 750 g/kg und insbesondere im Bereich von 250 bis 700 g/kg, bezogen auf das Gesamtgewicht der Suspension (Maische) ein.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird Menge an Mahlgut und wässriger Flüssigkeit so gewählt, dass man durch die Hydrolyse ein wässriges Flüssigmedium (1) erhält, worin die Gesamtkonzentration an Mono- Di-, und/oder Oligosacchariden im Bereich von 100 bis 400 g/kg, vorzugsweise im Bereich von 150 bis 350 g/kg und insbesondere im Bereich von 200 bis 300 g/kg liegt. Dementsprechend setzt man das Mahlgut typischerweise in einer Menge von 150 bis 550 g/kg, häufig im Bereich von 200 bis 500 g/kg und insbesondere im Bereich von 250 bis 450 g/kg, bezogen auf das Gesamtgewicht der Suspension (Maische) ein. Man kann grundsätzlich auch größere Mengen an Mahlgut einsetzen, um höhere Gesamtkonzentration an Mono- Di-, und/oder Oligosacchariden zu erreichen, z.B. Konzentrationen oberhalb 400 g/kg bis 700 g/kg, insbesondere im Bereich von 450 bis 650 g/kg oder 500 g/kg bis 650 g/kg zu erreichen.

[0029] Zur enzymatischen Hydrolyse des Stärkeanteils des Mahlguts wird man in der Regel zuerst eine Verflüssigung des Mahlguts in Gegenwart eines die Stärke verflüssigenden Enzyms, in der Regel eine α -Amylase,

vornehmen. Andere unter den Reaktionsbedingungen aktive und stabile Stärke verflüssigende Enzyme sind ebenfalls einsetzbar.

[0030] Zur Verflüssigung des Stärkeanteils im Mahlgut können grundsätzlich alle verflüssigenden Enzyme, insbesondere α -Amylasen (Enzymklasse EC 3.2.1.1) eingesetzt werden, beispielsweise α -Amylasen, die aus *Bacillus licheniformis* oder *Bacillus stearothermophilus* gewonnen wurden und speziell solche, die zum Verflüssigen von durch Dry-Milling-Verfahren gewonnenen Materialien im Rahmen der Herstellung von Bioethanol verwendet werden. Die zum Verflüssigen geeigneten α -Amylasen sind auch kommerziell erhältlich, beispielsweise von Novozymes unter der Bezeichnung Termamyl 120 L, Typ L; oder von Genencor unter der Bezeichnung Spezyme. Es kann auch eine Kombination verschiedener α -Amylasen zur Verflüssigung eingesetzt werden.

[0031] Hierbei erhält man ein wässriges Medium, welches den verflüssigten Stärkeanteil aus dem Mahlgut, typischerweise Oligosaccharide mit in der Regel 3 bis 18, insbesondere 6 bis 12 Monosaccharid-Einheiten, insbesondere Glucoseeinheiten, sowie die nicht-stärkehaltigen Bestandteile des eingesetzten Mahlguts, insbesondere die festen, nicht-stärkehaltigen Bestandteile des zur Verflüssigung eingesetzten Mahlguts enthält.

[0032] Vorteilhafterweise werden die Mengen an Stärke verflüssigendem Enzym und Mahlgut, so gewählt sein, dass die Viskosität während des Gelierungsvorgangs ausreichend reduziert ist, um eine effektive Durchmischung der Suspension, z.B. mittels Rühren, zu ermöglichen. Bevorzugt beträgt die Viskosität der Reaktionsmischung während des Gelierens maximal 20 Pas, besonders bevorzugt maximal 15 Pas und ganz besonders bevorzugt maximal 8 Pas. Die Messung der Viskosität erfolgt in der Regel mit einem Haake Viskosimeter Type Roto Visko RV20 mit Messsystem M5 und Messeinrichtung MVDIN bei einer Temperatur von 50°C und einer Schergeschwindigkeit von 200 s⁻¹.

[0033] Die α -Amylase (bzw. das verwendete Stärke verflüssigende Enzym) kann im Reaktionsgefäß vorgelegt oder im Verlauf des Schrittes a2) zugegeben werden. Vorzugsweise gibt man eine Teilmenge der in Schritt a2) benötigten α -Amylase zu Beginn von Schritt a2) zu oder legt diese Teilmenge im Reaktor vor. Die Gesamtmenge an α -Amylase liegt üblicherweise im Bereich von 0,002 bis 3,0 Gew.-%, bevorzugt von 0,01 bis 1,5 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,02 bis 0,5 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Stärkequelle.

[0034] Die Verflüssigung kann oberhalb oder unterhalb der Gelierungstemperatur durchgeführt werden. Vorzugsweise erfolgt die Verflüssigung in Schritt a2) zumindest zeitweise oberhalb der Gelierungstemperatur bzw. Verkleisterungstemperatur der eingesetzten Stärke (sogenannter Cooking Prozess). Die hierzu für die jeweilige Stärke erforderliche Temperatur ist dem Fachmann bekannt (siehe das eingangs zitierte „The Alcohol Textbook – A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries“, Kapitel 2, S. 11) oder kann von ihm in Routineexperimenten bestimmt werden. In der Regel wird eine Temperatur im Bereich zwischen 80 und 165°C, bevorzugt zwischen 90 und 150°C und besonders bevorzugt im Bereich von 100 bis 140°C gewählt, wobei die Temperatur in der Regel mindestens 5 K, insbesondere mindestens 10 K und besonders bevorzugt mindestens 20 K, z.B. 10 bis 100 K, insbesondere 20 bis 80 K oberhalb der Gelierungstemperatur liegt. Bei diesen Temperaturen wird die granuläre Struktur der Stärke zerstört (Gelieren), wodurch deren enzymatischer Abbau ermöglicht wird.

[0035] Für eine optimale Wirkung der α -Amylase (bzw. des verwendeten Stärke verflüssigenden Enzyms) wird Schritt a2) vorzugsweise zumindest zeitweise im pH-Optimum des verflüssigenden Enzyms, häufig bei einem pH-Wert im schwach sauren Bereich, vorzugsweise zwischen 4,0 und 7,0, besonders bevorzugt zwischen 5,0 bis 6,5 durchgeführt, wobei üblicherweise vor oder zu Beginn von Schritt a2) die pH-Einstellung vorgenommen wird; dieser pH-Wert wird während der Verflüssigung vorzugsweise kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt. Die Einstellung des pH-Werts erfolgt vorzugsweise mit verdünnten Mineralsäuren wie H₂SO₄ oder H₃PO₄ bzw. mit verdünnten Alkalilaugen wie NaOH oder KOH.

[0036] In einer bevorzugten Ausführungsform gibt man zum Verflüssigen des Stärkeanteils im Mahlgut gemäß Schritt a2) mindestens eine Teilmenge des Mahlguts kontinuierlich oder diskontinuierlich zu der wässrigen Flüssigkeit. Vorzugsweise gibt man hierbei wenigstens 40 Gew.-%, insbesondere wenigstens 50 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt wenigstens 55 Gew.-% im Verlauf der Verflüssigung, jedoch vor einer etwaigen Verzuckerung in den Reaktor. Häufig wird die zugegebene Menge 90 Gew.-%, insbesondere 85 Gew.-% und besonders bevorzugt 80 Gew.-% nicht überschreiten. Vorzugsweise wird die im Verlauf zugegebene Teilmenge an Mahlgut dem Reaktor unter Bedingungen zugeführt, wie sie bei der Verflüssigung vorliegen. Die Zugabe kann diskontinuierlich, d.h. portionsweise in mehreren Teilportionen, die vorzugsweise jeweils nicht mehr als

30 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht mehr als 20 Gew.-%, z.B. 1 bis 30 Gew.-% und insbesondere 2 bis 20 Gew.-%, der Gesamtmenge des zu verflüssigenden Mahlgutes ausmachen, oder kontinuierlich erfolgen. Wesentlich bei dieser Ausführungsform ist, dass sich zu Beginn der Verflüssigung nur ein Teil des Mahlgutes, vorzugsweise nicht mehr als 60 Gew.-%, insbesondere nicht mehr als 50 Gew.-% und besonders bevorzugt nicht mehr als 45 Gew.-% des Mahlgutes, im Reaktor befindet und die Restmenge des Mahlgutes während des Verflüssigens zugegeben wird.

[0037] Die Verflüssigung kann auch kontinuierlich, z.B. in einer mehrstufigen Reaktionskaskade, durchgeführt werden.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform führt man Schritt a2) des erfindungsgemäßen Verfahrens so durch, dass zunächst eine Teilmenge von höchstens 60 Gew.-%, bevorzugt höchstens 50 Gew.-% und besonders bevorzugt höchstens 45 Gew.-%, z.B. 10 bis 60 Gew.-%, insbesondere 15 bis 50 Gew.-% und besonders bevorzugt 20 bis 45 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge des Mahlgutes, in der wässrigen Flüssigkeit, suspendiert wird und anschließend die Verflüssigung durchgeführt wird.

[0039] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die diskontinuierliche oder kontinuierliche, insbesondere portionsweise Zugabe einer Teilmenge des Mahlgutes in Schritt a2) derart, dass die Viskosität des Flüssigmediums maximal 20 Pas, bevorzugt maximal 15 Pas und besonders bevorzugt maximal 8 Pas beträgt. Zur Unterstützung der Viskositätskontrolle hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn mindestens 25 Gew.-%, bevorzugt mindestens 35 Gew.-% und besonders bevorzugt mindestens 50 Gew.-% der Gesamtmenge des zugegebenen Mahlgutes bei einer Temperatur oberhalb der Gelatinierungstemperatur der im Mahlgut enthaltenen Stärke zugegeben werden. Die Kontrolle der Viskosität kann des Weiteren dadurch beeinflusst werden, dass das mindestens eine Stärke verflüssigende Enzym, vorzugsweise eine α -Amylase, oder/und das mindestens eine verzuckernde Enzym, vorzugsweise eine Glucoamylase, selbst portionsweise zugegeben werden.

[0040] Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich, die zum Suspendieren des festen Mahlgutes verwendete wässrige Flüssigkeit auf eine leicht erhöhte Temperatur, z.B. im Bereich von 40 bis 60°C, vorzutemperieren. Es ist jedoch bevorzugt, die Flüssigkeiten bei Raumtemperatur einzusetzen.

[0041] Zu der Suspension des Mahlgutes wird dann das mindestens eine Stärke verflüssigende Enzym, vorzugsweise eine α -Amylase, gegeben. Wird eine Teilmenge des Mahlgutes erst im Verlauf der Verflüssigung hinzugegeben, so gibt man anfangs vorteilhafterweise nur eine Teilmenge der α -Amylase zu, z.B. 10 bis 70 Gew.-% und insbesondere 20 bis 65 Gew.-%, bezogen auf die insgesamt in Schritt a2) eingesetzte α -Amylase. Die zu diesem Zeitpunkt zugegebene Menge an α -Amylase richtet sich in diesem Fall nach der Aktivität der jeweiligen α -Amylase in Bezug auf die verwendete Stärkequelle unter den Reaktionsbedingungen und liegt üblicherweise im Bereich von 0,0004 bis 2,0 Gew.-%, bevorzugt von 0,001 bis 1,0 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,02 bis 0,3 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Stärkequelle. Alternativ kann hierbei die Teilmenge der α -Amylase vor dem Ansetzen der Suspension mit der verwendeten Flüssigkeit vermischt werden.

[0042] Vorzugsweise wird die eingesetzte Menge oder Teilmenge an α -Amylase vor dem Beginn des Aufheizens auf die zur Verflüssigung angewendete Temperatur, insbesondere bei Raumtemperatur oder nur leicht erhöhter Temperatur, z.B. im Bereich von 20 bis 30°C, zu der Suspension gegeben.

[0043] Die so angesetzte Suspension wird dann vorzugsweise auf eine Temperatur oberhalb der Gelierungstemperatur der verwendeten Stärke erhitzt. In der Regel wird eine Temperatur im Bereich von 80 bis 165°C, bevorzugt von 90 bis 150°C und besonders bevorzugt im Bereich von 100 bis 140°C gewählt, wobei die Temperatur vorzugsweise mindestens 5 K, insbesondere 10 K und besonders bevorzugt mindestens 20 K, z.B. 10 bis 100 K, insbesondere 20 bis 80 K oberhalb der Gelierungstemperatur (Verkleisterungstemperatur) liegt. Unter Kontrolle der Viskosität werden gegebenenfalls nach und nach weitere Teilmengen der Stärkequelle, z.B. jeweils 1 bis 30 Gew.-% und insbesondere 2 bis 20 Gew.-%, bezogen auf die gesamte eingesetzte Menge an Mahlgut, zu der stärkehaltigen Suspension gegeben. In diesem Fall ist es bevorzugt, die im Verlauf der Verflüssigung zuzugebende Teilmenge des Mahlgutes in mindestens 2, bevorzugt mindestens 4 und besonders bevorzugt mindestens 6 Teilportionen der Reaktionsmischung zuzugeben. Alternativ kann in dieser Ausführungsform die Zugabe der beim Ansetzen der Suspension nicht eingesetzten Teilmenge des Mahlgutes kontinuierlich während der Verflüssigung erfolgen. Die Temperatur sollte bei der Zugabe vorteilhafterweise oberhalb der Gelierungstemperatur der Stärke gehalten werden.

[0044] Nach Erreichen gewünschter Temperatur bzw. gegebenenfalls nach vollständiger Zugabe des Mehls

wird das Reaktionsgemisch üblicherweise noch eine Zeit, z.B. 10 bis 60 Minuten oder länger, sofern erforderlich, bei der oberhalb der Gelierungstemperatur der Stärke eingestellten Temperatur gehalten, d.h. verkocht. Die Reaktionsmischung wird dann in der Regel auf eine etwas geringere Temperatur, jedoch vorzugsweise oberhalb der Gelierungstemperatur, z.B. auf 70 bis 90°C, abgekühlt. Anschließend wird gegebenenfalls eine weitere Teilmenge an α -Amylase, vorzugsweise die Hauptmenge, zugesetzt. In diesem Fall beträgt die Menge an zu diesem Zeitpunkt zugegebener α -Amylase je nach Aktivität der verwendeten α -Amylase unter den Reaktionsbedingungen vorzugsweise 0,002 bis 2,0 Gew.-%, besonders bevorzugt von 0,01 bis 1,0 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt von 0,02 bis 0,4 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Stärkequelle.

[0045] Zum vollständigen Abbau der Stärke zu Dextrinen wird das Reaktionsgemisch so lange bei der eingestellten Temperatur gehalten oder gegebenenfalls weiter erhitzt, bis der Stärkenachweis mit Jod oder gegebenenfalls ein anderer Test zum Nachweis von Stärke negativ oder mindestens im Wesentlichen negativ ausfällt. Gegebenenfalls können hierbei noch eine oder mehrere weitere Teilmengen α -Amylase, z.B. im Bereich von 0,001 bis 0,5 Gew.-% und bevorzugt 0,002 bis 0,2 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Stärkequelle, zu der Reaktionsmischung gegeben werden.

[0046] Alternativ kann man die das Mahlgut enthaltende wässrige Suspension zur Verflüssigung des Stärkeanteils zunächst durch Einbringen von Wasserdampf auf eine Temperatur oberhalb der Verkleisterungstemperatur der in der Stärkequelle bzw. dem Mahlgut enthaltenen Stärke erhitzen. Typischerweise wird man auf eine Temperatur erhitzen, die wenigstens 10 K und insbesondere wenigstens 20 K, z.B. 10 bis 100 K, insbesondere 20 bis 80 K oberhalb der jeweiligen Verkleisterungstemperatur liegt. Insbesondere erhitzt man die Suspension auf Temperaturen im Bereich von 90 bis 150°C, und speziell im Bereich von 100 bis 140°C.

[0047] Bei dem zum Erhitzen eingesetzten Wasserdampf handelt es sich typischerweise um überhitzten Wasserdampf, der eine Temperatur von wenigstens 105°C, insbesondere wenigstens 110°C z.B. 110 bis 210°C aufweist. Vorzugsweise wird der Dampf mit Überdruck in die Suspension eingebracht. Dementsprechend weist der Dampf vorzugsweise einen Druck von wenigstens 1,5 bar, z.B. 1,5 bis 16 bar, insbesondere 2 bis 12 bar auf.

[0048] Das Einbringen von Wasserdampf in die Suspension erfolgt in der Regel so, dass man den Dampf mit Überdruck, vorzugsweise einem Überdruck von 1 bis 10 bar, insbesondere 1,5 bis 5 bar und vorzugsweise mit hoher Geschwindigkeit in die Suspension einträgt. Durch das Eintragen des Dampfes erhitzt sich die Suspension augenblicklich auf Temperaturen oberhalb 90°C, also auf Temperaturen oberhalb der Verkleisterungstemperatur.

[0049] Vorzugsweise erfolgt das Erhitzen mit Wasserdampf in einer kontinuierlich arbeitenden Vorrichtung, in welche man die Suspension kontinuierlich mit einem bestimmten Förderdruck, der sich aus der Viskosität der Suspension, der Fördergeschwindigkeit und der Geometrie der Vorrichtung ergibt, einspeist und in die man im Bereich des Einspeisens der Suspension den heißen Dampf mit Überdruck, bezogen auf den Förderdruck, über ein regelbare Düse einspeist. Durch das Einspeisen des Dampfes mit Überdruck wird die Suspension nicht nur erhitzt sondern es wird auch mechanische Energie in das System eingetragen, welche eine weitere Zerteilung der Mahlgutpartikel fördert, einen besonders gleichmäßigen Energieeintrag bewirkt, und somit eine besonders gleichmäßige Verkleisterung der granulären Stärkepartikel im Mahlgut zur Folge hat. Typischerweise haben diese Vorrichtungen einen röhrenförmigen Geometrie. Vorzugsweise erfolgt das Eintragen des Dampfes in Richtung der Längsachse der röhrenförmigen Vorrichtung. Die Zufuhr der Suspension erfolgt in der Regel in einem Winkel von wenigstens 45° oder senkrecht hierzu. Die regelbare Düse weist typischerweise eine konische Geometrie auf, die sich in Fließrichtung des Dampfes verjüngt. In dieser Düse ist eine Nadel oder ein auf einer in Längsrichtung verschiebaren Stange angeordneter Kegel angeordnet. Nadel bzw. Kegel und bildet mit dem Konus der Düse einen Spalt. Durch Verschieben der Nadel bzw. der Stange in Längsrichtung lässt sich die Größe des Spalts und damit die Querschnittsfläche der Düsenöffnung in einfacher Weise einstellen, wodurch man in einfacher Weise die Geschwindigkeit des Dampfeintrags regulieren kann.

[0050] Typischerweise weisen diese Vorrichtungen außerdem ein Vermischungsrohr auf, in welches die Suspension nach dem Dampfeintrag transportiert und aus der Vorrichtung ausgetragen wird. Dieses Vermischungsrohr ist üblicherweise in Richtung des Dampfeintrags und senkrecht zur Einspeisung angeordnet. Das Vermischungsrohr bildet typischerweise mit der Düse einen Spalt, durch den die Suspension transportiert wird. Durch diesen Spalt wirken beim Transport zusätzliche Scherkräfte auf die Suspension und erhöhen somit den mechanischen Energieeintrag in die Suspension. Das Vermischungsrohr kann in Längsrichtung verschiebbar angeordnet sein. Durch Verschieben des Vermischungsrohrs lässt sich in einfacher Weise die Größe der Spalt-

öffnung einstellen und damit das Druckgefälle in der Vorrichtung.

[0051] Derartige Vorrichtungen sind unter der Bezeichnung Jet-Kocher aus dem Stand der Technik bekannt, beispielsweise die in „The Alcohol Textbook“, Kapitel 2, loc. cit., **Fig. 13** dargestellte Vorrichtung und kommerziell erhältlich, beispielsweise unter der Bezeichnung HYDROHEATER® der Fa. Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, USA.

[0052] Bei kontinuierliche Reaktionsführung wird die mit Wasserdampf behandelte Suspension in der Regel im Anschluss daran in eine Nachreaktionszone überführt, um das Gelieren der Stärkebestandteile fortzusetzen. In der Nachreaktionszone herrscht typischerweise Überdruck, typischerweise ein Absolutdruck im Bereich von 2 bis 8 bar. Die Temperaturen in der Nachreaktionszone liegen typischerweise im Bereich von 90 bis 150°C. Die Verweilzeit in dieser Nachreaktionszone kann in Abhängigkeit von der Temperatur der Suspension im Bereich von 1 min bis 4 h betragen. Die Nachreaktionszonen weisen typischerweise eine röhrenförmige oder säulenförmige Geometrie auf. In einer Ausführungsform handelt es sich um die Geometrie einer senkrecht angeordneten Säule auf. Die Suspension wird hierbei nach Verlassen der Vorrichtung zur Dampfbehandlung in den oberen Bereich der Säule aufgebracht und im unteren Bereich entnommen. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung weist die Nachreaktionszone eine röhrenförmige Geometrie auf.

[0053] Nach Verlassen der Nachreaktionszone wird die Suspension in der Regel entspannt und man führt dann eine Verflüssigung durch. Vorzugsweise führt man die Entspannung als Flash-Verdampfung durch, um die Suspension abzukühlen, vorzugsweise auf Temperaturen unterhalb 100°C, insbesondere unterhalb 85°C. In der Regel erfolgt dann eine Verflüssigung der so aufgeschlossenen Stärke in einem separaten Reaktionsgefäß. Die Verflüssigung kann in der oben beschriebenen Weise durchgeführt werden.

[0054] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung gibt man wenigstens einen Teil oder die Gesamtmenge, in der Regel wenigstens 50%, insbesondere wenigstens 80% der Gesamtmenge oder die Gesamtmenge des die Stärke verflüssigenden Enzyms vor dem Erhitzen mit Wasserdampf zu der Suspension des Mahlguts in der wässrigen Flüssigkeit. Auf diese Weise erfolgt die Verflüssigung bereits während des Erhitzens auf Temperaturen oberhalb der Verkleisterungstemperatur. Das Erhitzen mit Wasserdampf und die Nachreaktionsphase werden entsprechend durchgeführt. Eine anschließende Verflüssigung in einem separaten Reaktionsgefäß kann entfallen. Vorzugsweise wird man jedoch eine solche Verflüssigung zur Vervollständigung des Abbaus der Stärke in Dextrine durchführen.

[0055] Zur Stabilisierung der eingesetzten Enzyme kann gegebenenfalls die Konzentration an Ca^{2+} -Ionen, z.B. mit CaCl_2 , auf einen enzymespezifischen optimalen Wert eingestellt werden. Geeignete Konzentrationswerte können vom Fachmann in Routineexperimenten bestimmt werden. Wird z.B. Termamyl als α -Amylase eingesetzt, so ist es vorteilhaft, eine Ca^{2+} -Konzentration von z.B. 10 bis 100 ppm, bevorzugt 20 bis 80 ppm und besonders bevorzugt etwa 30 bis 70 ppm im Flüssigmedium einzustellen, wobei die Angabe ppm gewichtsbezogen ist und g/1000 kg bedeutet.

[0056] Zum vollständigen Abbau der Stärke zu Dextrinen wird das Reaktionsgemisch so lange bei der eingestellten Temperatur gehalten, bis der Stärkenachweis mit Jod oder gegebenenfalls ein anderer Test zum Nachweis von Stärke negativ oder mindestens im Wesentlichen negativ ausfällt. Gegebenenfalls können hierbei noch eine oder mehrere weitere Teilmengen α -Amylase, z.B. im Bereich von 0,001 bis 0,5 Gew.-% und bevorzugt 0,002 bis 0,2 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Stärkequelle, zu der Reaktionsmischung gegeben werden.

[0057] Auf diese Weise erhält man ein wässriges Stärkehydrolysat, welches den verflüssigten Stärkeanteil aus dem Mahlgut, typischerweise Dextrine und gegebenenfalls weitere Oligosaccharide und Mono- oder Disaccharide, sowie die nicht-stärkehaltigen Bestandteile des Mahlguts, insbesondere die festen, nicht-stärkehaltigen Bestandteile des zur Verflüssigung eingesetzten Mahlguts enthält.

[0058] Nach abgeschlossener Verflüssigung der Stärke kann eine Verzuckerung der in dem Flüssigmedium enthaltenen Dextrine, d. h. deren Abbau zu Glucose, kontinuierlich oder diskontinuierlich in an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Das verflüssigte Medium kann in einem speziellen Verzuckerungstank vollständig verzuckert werden, bevor es z.B. einem nachfolgenden Fermentationsschritt zugeführt wird.

[0059] In einer ersten Ausführungsform der Erfindung wird vor der nachfolgenden Fermentation nur eine teilweise Verzuckerung durchgeführt. Beispielsweise kann man so vorgehen, dass man eine Teilmenge der in dem Flüssigmedium enthaltenen Dextrine, z.B. im Bereich von 10 bis 90 Gew.-% und insbesondere im Bereich

von 20 bis 80 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Dextrine (bzw. der ursprünglichen Stärke), verzuckert und das resultierende zuckerhaltige Flüssigmedium in der Fermentation einsetzt. Im Fermentationsmedium kann dann eine weitere Verzuckerung in situ erfolgen. Die Verzuckerung kann des Weiteren unter Wegfall eines separaten Verzuckerungstanks direkt im Fermenter (in situ) durchgeführt werden.

[0060] Vorteile der in-situ-Verzuckerung, d.h. einer teilweise oder vollständig im Fermenter erfolgenden Verzuckerung, sind einerseits reduzierte Investitionskosten, andererseits kann durch eine retardierte Freisetzung der Glucose gegebenenfalls eine höhere Glucosekonzentration im Ansatz (Batch) vorgelegt werden, ohne dass eine Inhibierung oder Stoffwechseländerung der eingesetzten Mikroorganismen auftritt. Bei *E.coli* führt eine zu hohe Glucosekonzentration z.B. zur Bildung von organischen Säuren (Acetat), während *Saccharomyces cerevisiae* in diesem Fall z.B. auf Vergärung umschaltet, obwohl in belüfteten Fermentern ausreichend Sauerstoff vorhanden ist (Crabtree-Effekt). Eine retardierte Freisetzung von Glucose ist durch die Regelung der Glucoamylasekonzentration einstellbar. Hierdurch können die vorgenannten Effekte unterdrückt werden und es kann mehr Substrat vorgelegt werden, so dass die aus dem zugeführten Feed-Strom resultierende Verdünnung reduziert werden kann.

[0061] Zur Verzuckerung der Dextrine (d.h. Oligosaccharide) in der verflüssigten Stärkelösung erfolgt auf enzymatischem Wege, d.h. mit Hilfe wenigstens eines die Dextrine verzuckernden Enzyms. Hierzu können grundsätzlich alle Glucoamylasen (Enzymklasse EC 3.2.1.3) eingesetzt werden, insbesondere Glucoamylasen, die aus *Aspergillus* gewonnen wurden und speziell solche, die zum Verzuckern von durch Dry-Milling-Verfahren gewonnenen Materialien im Rahmen der Herstellung von Bioethanol verwendet werden. Die zum Verzuckern geeigneten Glucoamylasen sind auch kommerziell erhältlich, beispielsweise von Novozymes unter der Bezeichnung Dextrozyme GA; oder von Genencor unter der Bezeichnung Optidex. Es kann auch eine Kombination verschiedener Glucoamylasen verwendet werden.

[0062] Das wenigstens eine verzuckernde Enzym, insbesondere wenigstens eine Glucoamylase, wird dem nach der Verflüssigung erhaltenen dextrinhaltigen Flüssigmedium üblicherweise in einer Menge von 0,001 bis 5,0 Gew.-%, bevorzugt von 0,005 bis 3,0 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,01 bis 1,0 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmenge der eingesetzten Stärkequelle, zugesetzt.

[0063] Sofern man die Verzuckerung im Fermenter durchführt, wird man die verflüssigte Stärkelösung in der Regel auf Fermentationstemperatur, d. h. 32 bis 37°C, abkühlen, bevor man sie dem Fermenter zuführt. Die Glucoamylase (bzw. das mindestens eine verzuckernde Enzym) zur Verzuckerung wird in diesem Fall der Fermentationsbrühe direkt zugesetzt. Die Verzuckerung der verflüssigten Stärke gemäß Schritt a2) erfolgt hierbei parallel zur Verstoffwechslung des Zuckers durch die Mikroorganismen.

[0064] Im Fall der Verzuckerung in einem Verzuckerungstank wird die verflüssigte Stärkelösung üblicherweise auf das Temperaturoptimum des verzuckernden Enzyms oder leicht darunter, z.B. auf 50 bis 70°C, bevorzugt 60 bis 65°C abgekühlt bzw. temperiert und anschließend mit Glucoamylase versetzt.

[0065] Vorteilhafterweise wird vor Zugabe des verzuckernden Enzyms, insbesondere der Glucoamylase, der pH-Wert des Flüssigmediums auf einen Wert im optimalen Wirkungsbereich der eingesetzten Glucoamylase, vorzugsweise im Bereich zwischen 3,5 und 6,0; besonders bevorzugt zwischen 4,0 und 5,5 und ganz besonders bevorzugt zwischen 4,0 und 5,0 eingestellt. Es ist jedoch auch möglich, insbesondere bei Durchführung der Verzuckerung direkt im Fermenter, den pH-Wert außerhalb der vorgenannten Bereiche einzustellen, z.B. im Bereich von 6,0 bis 8,0. Dies kann z.B. bei der fermentativen Herstellung von Lysin, Panthothenat und Vitamin B₂ trotz der eingeschränkten Aktivität von Standard-Glucoamylasen in diesem pH-Bereich insgesamt vorteilhaft oder aufgrund der einzustellenden Fermentationsbedingungen erforderlich sein.

[0066] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verzuckerung in einem speziellen Verzuckerungstank. Dazu wird die verflüssigte Stärkelösung auf eine für das Enzym optimale Temperatur oder leicht darunter temperiert und der pH-Wert in der oben beschriebenen Weise auf einen für das Enzym optimalen Wert eingestellt.

[0067] Nach Zugabe des verzuckernden Enzyms wird die dextrinhaltige Suspension vorzugsweise für einen Zeitraum von z.B. 2 bis 72 Stunden oder länger, sofern erforderlich, insbesondere von 5 bis 48 Stunden bei der eingestellten Temperatur gehalten, wobei die Dextrine zu Monosacchariden verzuckert werden. Der Fortschritt der Verzuckerung kann mit dem Fachmann bekannten Methoden, z.B. HPLC, Enzymtests oder Glucose-Teststäbchen, verfolgt werden. Die Verzuckerung ist abgeschlossen, wenn die Konzentration der Monosaccharide nicht mehr wesentlich ansteigt oder wieder fällt.

[0068] Da zur Herstellung des zuckerhaltigen Flüssigmediums (1) in der Regel Mahlgut eingesetzt wird, welches zumindest einen Teil oder alle Bestandteile der Stärkequelle enthält (d.h. eine Abtrennung der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle wird nicht oder nicht vollständig vorgenommen), umfasst das erhaltene Flüssigmedium (1) auch einen Teil oder alle nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle. Dies bedingt oftmals den Eintrag eines nicht zu vernachlässigenden Anteils an Phytat, z.B. aus der Kornfrucht. Um die daraus resultierende inhibierende Wirkung zu vermeiden, wird vorteilhafterweise in Schritt a2) dem Flüssigmedium mindestens eine Phytase zugesetzt, bevor das zuckerhaltige Flüssigmedium einem Fermentationsschritt zugeführt wird.

[0069] Die Zugabe der Phytase kann vor, während oder nach der Verflüssigung oder der Verzuckerung erfolgen, sofern sie die jeweils erforderliche Hitzestabilität aufweist.

[0070] Es können beliebige Phytasen eingesetzt werden, soweit deren Aktivität unter den Reaktionsbedingungen jeweils höchstens unwesentlich eingeschränkt ist. Bevorzugt sind Phytasen mit einer Temperaturstabilität (T50) > 50°C und besonders bevorzugt > 60°C.

[0071] Die Menge an Phytase beträgt üblicherweise 1 bis 10000 Units/kg Stärkequelle und insbesondere 10 bis 4000 Units/kg Stärkequelle.

[0072] Zur Erhöhung der Gesamtzuckerausbeute bzw. zur Gewinnung freier Aminosäuren können dem Reaktionsgemisch während der Herstellung des zuckerhaltigen Flüssigmediums außerdem weitere Enzyme, zum Beispiel Pullulanasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Glucanasen, Xylanasen, Glucosidasen oder Proteasen, zugesetzt werden. Der Zusatz dieser Enzyme kann die Viskosität positiv beeinflussen, d.h. herabsetzen (z.B. durch Spaltung längerer Ketten von Glucanen und/oder von (Arabino)Xylanen), die Freisetzung metabolisierbarer Glucoside und die Freisetzung von (Rest)Stärke bewirken. Der Einsatz von Proteasen hat analoge positive Effekte, wobei zusätzlich Aminosäuren als Wachstumsfaktoren für die Fermentation freigesetzt werden können.

[0073] Durch die hier beschriebene Anwendung der Schritte a1) und a2) stellt man, je nachdem ob eine Verzuckerung durchgeführt wurde oder nicht, ein dextrin- bzw. Mono- oder Disaccharid enthaltendes Flüssigmedium mit einer Gesamtkonzentration an Mono-, Di-, und/oder Oligosacchariden in den obengenannten Bereichen her.

[0074] Bei den im Flüssigmedium (1) nach Verzuckerung enthaltenen Zuckern handelt es sich insbesondere um Glucose, wobei auch weitere Monosaccharide wie von Glucose verschiedene Hexosen und Pentosen, z.B. Fructose, Mannose, Galactose, Sorbose, Xylose, Arabinose und Ribose enthalten sein können. Der Anteil an von Glucose verschiedenen Monosacchariden kann abhängig von der verwendeten Stärkequelle und den darin enthaltenen nicht-stärkehaltigen Bestandteilen variieren und durch die Verfahrensführung, beispielsweise durch Aufschluss von Cellulosebestandteilen durch Zusatz von Cellulasen, beeinflusst werden. Vorteilhafterweise umfassen die Monosaccharide des zuckerhaltigen Flüssigmediums einen Anteil an Glucose von mindestens 60 Gew.-%, häufig mindestens 70 Gew.-%, insbesondere mindestens 80 Gew.-% und speziell mindestens 85 Gew.-%, bezogen auf die in dem zuckerhaltigen Flüssigmedium enthaltene gesamte Zuckermenge. Üblicherweise liegt der Glucoseanteil im Bereich von 75 bis 99,9 Gew.-%, insbesondere von 80 bis 99 Gew.-% und speziell von 85 bis 97 Gew.-%, bezogen auf die in dem zuckerhaltigen Flüssigmedium enthaltene gesamte Zuckermenge. Sofern keine Verzuckerung durchgeführt wurde, entspricht der Anteil an Dextrinen an den im Medium (1) enthaltenen Mono-, Di- und Oligosacchariden im wesentlichen dem Glucoseanteil.

[0075] Sofern keine Verzuckerung durchgeführt wurde, liegen die verstoffwechselbaren Glucoseäquivalente im Wesentlichen in Form von Oligosacchariden, insbesondere Dextrinen vor. Hauptbestandteil dieser Oligosaccharide bzw. Dextrine ist typischerweise Glucose, wobei das Medium auch geringe Mengen an Mono- und/oder Disacchariden und aus anderen Monosaccharid-Einheiten aufgebaute Oligosaccharid-Einheiten enthalten kann. Typischerweise umfassen die zuckerhaltigen Bestandteile im Flüssigmedium (1), d.h. die Mono-, Di- und Oligosaccharide, dann einen Anteil an Oligosacchariden, insbesondere Dextrinen von mindestens 60 Gew.-%, häufig mindestens 70 Gew.-% insbesondere mindestens 80 Gew.-%, speziell mindestens 90 Gew.-%, d.h. der Anteil der Mono- und Disaccharide ist weniger als 40 Gew.-%, häufig weniger als 30 Gew.-%, insbesondere weniger als 20 Gew.-% und speziell weniger als 10 Gew.-%. Üblicherweise liegt der Anteil an Glucose, in freier oder gebundener Form, unter den Glukoseäquivalenten des Mediums (1) im Bereich von 50 bis 99 Gew.-%, insbesondere von 75 bis 97 Gew.-% und speziell von 80 bis 95 Gew.-%, bezogen auf die gesamte Menge an Glukoseäquivalenten.

[0076] Erfindungsgemäß erfolgt die anschließende Fermentation sowohl unter Verwendung des Flüssigme-

diums (1) als auch einer davon verschiedenen Quelle an verstoffwechselbaren Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden (im folgenden auch Zuckerquelle). Die hierzu verwendeten Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide können sowohl als solche oder in Form einer Zusammensetzung eingesetzt werden, die verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% vorzugsweise in einer Konzentration von wenigstens 60 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Mediums, enthält und die im Unterschied zu dem wässrigen Flüssigmedium (1) im wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen.

[0077] Die in der Zuckerquelle enthaltenen Mono-, Di- oder Oligosacchariden sind vorzugsweise unter Monosacchariden, in der Regel Hexosen und/oder Pentosen, z.B. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Sorbose, Xylose, Arabinose und Ribose, speziell unter Glucose, Fructose und Galactose, und Disacchariden wie Saccharose, Maltose, Lactose, speziell Saccharose, ausgewählt. Geeignet sind auch Mischungen von Monosacchariden und Disacchariden, sowie Oligosaccharide mit einem hohen Anteil eingebauter Glucose und deren Mischungen mit Monosacchariden und/oder Disacchariden

[0078] Beispiele für Zusammensetzungen, die verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthalten und die im wesentlichen frei sind von in Wasser unlöslichen Feststoffen umfassen Glucosesirupe, Saccharaosesirupe, Dicksäfte, Maltosesirupe, Dextrinsirupe aber auch Abfallprodukte der Zuckerherstellung (Melassen), insbesondere Melassen aus der Rübenzuckerherstellung sowie Melassen aus der Rohrzuckerherstellung.

[0079] Bevorzugt sind insbesondere Substanzen, die überwiegend Mono- und/oder Disaccharide, insbesondere Glucose und/oder Saccharose enthalten, sowie Mischungen die Glucose und/oder Saccharose und Oligosaccharide mit einem hohen Anteil eingebauter Glucose enthalten, z.B. Glucose, Saccharose, Glucosesirupe, Saccharaosesirupe, Dicksäfte und Melassen.

[0080] Die Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide beziehungsweise die sie enthaltende Zusammensetzungen können ebenso wie das Flüssigmedium (1) sowohl zum Ansetzen der Fermentationsmediums (Batchphase) als auch zum Zufüttern während der Fermentation, wenn diese als Fed-Batch, bzw. semikontinuierlich durchgeführt wird, eingesetzt werden.

[0081] Die durch Zugabe des Flüssigmediums (1) in die Fermentation eingebrachte Gesamtmenge an Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden, macht vorzugsweise wenigstens 40 Gew.-%, insbesondere wenigstens 50 Gew.-%, besonders bevorzugt wenigstens 60 Gew.-%, z.B. 40 bis 95 Gew.-%, insbesondere 50 bis 90 Gew.-% und speziell 60 bis 90 Gew.-% der Gesamtmenge der in die Fermentation eingebrachten Mono-, Di- und Oligosacchariden aus.

[0082] Flüssigmedium (1) und die Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide, bzw. die sie enthaltenen Zusammensetzungen können separat voneinander oder zusammen der Fermentation zugeführt werden.

[0083] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Flüssigmedium (1) und die Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide bzw. die sie enthaltende Zusammensetzung vor der Zugabe zur Fermentation miteinander vermischt. Auf diese Weise wird bei Einsatz eines niedrig konzentrierten Flüssigmediums, das in der Regel eine Gesamtkonzentration an Mono-, Di- und Oligosacchariden von 100 bis 400 g/kg aufweist, der Gesamtzuckergehalt des nach den Schritten a1) und a2) erhaltenen zuckerhaltigen Flüssigmediums (1) erhöht, und zwar vorzugsweise um wenigstens 50 g/kg, insbesondere wenigstens 100 g/kg, speziell wenigstens 150 g/kg, z.B. um 50 bis 300 g/kg, insbesondere um 100 bis 250 g/kg und speziell um 120 bis 200 g/kg auf mehr als 40 Gew.-%, bevorzugt auf wenigstens 45 Gew.-%, insbesondere auf wenigstens 50 Gew.-% und besonders bevorzugt auf wenigstens 55 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht.

[0084] Nach der Zugabe dieser Zuckerquellen zum Flüssigmedium (1) weist das resultierende Flüssigmedium vorzugsweise einen Trockenmassegehalt im Bereich von 45 bis 80 Gew.-% und besonders bevorzugt im Bereich von 50 bis 75 Gew.-% oder 55 bis 55 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht, auf. Hierbei ist es vorteilhaft, die Viskosität des Flüssigmediums (1), z.B. mittels Temperatureinstellung, so zu regulieren, dass Werte von maximal 20 Pas, besonders bevorzugt maximal 15 Pas und ganz besonders bevorzugt maximal 8 Pas nicht überschritten werden.

[0085] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werde die Mono- und/oder Disaccharide in Form eines Glucose oder Saccharose enthaltenden Nebenprodukts der Zuckerherstellung zu dem ersten Flüssigmedium (1) gegeben. Beispiele hierfür sind die bei der Zuckerherstellung aus Rohr- oder insbesondere Rüben-

zucker anfallende Melassen.

[0086] Erfindungsgemäß wird das in den Schritten a1) und a2) hergestellte Flüssigmedium (1) und die davon verschiedenen Zuckerquellen einer Fermentation zugeführt, wo sie zur Kultivierung der Mikroorganismen dienen. In der Fermentation werden die mikrobiellen Stoffwechselprodukte von den Mikroorganismen produziert.

[0087] Die Durchführung der Fermentation kann in der dem Fachmann bekannten üblichen Art und Weise erfolgen. Hierzu wird in man der Regel den jeweils gewünschten Mikroorganismus in dem nach dem hier beschriebenen Verfahren erhaltenen Flüssigmedium kultivieren.

[0088] Das Fermentationsverfahren kann sowohl diskontinuierlich (Batchfahrweise) als auch semikontinuierlich (Fed-Batch-Fahrweise, einschließlich Fedbatch mit Zwischenernten) betrieben werden, wobei die semikontinuierliche Fahrweise bevorzugt ist.

[0089] Beispielsweise kann man das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene Flüssigmedium (1) oder eine konventionelle Zuckerquelle, d.h. verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide oder die Zusammensetzung, welche verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthält und welche typischerweise im wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen oder deren Mischung, gegebenenfalls nach Verdünnen mit Wasser und Zugabe üblicher Medienbestandteile wie Puffer, Nährsalze, Stickstoffquellen wie Ammoniumsulfat, Harnstoff etc. komplexe Nährmedienbestandteile, enthaltend Aminosäuren, wie Hefeextrakte, Peptone, CSL und dergleichen, mit dem gewünschten Mikroorganismus inokulieren, und diesen unter Fermentationsbedingungen vermehren, bis die Mikroorganismenkonzentration den für die Fermentation gewünschten stationären Zustand erreicht. Hierbei wird der in dem Flüssigmedium (1) enthaltene Zucker verstoffwechselt und das gewünschte Stoffwechselprodukt gebildet (sogenannte Batchfahrweise oder Batchphase).

[0090] Bei der Fed-Batch-Fahrweise wird dann durch Zufuhr von weiterem, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichem Flüssigmedium (1) und der davon verschiedenen Zuckerquelle, insbesondere durch Zufuhr des durch Vermischen des Flüssigmediums (1) mit der davon verschiedenen Zuckerquelle erhaltenen Flüssigmediums der Fermentationsprozess weiter fortgeführt und das vom Mikroorganismus überproduzierte Stoffwechselprodukt reichert sich in der Fermentationsbrühe an, wobei das Stoffwechselprodukt sowohl in den Zellen des Mikroorganismus als auch in der wässrigen Phase des Fermentationsmediums vorliegen kann.

[0091] Vorzugsweise wird man die Fermentation semikontinuierlich, d.h. als Fed-Batch durchführen. Dabei wird man so vorgehen, dass man den Mikroorganismus zunächst unter Verwendung eines zuckerhaltigen Flüssigmediums, beispielsweise unter Verwendung eines Flüssigmediums (1) oder einer anderen Zuckerquelle, vermehrt, bis die gewünschte Mikroorganismenkonzentration im Fermenter erreicht ist. Anschließend werden das Flüssigmedium (1) zusammen mit der weiteren Zuckerquelle, d.h. verstoffwechselbaren Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden oder einem Medium, das verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthält und das im wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen, dem Fermenter zugeführt. Hierdurch wird der Fermentationsprozess aufrechterhalten und das vom Mikroorganismus überproduzierte Stoffwechselprodukt reichert sich in der Fermentationsbrühe an (s.o.). Dabei liegt das Volumenverhältnis von zugeführtem zuckerhaltigen Flüssigmedium (1) und der weiteren Zuckerquelle, zu dem vorgelegten und die Mikroorganismen enthaltenden Batch-Medium im Allgemeinen im Bereich von etwa 1:10 bis 10:1 und vorzugsweise bei etwa 1:5 bis 5:1 und speziell im Bereich von 1:1 bis 5:1. Insbesondere über die Zufuhrgeschwindigkeit des zuckerhaltigen Flüssigmediums kann der Zuckergehalt in der Fermentationsbrühe reguliert werden. In der Regel wird man die Zufuhrgeschwindigkeit so einstellen, dass der Monosaccharidgehalt in der Fermentationsbrühe im Bereich von > 0 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-% liegt und insbesondere einen Wert von 3 Gew.-% nicht überschreitet.

[0092] Das in Schritt a2) erhaltene, zuckerhaltige Flüssigmedium oder dessen Mischung mit der weiteren Zuckerquelle kann vor der Fermentation gegebenenfalls sterilisiert werden, wobei man die Mikroorganismen üblicherweise durch thermische oder chemische Verfahren abtötet. Hierzu heizt man das zuckerhaltige Flüssigmedium üblicherweise auf Temperaturen oberhalb 80°C auf. Die Abtötung bzw. Lyse der Zellen kann unmittelbar vor der Fermentation erfolgen. Hierzu wird die gesamte zuckerhaltige Flüssigmedium der Lyse bzw. Abtötung zugeführt. Diese kann thermisch, mechanisch oder chemisch erfolgen.

[0093] Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von organischen nicht-flüchtigen Verbindungen mit mindestens 3 C-Atomen oder mit mindestens 2 C-Atomen und mindestens 1 N-Atom. Hierbei werden unter nichtflüchtigen organischen Verbindungen solche Verbindungen verstanden, die sich auf destil-

lativem Weg nicht unzersetzt aus der Fermentationsbrühe gewinnen lassen. Diese Verbindungen weisen in der Regel einen Siedepunkt oberhalb des Siedepunktes von Wasser, häufig oberhalb 150°C und insbesondere oberhalb 200°C bei Normaldruck auf. In der Regel handelt es sich um Verbindungen, die bei Normalbedingungen (298 K, 101,3 kPa) in festem Zustand vorliegen.

[0094] Es ist jedoch auch möglich, das erfindungsgemäße zuckerhaltige Flüssigmedium in einer Fermentation zur Herstellung nichtflüchtiger mikrobieller Stoffwechselprodukte einzusetzen, die bei Normaldruck einen Schmelzpunkt unterhalb des Siedepunktes von Wasser oder/und eine ölige Konsistenz aufweisen. Der Begriff nichtflüchtige mikrobielle Stoffwechselprodukte umfasst hierin insbesondere organische, gegebenenfalls 1 oder mehrere, z. B. 1, 2, 3 oder 4 Hydroxylgruppen tragende Mono-, Di- und Tricarbonsäuren mit vorzugsweise 3 bis 10 C-Atomen, z.B. Weinsäure, Itaconsäure, Bernsteinsäure, Propionsäure, Milchsäure, 3-Hydroxypropionsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, 2,5-Furandicarbonsäure, Glutarsäure, Lävulinsäure, Gluconsäure, Aconitinsäure und Diaminopimelinsäure, Zitronensäure; proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren, z.B. Lysin, Glutamat, Methionin, Phenylalanin, Asparaginsäure, Tryptophan und Threonin; Purin- und Pyrimidinbasen; Nukleoside und Nukleotide, z.B. Nikotinamidadeninindinukleotid (NAD) und Adenosin-5'-monophosphat (AMP); Lipide; gesättigte und ungesättigte Fettsäuren mit vorzugsweise 10 bis 22 C-Atomen, z.B. γ -Linolensäure, Dihomo- γ -Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure; Diole mit vorzugsweise 3 bis 8 C-Atomen, z.B. Propandiol und Butandiol; höherwertige Alkohole mit 3 oder mehr, z.B. 3, 4, 5 oder 6 OH-Gruppen, z.B. Glycerin, Sorbitol, Manitol, Xylitol und Arabinitol; längerkettige Alkohole mit wenigstens 4 C-Atomen, z.B. mit 4 bis 22 C-Atomen, z.B. Butanol; Kohlenhydrate, z.B. Hyaluronsäure und Trehalose; aromatische Verbindungen, z.B. aromatische Amine, Vanillin und Indigo; Vitamine und Provitamine, z.B. Ascorbinsäure, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂ und Riboflavin, Cofaktoren und sogenannte Nutrazeutika; Proteine, z.B. Enzyme wie Amylasen, Pektinasen, saure, hybride oder neutrale Zellulasen, Esterasen wie Lipasen, Pankreasen, Proteasen, Xylanasen und Oxidoreduktasen wie Laccase, Katalase und Peroxidase, Glucanasen, Phytasen; Carotenoide, z.B. Lycopin, β -Carotin, Astaxanthin, Zeaxanthin und Canthaxanthin; Ketone mit vorzugsweise 3 bis 10 C-Atomen und gegebenenfalls 1 oder mehreren Hydroxylgruppen, z.B. Aceton und Acetoin; Lactone, z.B. γ -Butyrolacton, Cyclodextrine, Biopolymere, z.B. Polyhydroxyacetat, Polyester, z.B. Polylactid, Polysaccharide, Polyisoprenoide, Polyamide; sowie Vorstufen und Derivate der vorgenannten Verbindungen. Weitere als nichtflüchtige mikrobielle Stoffwechselprodukte in Frage kommende Verbindungen sind von Gutcho in *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086 beschrieben.

[0095] Der Begriff "Cofaktor" umfasst nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Beispiele solcher Moleküle sind NAD und Nikotinamidadeninindinukleotidphosphat (NADP); die Vorstufe dieser Cofaktoren ist Niacin.

[0096] Der Begriff "Nutrazeutikum" umfasst Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und bestimmte Lipide, z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren.

[0097] Insbesondere sind die hergestellten Stoffwechselprodukte unter Enzymen, Aminosäuren, Vitaminen, Disacchariden, aliphatischen Mono- und Dicarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen, aliphatischen Hydroxycarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen, Ketonen mit 3 bis 10 C-Atomen, Alkanolen mit 4 bis 10 C-Atomen und Alkandiolen mit 3 bis 10 und insbesondere 3 bis 8 C-Atomen ausgewählt.

[0098] Es versteht sich für den Fachmann, dass die derart auf fermentativem Weg hergestellten Verbindungen jeweils in der von den eingesetzten Mikroorganismen produzierten Enantiomerenform erhalten werden (sofern unterschiedliche Enantiomere existieren). So erhält man z.B. von den Aminosäuren in der Regel das jeweilige L-Enantiomer.

[0099] Die in der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen richten sich in an sich bekannter Weise nach den jeweiligen mikrobiellen Stoffwechselprodukten, wie unten im einzelnen erläutert. Sie können natürlichen Ursprungs oder genetisch modifiziert sein. Beispiele für geeignete Mikroorganismen und Fermentationsverfahren sind z.B. in Tabelle A angegeben.

Tabelle A:

Stoff	Mikroorganismus	Referenz
Weinsäure	<i>Lactobacilli</i> , (z. B. <i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Itaconsäure	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus itaconicus</i>	Jakubowska, in Smith u. Pateman (Hrsg.), Genetics and Physiology of <i>Aspergillus</i> , London: Academic Press 1977; Miall, in Rose (Hrsg.), Economic Microbiology, Vol. 2, S. 47 –119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
Bernsteinsäure	<i>Actinobacillus</i> sp. 130Z, <i>Anaerobiospirillum succiniproducens</i> , <i>Actinobacillus succinogenes</i> , <i>E. coli</i>	Int. J. Syst. Bacteriol. 26 , 498 –504 (1976); EP 249773 (1987), Erf.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), Erf.: Guettler, Jain u. Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 –342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., <i>Actinobacillus succinogenes</i> sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:207-16; US5723322, US5573931, US5521075, WO99/06532, US5869301, US 5770435
Hydroxypropionsäure	<i>Lactobacillus delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> od. <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	RÖMPP Online Version 2.2

Stoff	Mikroorganismus	Referenz
Propionsäure	<i>Propionibacterium</i> , z. B. <i>P. arabinosum</i> , <i>P. schermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>Clostridium propionicum</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Diaminopimelinsäure	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Zitronensäure	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3 , 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7 , 221–234 (1993); 10 , 13–27 (1996).
Aconitsäure	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>	Crit. Rev. Biotechnol. 3 , 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7 , 221–234 (1993); 10 , 13–27 (1996).; Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995;
Äpfelsäure	<i>Aspergilli</i> , z.B. <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Corynebacterium</i>	US 3063910
Gluconsäure	<i>Aspergilli</i> , z.B. <i>A. niger</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Buttersäure	<i>Clostridium</i> (z. B. <i>Clostridium acetobutlicum</i> , <i>C. butyricum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995;
Milchsäure	<i>Lactobacillus</i> z.B. <i>L. delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995;
Lysin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79 , 1-35.
Glutamat	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79 , 1-35.
Methionin	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79 , 1-35.
Phenylalanin	<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>E. coli</i>	Trends Biotechnol. 3 , 64 –68 (1985); J. Ferment. Bioeng. 70 , 253–260 (1990).

Stoff	Mikroorganismus	Referenz
Threonine	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Asparaginsäure	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35+dort. zit. Lit., Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)
Purin- und Pyrimidinbasen	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Nikotinamidadenin dinukleotid (NAD)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Adenosin-5'-monophosphat (AMP)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
γ -Linolensäure	<i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Matser Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Dihomo- γ -Linolensäure	<i>Mortierella</i> , <i>Conidiobolus</i> , <i>Saprolegnia</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Matser Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Arachidonsäure	<i>Mortierella</i> , <i>Phytium</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Matser Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).

Stoff	Mikroorganismus	Referenz
Eicosapentaensäure	<i>Mortierella</i> , <i>Phytium</i> spp., <i>Rhodospseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Matser Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Docosahexaensäure	<i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> spp., <i>Rhodospseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Matser Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Propandiol	<i>E. coli</i>	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309
Butandiol	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973); H. G. SCHLEGEL and H. W. JANNASCH, 1981; Afschar et al.: Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol. CIT 64 (6), 2004, 570-571
Butanol	<i>Clostridium</i> (z. B. <i>Clostridium acetobutlicum</i> , <i>C. propionicum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Glycerin	Hefe, <i>Saccharomyces rouxii</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Mannitol	<i>Aspergillus candidus</i> , <i>Torulopsis mannifaciens</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Arabitol	<i>Saccharomyces rouxii</i> , <i>S. mellis</i> , <i>Sclerotium glucanicum</i> , <i>Pichia ohmeri</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Xylitol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Hyaluronsäure	<i>Streptococcus</i> sp.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995;

Stoff	Mikroorganismus	Referenz
Trehalose	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Pleurotus</i> genus, <i>Filobasidium floriforme</i>	JP 05099974, JP 06311891, FR 2671099, EP 0555540, JP 3053791, Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: Trehalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, <i>Filobasidium floriforme</i> . Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
Ascorbinsäure	<i>Gluconobacter melanogenes</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Vitamin B ₁₂	<i>Propionibacterium</i> spp., <i>Pseudomonas denitrificans</i>	Chem. Ber. 1994, 923 –927; RÖMPP Online Version 2.2
Riboflavin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Ashbya Gossypii</i>	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B ₂) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48.
Vitamin B ₆	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>R. meliloti</i>	EP0765939
Enzyme	<i>Apergilli</i> (z. B. <i>Aspergillus niger</i> A. <i>oryzae</i>), <i>Trichoderma</i> , <i>E.coli</i> , <i>Hanseluna</i> oder <i>Pichia</i> (z. B. <i>Pichia pastorius</i> ?), <i>Bacillus</i> (z.B. <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>) u. v. a.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Zeaxanthin	<i>Dunaliella salina</i>	Jin et al (2003) Biotech.Bioeng. 81:115–124
Canthaxanthin	<i>Brevibacterium</i>	Nelis et al (1991) J Appl Bacteriol 70:181–191
Lycopin	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i>	WO 03/056028, EP 01/201762, WO 01/12832, WO 00/77234, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226–1229

Stoff	Mikroorganismus	Referenz
β-Carotin	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i>	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene from <i>Blakeslea trispora</i> with Span 20, <i>Biotechnology Letters</i> , Vol 19, No 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and morphology of <i>Blakeslea trispora</i> in a stirred tank reactor: mathematical modelling, <i>Biochemical Engineering Journal</i> 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura et al (1998) <i>Appl Environ Microbiol</i> 64:1226–1229
Astaxanthin	<i>Phaffia Rhodozyma</i> ; <i>Candida utilis</i>	US 00/5599711; US 90/00558; WO 91/02060, Miura et al (1998) <i>Appl Environ Microbiol</i> 64:1226–1229
Polyhydroxyalkanoate, Polyester	<i>Escherchia coli</i> , <i>Alcaligenes latus</i> , u.v.a.	S. Y. Lee, Plastic Bacteria? Progress and Prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, <i>Tibtech</i> , Vo. 14, (1996), S. 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (Hg.), <i>Biopolymers</i> , 1. Aufl., 2003, Wiley-VCH, Weinheim und dort zitierte Literatur
Polysaccharide	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. dextranicum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , u. v. a.	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973),
Polysisoprenoide	<i>Lactarius sp.</i> , <i>Hygrophorus sp.</i> , <i>Russula sp.</i>	Steinbüchel (Hg.), <i>Biopolymers</i> , 1. Aufl., 2003, Wiley-VCH, Weinheim und dort zitierte Literatur
Aceton	<i>Clostridium</i> (z. B. <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i>)	Rehm, H.-J.: <i>Biotechnology</i> , Weinheim, VCH, 1980 und 1993-1995; Gutcho, <i>Chemicals by Fermentation</i> , Noyes Data Corporation (1973)
Acetoin	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Hrsg., <i>Biology of the Procaryotes</i> , Thieme, Stuttgart (1999), S.307; RÖMPP Online-Edition
Vanillin	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Amycolatopsis sp.</i>	Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. <i>Biotechnological production of vanillin</i> . <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 56, 296-314 (2001)

Stoff	Mikroorganismus	Referenz
Thuringensin	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Jian-Zhong Jong et al.: Fed-batch culture of <i>Bacillus thuringiensis</i> for thuringensin production in a tower type bioreactor. <i>Biotechnology and Bioengineering</i> 48 (3) (2004), 207-213.
Polyketide	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i>	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. <i>Pure & Appl. Chem.</i> 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle et al.: Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of <i>Sorangium cellulosum</i> So ce26 in <i>Streptomyces lividans</i> . <i>Microbiology</i> 150 (8), (2004), 2761-74.
Gibberellinsäure	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hollmann et al.: Extraktiv-Fermentation von Gibberellinsäure mit <i>Gibberella fujikuroi</i> . <i>CIT</i> 7 (1995), 892-895.
Indigo	<i>Escherichia coli</i> JB 102	Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. <i>Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology</i> 28 (2002), 127-133.

[0100] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist die hergestellte organische Verbindung unter gegebenenfalls Hydroxylgruppen tragenden Mono-, Di- und Tricarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen, proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Purinbasen, Pyrimidinbasen; Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden; gesättigten und ungesättigten Fettsäuren; Diolen mit 4 bis 10 C-Atomen, höherwertigen Alkoholen mit 3 oder mehr Hydroxylgruppen, längerkettigen Alkoholen mit wenigstens 4 C-Atomen, Kohlenhydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Provitaminen, Cofaktoren, Nutrazeutika, Proteinen, Carotenoiden, Ketonen mit 3 bis 10 C-Atomen, Lactonen, Biopolymeren und Cyclodextrinen ausgewählt.

[0101] Eine erste bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft den Einsatz des erfindungsgemäß erhältlichen zuckerhaltigen Flüssigmediums in einer fermentativen Herstellung von Enzymen wie Phytasen, Xylanasen oder Glucanasen.

[0102] Eine zweite bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft den Einsatz des erfindungsgemäß erhältlichen zuckerhaltigen Flüssigmediums in einer fermentativen Herstellung von Aminosäuren wie Lysin, Methionin, Threonin.

[0103] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft den Einsatz des erfindungsgemäß erhältlichen zuckerhaltigen Flüssigmediums in einer fermentativen Herstellung von Vitaminen wie Pantothersäure und Riboflavin, Vorläufern und Folgeprodukten davon.

[0104] Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung betreffen den Einsatz des erfindungsgemäß erhältlichen zuckerhaltigen Flüssigmediums in einer fermentativen Herstellung von Mono-, Di- und Tricarbonsäuren, insbesondere aliphatischen Mono- und Dicarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen wie Propionsäure, Fumarsäure und Bernsteinsäure, aliphatischen Hydroxycarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen wie Milchsäure; von den vorgenannten längerkettigen Alkanolen, insbesondere Alkanolen mit 4 bis 10 C-Atomen wie Butanol; von den vorgenannten Diolen, insbesondere Alkandiolen mit 3 bis 10 und insbesondere 3 bis 8 C-Atomen wie Propan-diol; von den vorgenannten Ketonen, insbesondere Ketonen mit 3 bis 10 C-Atomen wie Aceton; und von den vorgenannten Kohlenhydraten und insbesondere Disacchariden wie Trehalose.

[0105] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um Polyhydroxyalkanoate wie Poly-3-hydroxybutyrat und Copolyester mit anderen organischen Hydroxycarbonsäuren wie 3-Hydroxyvaleriansäure, 4-Hy-

droxybuttersäure und anderen, die in Steinbüchel (a.a.O.) beschrieben sind, z.B. auch längerkettige Hydroxycarbonsäuren wie 3-Hydroxyoctansäure, 3-Hydroxydecansäure und 3-Hydroxytetradecansäure, sowie Mischungen davon. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in S. Y. Lee, *Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria*, Tibtech, Bd. 14, (1996), S. 431–438.

[0106] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen daher ausgewählt unter natürlichen oder rekombinanten Mikroorganismen, die wenigstens eines der folgenden Stoffwechselprodukte überproduzieren:

- Enzyme wie Phytase, Xylanase oder Glucanase;
- Aminosäuren wie Lysin, Threonin oder Methionin;
- Vitamine wie Pantothersäure und Riboflavin; Vorläufer und/oder Folgeprodukte davon;
- Disaccharide wie Trehalose;
- aliphatische Mono- und Dicarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen wie Propionsäure, Fumarsäure und Bernsteinsäure;
- aliphatische Hydroxycarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen wie Milchsäure;
- Polyhydroxyalkanoate wie Poly-3-hydroxybutyrat und Copolyester der 3-Hydroxybuttersäure;
- Ketone mit 3 bis 10 C-Atomen wie Aceton;
- Alkanole mit 4 bis 10 C-Atomen wie Butanol; und Alkandiole mit 3 bis 8 C-Atomen wie Propandiol.

[0107] Geeignete Mikroorganismen sind üblicherweise ausgewählt unter den Gattungen *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* und *Clostridium*, insbesondere unter Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* oder *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus oryzae*.

[0108] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation eingesetzten Mikroorganismus um einen Stamm aus der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere um einen Stamm des *Corynebacterium glutamicum*. Insbesondere handelt es sich um einen Stamm der Gattung *Corynebacterium*, speziell des *Corynebacterium glutamicum*, welcher eine Aminosäure, speziell Lysin, Methionin oder Glutamat überproduziert.

[0109] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation eingesetzten Mikroorganismus um einen Stamm aus der Gattung *Escherichia*, insbesondere um einen Stamm des *Escherichia coli*. Insbesondere handelt es sich um einen Stamm der Gattung *Escherichia*, speziell des *Escherichia coli*, welcher eine Aminosäure, speziell Lysin, Methionin oder Threonin überproduziert.

[0110] In einer speziellen bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um Lysin. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in Pfefferle et al., a.a.O., und US 3,708,395. Prinzipiell kommen sowohl eine kontinuierliche als auch eine diskontinuierliche (Batch oder Fed-Batch) Betriebsweise in Betracht, bevorzugt ist die Fed-Batch Betriebsweise.

[0111] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um Methionin. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in WO 03/087386 und WO 03/100072.

[0112] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um Pantothersäure. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in der WO 01/021772.

[0113] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um Riboflavin. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere

Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 und Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44–48.

[0114] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um Fumarsäure. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in Rhodes et al, *Production of Fumaric Acid in 20-L Fermentors*, *Applied Microbiology*, 1962, 10 (1), 9–15.

[0115] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um Bernsteinsäure. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 498–504 (1976); EP 249773 (1987), Erf.: Lemme u. Datta; US 5504004 (1996), Erf.: Guettler, Jain u. Soni; *Arch. Microbiol.* 167, 332–342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jan; 49 Pt 1:207–16; US 5723322, US 5573931, US 5521075, WO99/06532, US5869301 oder US5770435.

[0116] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt um eine Phytase. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in der WO 98/55599.

[0117] Bei der Fermentation resultiert eine Fermentationsbrühe, die neben dem gewünschten mikrobiellen Stoffwechselprodukt im Wesentlichen die während der Fermentation erzeugte Biomasse, die nicht verstoffwechselten Bestandteile der verzuckerten Stärkelösung und insbesondere die nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle, wie z.B. Fasern und nicht verwertete Zucker, sowie nicht verwertete Puffer- und Nährsalze enthält. Dieses Flüssigmedium wird in der vorliegenden Anmeldung auch als Fermentationsbrühe bezeichnet, wobei der Ausdruck Fermentationsbrühe auch das (zuckerhaltige) Flüssigmedium umfasst, bei dem eine erst teilweise oder unvollständige fermentative Umsetzung der darin enthaltenen Zucker, d.h. eine teilweise oder unvollständige mikrobielle Verstoffwechslung der verwertbaren Zucker (z.B. Mono- und Disaccharide), erfolgt ist.

[0118] Vor der Isolierung oder Abreicherung eines mikrobiellen Stoffwechselprodukts oder Abtrennung der flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe, wird gegebenenfalls ein Sterilisierungsschritt in der oben beschriebenen Weise durchgeführt.

[0119] Eine spezielle Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren, bei dem man wenigstens ein mikrobielles Stoffwechselprodukt aus der Fermentationsbrühe abreichert oder isoliert. Die flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe werden anschließend weitgehend entfernt, wobei man eine feste oder halbfeste Proteinzusammensetzung erhält. Eine genauere Beschreibung zur Durchführung eines solchen Verfahrens und der dabei erhaltenen Proteinzusammensetzung ist Gegenstand der älteren Patentanmeldung PCT/EP2005/005728 der Anmelderin, auf die bezüglich weiterer Details Bezug genommen wird.

[0120] Die Isolierung oder Abreicherung des Stoffwechselprodukts aus der Fermentationsbrühe, d.h. der organischen Verbindung mit wenigstens 3 C-Atomen oder wenigstens 2 C-Atomen und wenigstens einen N-Atom (im folgenden auch Wertprodukt), erfolgt in der Regel derart, dass man wenigstens ein Stoffwechselprodukt so aus der Fermentationsbrühe abreichert oder isoliert, dass der Gehalt dieses Stoffwechselprodukts in der verbleibenden Fermentationsbrühe höchstens 20 Gew.-%, insbesondere höchstens 10 Gew.-%, speziell höchstens 5 Gew.-% und ganz speziell höchstens 2,5 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht der verbleibenden Fermentationsbrühe, beträgt.

[0121] Die Isolierung oder Abreicherung des mikrobiellen Stoffwechselprodukts aus der Fermentationsbrühe kann in einem oder mehreren Schritten erfolgen. Ein wesentlicher Schritt dabei ist die Abtrennung der festen Bestandteile aus der Fermentationsbrühe. Diese kann entweder vor oder nach der Isolierung des Wertprodukts durchgeführt werden. Sowohl zur Isolierung von Wertstoffen als auch zur Abtrennung von Feststoffen, d.h. Fest-Flüssig-Phasenseparation, sind im Fachgebiet übliche Methoden bekannt, die auch Schritte zur Grob- und Feinreinigung der Wertstoffe sowie zur Konfektionierung umfassen (z.B. beschrieben in Belter, P. A, *Bio-separations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons (1988), und Ullmann's *Encyclope-*

dia of Industrial Chemistry, 5. Aufl. auf CD-ROM, Wiley-VCH).

[0122] Zur Isolierung des Wertprodukts kann man vorteilhafterweise so vorgehen, dass man zunächst die festen Bestandteile aus der Fermentationsbrühe entfernt, z.B. mittels Zentrifugation oder Filtration, und anschließend das Wertprodukt aus der flüssigen Phase isoliert, z.B. durch Kristallisation, Fällung, Adsorption oder Destillation. Alternativ kann das Wertprodukt auch direkt aus der Fermentationsbrühe isoliert werden, z.B. durch Einsatz chromatographischer Verfahren oder von Extraktions-Verfahren. Als chromatographisches Verfahren ist insbesondere die Ionenaustauschchromatographie zu nennen, bei der das Wertprodukt selektiv auf der Chromatographiesäule isoliert werden kann. In diesem Fall erfolgt die Abtrennung der Feststoffe aus der verbleibenden Fermentationsbrühe vorteilhafterweise z.B. durch Dekantieren, Eindampfen oder/und Trocknung.

[0123] Im Falle flüchtiger oder öliger Verbindungen ist in der Regel eine Kontrolle der maximalen Temperaturen während der Aufarbeitung, insbesondere während der Trocknung erforderlich. Vorteilhaft können diese Verbindungen auch dadurch hergestellt werden, dass man sie in quasi fester Form (pseudofester Form) auf Adsorbentien formuliert. Zu diesem Zweck geeignete Adsorbentien sind z.B. in der älteren Patentanmeldung PCT/EP2005/005728 der Anmelderin angegeben. Beispiele für Verbindungen, die vorteilhaft auf diese Weise hergestellt werden können, sind γ -Linolensäure, Dihomo- γ -Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure, weiterhin Propionsäure, Milchsäure, Propandiol, Butanol und Aceton. Auch diese Verbindungen in pseudofester Formulierung werden im Sinne der vorliegenden Erfindung als nichtflüchtige mikrobielle Stoffwechselprodukte in fester Form verstanden.

[0124] Eine weitere spezielle Ausführungsform betrifft ein Verfahren, bei dem man die flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe ohne vorherige Isolierung oder Abreicherung eines nichtflüchtigen mikrobiellen Stoffwechselprodukts, und gegebenenfalls ohne vorherige Abtrennung fester Bestandteile, mindestens teilweise entfernt, wobei man eine feste Formulierung eines nichtflüchtigen mikrobiellen Stoffwechselprodukts erhält. Eine genauere Beschreibung zur Durchführung eines solchen Verfahrens findet sich in der älteren Patentanmeldung DE 10 2005 042 541.0 der Anmelderin.

[0125] Weitgehend bedeutet, dass nach Entfernung der flüchtigen Bestandteile ein fester oder zumindest halbfester Rückstand verbleibt, der sich gegebenenfalls durch Zusatz von Feststoffen in ein festes Produkt überführen lässt. In der Regel bedeutet dies, die flüchtigen Bestandteile bis zu einem Restfeuchtegehalt von nicht mehr als 30 Gew.-%, häufig nicht mehr als 20 Gew.-% und insbesondere nicht mehr als 15 Gew.-%, zu entfernen. In der Regel wird man die flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe vorteilhafterweise bis auf einen Restfeuchtigkeitsgehalt im Bereich von 0,2 bis 30 Gew.-%, bevorzugt 1 bis 20 Gew.-%, besonders bevorzugt 2 bis 15 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt 5 bis 15 Gew.-%, bezogen auf das nach Trocknung ermittelte Gesamtgewicht der festen Bestandteile, aus der Fermentationsbrühe entfernen. Der Restfeuchtigkeitsgehalt kann durch übliche dem Fachmann bekannte Verfahren bestimmt werden, z.B. mittels Thermogravimetrie (Hemminger et al., Methoden der thermischen Analyse, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989).

[0126] Die Gewinnung des(der) nichtflüchtigen Stoffwechselprodukts(-produkte) in fester Form aus der Fermentationsbrühe in Schritt kann in ein, zwei oder mehreren Stufen erfolgen, insbesondere in einem ein- oder zweistufigen Vorgehen. In der Regel wird mindestens eine, insbesondere die abschließende Stufe zur Gewinnung des Stoffwechselprodukts in fester Form einen Trocknungsschritt umfassen.

[0127] Bei der einstufigen Vorgehensweise wird man die flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe, gegebenenfalls nach vorgenannter Vorabtrennung, entfernen, bis der gewünschte Restfeuchtigkeitsgehalt erreicht ist.

[0128] Bei der zwei- oder mehrstufigen Vorgehensweise wird man die Fermentationsbrühe, zunächst aufkonzentrieren, z.B. mittels (Mikro-, Ultra-)Filtration oder thermisch durch Verdampfen eines Teils der flüchtigen Bestandteile. Der Anteil der flüchtigen Bestandteile, die in dieser Stufe entfernt werden beträgt in der Regel 10 bis 80 Gew.-% und insbesondere 20 bis 70 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe. In einer oder mehreren sich anschließenden Stufen werden die restlichen flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe entfernt, bis der gewünschte Restfeuchtigkeitsgehalt erreicht ist.

[0129] Das Entfernen der flüchtigen Bestandteile des Flüssigmediums erfolgt gemäß dieser Ausführungsform im Wesentlichen ohne eine vorherige Abreicherung oder gar Isolierung des Wertprodukts. Folglich wird bei der Entfernung der flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe das nichtflüchtige Stoffwechselprodukt im Wesentlichen nicht zusammen mit den flüchtigen Bestandteilen des Flüssigmediums entfernt, sondern verbleibt mit wenigstens einem Teil, üblicherweise mit der Hauptmenge und insbesondere mit der Gesamtmenge der

sonstigen festen Bestandteile aus der Fermentationsbrühe im so erhaltenen Rückstand. Dementsprechend können aber auch – vorzugsweise geringe – Anteile des gewünschten nichtflüchtigen mikrobiellen Stoffwechselprodukts, in der Regel maximal 20 Gew.-%, z.B. 0,1 bis 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 10, insbesondere nicht mehr als 5 Gew.-%, besonders bevorzugt maximal 2,5 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt maximal 1 Gew.-%, bezogen auf das Gesamttrockengewicht des Stoffwechselprodukts, beim Entfernen der flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe zusammen mit diesen entfernt werden. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform verbleibt das gewünschte nichtflüchtige mikrobielle Stoffwechselprodukt zu wenigstens 90 Gew.-%, insbesondere wenigstens 95 Gew.-%, speziell 99 Gew.-% und ganz speziell etwa 100 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gesamttrockengewicht des Stoffwechselprodukts, als Feststoff in Mischung mit dem nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile erhaltenen Teil oder der Gesamtheit der festen Bestandteile des Fermentationsmediums.

[0130] Sofern gewünscht, kann vor dem Entfernen der flüchtigen Bestandteile gemäß ein Teil, z.B. 5 bis 80 Gew.-% und insbesondere 30 bis 70 Gew.-%, der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile aus der Fermentationsbrühe abgetrennt werden, z.B. mittels Zentrifugation oder Filtration. Gegebenenfalls wird man eine solche Vorabtrennung durchführen, um gröbere Feststoffpartikel, die keine oder nur geringe Anteile an nichtflüchtigem mikrobiellen Stoffwechselprodukt enthalten, zu entfernen. Zur Vorfiltration können dem Fachmann bekannte, übliche Verfahren, z.B. unter Verwendung grobmaschiger Siebe, Netze, Lochbleche, oder dergleichen angewendet werden. Gegebenenfalls kann eine Abtrennung grober Feststoffpartikel auch in einem Fliehkraftabscheider erfolgen. Die hierbei eingesetzten Apparaturen wie Dekanter, Zentrifugen, Sedianter und Separatoren sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Auf diese Weise erhält man einen festen oder halbfesten, z.B. pastösen Rückstand, welcher das nichtflüchtige Stoffwechselprodukt und die nichtflüchtigen, in der Regel festen nicht-stärkehaltigen Bestandteile der Stärkequelle oder zumindest große Teile davon, häufig wenigstens 90 Gew.-% oder die Gesamtmenge der festen nicht-stärkehaltigen Bestandteile enthält.

[0131] Durch Zugabe von Formulierungshilfsmitteln wie Träger- und Coatingmaterialien, Bindemitteln sowie anderer Additive können die Eigenschaften des getrockneten und zusammen mit den festen Bestandteilen der Fermentation vorliegenden Stoffwechselprodukts gezielt hinsichtlich verschiedener Parameter wie Wirkstoffgehalt, Korngröße, Partikelform, Neigung zum Stauben, Hygroskopizität, Stabilität, insbesondere Lagerstabilität, Farbe, Geruch, Fließverhalten, Agglomerationsneigung, elektrostatischer Aufladung, Licht- und Temperaturempfindlichkeit, mechanischer Stabilität und Redispersierbarkeit in an sich bekannter Weise konfektioniert werden.

[0132] Zu den üblicherweise verwendeten Formulierungshilfsmitteln gehören z.B. Bindemittel, Trägermaterialien, Puderungs-/Fließhilfsmittel, ferner Farbpigmente, Biozide, Dispergiermittel, Antischaummittel, viskositätsregulierende Mittel, Säuren, Laugen, Antioxidantien, Enzymstabilisatoren, Enzyminhibitoren, Adsorbate, Fette, Fettsäuren, Öle oder Mischungen hieraus. Derartige Formulierungshilfsmittel werden vorteilhaft insbesondere bei Anwendung von Formulierungs- und Trocknungsverfahren wie Sprüh-, Wirbelschicht- und Gefrier-trocknung als Trocknungshilfsmittel eingesetzt. Wegen weiterer Details wird auf die ältere Anmeldung DE 10 2005 042 541.0 verwiesen. Der Anteil an den vorgenannten Zusatzstoffen und gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen wie Coatingmaterialien kann je nach den speziellen Erfordernissen des jeweiligen Stoffwechselprodukts sowie in Abhängigkeit von den Eigenschaften der eingesetzten Zusatzstoffe stark variieren und z.B. im Bereich von 0,1 bis 80 Gew.-% und insbesondere im Bereich von 1 bis 30 Gew.-%, jeweils bezogen auf das Gesamtgewicht des fertig formulierten Produkts bzw. Stoffgemischs, liegen.

[0133] Die Zugabe von Formulierungshilfsmitteln kann vor, während oder nach der Aufarbeitung der Fermentationsbrühe (auch als Produktformulierung oder Feststoffdesign bezeichnet) und insbesondere während der Trocknung erfolgen. Eine Zugabe von Formulierungshilfsmitteln vor Aufarbeitung der Fermentationsbrühe bzw. des Stoffwechselprodukts kann insbesondere vorteilhaft sein, um die Prozessierbarkeit der aufzuarbeitenden Stoffe bzw. Produkte zu verbessern. Die Formulierungshilfsmittel können sowohl dem in fester Form erhaltenen Stoffwechselprodukt als auch einer dieses enthaltenden Lösung oder Suspension zugegeben werden, z.B. nach abgeschlossener Fermentation direkt zu der Fermentationsbrühe oder zu einer im Verlauf der Aufarbeitung erhaltenen Lösung oder Suspension vor dem abschließenden Trocknungsschritt.

[0134] So können die Hilfsstoffe z.B. in eine Suspension des mikrobiellen Stoffwechselprodukts eingemischt werden; eine solche Suspension kann auch auf ein Trägermaterial gegeben werden, z.B. durch Aufsprühen oder Untermischen. Die Zugabe von Formulierungshilfsstoffen während der Trocknung kann z.B. eine Rolle spielen, wenn eine das Stoffwechselprodukt enthaltende Lösung oder Suspension versprüht wird. Insbesondere nach der Trocknung erfolgt eine Zugabe von Formulierungshilfsmitteln z.B. beim Aufbringen von Überzügen bzw. Coatings/Coatingschichten auf getrocknete Partikel. Sowohl nach dem Trocknen als auch nach ei-

nem eventuellen Coatingschritt können dem Produkt weitere Hilfsmittel zugegeben werden.

[0135] Das Entfernen der flüchtigen Bestandteile aus der Fermentationsbrühe erfolgt in an sich bekannter Weise durch übliche Verfahren zur Abtrennung fester Phasen von flüssigen Phasen, einschließlich Filtrationsverfahren und Verfahren zum Verdampfen flüchtiger Bestandteile der flüssigen Phasen. Derartige Verfahren, die auch Schritte zur Grobreinigung der Wertstoffe sowie Schritte zur Konfektionierung umfassen können, werden z.B. in Belter, P. A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988), und Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. Aufl. auf CD-ROM, Wiley-VCH, beschrieben. Im Rahmen der Produktformulierung bzw. der Aufarbeitung nach abgeschlossener Fermentation anwendbare, dem Fachmann bekannte Verfahren, Apparaturen, Hilfsstoffe bzw. allgemeine und spezielle Ausführungsformen sind ferner in 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 und WO 92/12645 beschrieben.

[0136] In einer ersten Variante dieser Ausführungsform wird man das nichtflüchtige mikrobielle Stoffwechselprodukt, sofern es in der flüssigen Phase gelöst vorliegt, aus der flüssigen Phase in die feste Phase überführen, z.B. durch Kristallisation oder Fällung. Anschließend erfolgt eine Abtrennung der nichtflüchtigen festen Bestandteile einschließlich des Stoffwechselprodukts, z.B. mittels Zentrifugation, Dekantieren oder Filtration. In ähnlicher Weise kann man auch ölige Stoffwechselprodukte abtrennen, wobei man die jeweiligen öligen Fermentationsprodukte durch Zusatz von Adsorbentien, z.B. Kieselsäure, Kieselgele, Lehm, Ton und Aktivkohle, in eine feste Form überführt.

[0137] In einer zweiten Variante dieser Ausführungsform werden die flüchtigen Bestandteile durch Verdampfen entfernt. Das Verdampfen kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Beispiele für geeignete Verfahren zum Verdampfen flüchtiger Bestandteile sind die Sprühtrocknung, Wirbelschichttrocknung bzw. -agglomeration, Gefriertrocknung, Strom- und Kontaktrocknern sowie Extrusionstrocknung. Auch eine Kombination der vorgenannten Verfahren mit formgebende Verfahren wie Extrusion, Pelletierung oder Prilling kann vorgenommen werden. Bei diesen letztgenannten Verfahren werden vorzugsweise teilweise oder weitgehend vorgetrocknete Stoffwechselprodukt-haltige Stoffgemische eingesetzt.

[0138] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Entfernen der flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe ein Verfahren zur Sprühtrocknung oder ein Verfahren der Wirbelschichttrocknung, einschließlich der Wirbelschichtgranulierung.

[0139] Hierzu wird die Fermentationsbrühe, gegebenenfalls nach einer Vorabtrennung zur Entfernung grober Feststoffpartikel, die keine oder nur geringe Anteile an nichtflüchtigem mikrobiellen Stoffwechselprodukt enthalten, einer oder mehreren Sprüh- oder Wirbelschichttrocknungsapparaturen zugeführt. Der Transport bzw. die Zuführung der feststoffbeladenen Fermentationsbrühe erfolgt zweckmäßigerweise mittels üblicher Transportvorrichtungen für feststoffhaltige Flüssigkeiten, z.B. Pumpen wie Exzentrerschneckenpumpen (z.B. der Fa. Delasco PCM) oder Hochdruckpumpen (z.B. der Fa. LEWA Herbert Ott GmbH).

[0140] Die Durchführung einer Fermentation kann auch derart erfolgen, dass man

- (i) dem in Schritt a2) erhaltenen Flüssigmedium (1) oder dessen Mischung mit der weiteren Zuckerquelle eine Teilmenge von nicht mehr als 50 Gew.-%, z.B. im Bereich von 5 bis 45 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht, entnimmt und die Restmenge, gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren Zuckerquelle, wie oben definiert, einer Fermentation zur Herstellung eines ersten Stoffwechselprodukts (A), z.B. eines nichtflüchtigen Stoffwechselprodukts (A) in fester Form oder eines flüchtigen Stoffwechselprodukts (A), zuführt; und
- (ii) die entnommene Teilmenge, gegebenenfalls nach vorheriger vollständiger oder teilweiser Abtrennung der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle, gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren Zuckerquelle, wie oben definiert, einer Fermentation zur Herstellung eines zweiten Stoffwechselprodukts (B), das mit dem Stoffwechselprodukt (A) identisch oder davon verschieden ist, zuführt.

[0141] Im Falle der Abtrennung der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile gemäß (ii) beträgt der Feststoffgehalt des verbleibenden Anteils des Flüssigmediums bevorzugt maximal 50 Gew.-%, bevorzugt maximal 30 Gew.-%, besonders bevorzugt maximal 10 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt maximal 5 Gew.-%. Insbesondere ist es in diesem Fall bevorzugt, die gesamten Feststoffe vor der Fermentation zur Herstellung des zweiten Stoffwechselprodukts (B) abzutrennen.

[0142] Diese Vorgehensweise ermöglicht es, in der separaten Fermentation gemäß (ii) Mikroorganismen einzusetzen, für die bestimmte Mindestanforderungen erfüllt sein müssen, z.B. bezüglich der Sauerstofftransfer-

rate. Für solche in der separaten Fermentation gemäß (ii) eingesetzten Mikroorganismen kommen z.B. *Bacillus species*, bevorzugt *Bacillus subtilis* in Betracht. Die durch derartige Mikroorganismen in der separaten Fermentation produzierten Verbindungen sind insbesondere unter Vitaminen, Cofaktoren und Nutrazeutika, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleosiden und Nukleotiden, Lipiden, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, aromatischen Verbindungen, Proteinen, Carotenoiden, speziell unter Vitaminen, Cofaktoren und Nutrazeutika, Proteinen und Carotenoiden und ganz speziell unter Riboflavin und Calciumpantothenat ausgewählt.

[0143] Eine bevorzugte Ausgestaltung dieser Vorgehensweise betrifft die parallel betriebene Herstellung gleicher Stoffwechselprodukte (A) und (B) in zwei separaten Fermentationen. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn für verschiedene Anwendungen des gleichen Stoffwechselprodukts unterschiedliche Anforderungen an die Reinheit zu stellen sind. Demnach wird das erste Stoffwechselprodukt (A), z.B. eine als Futtermitteladditiv zu verwendende Aminosäure, z.B. Lysin, Methionin, Threonin oder Glutamat, unter Einsatz der feststoffhaltigen Fermentationsbrühe und das gleiche zweite Stoffwechselprodukt (B), z.B. die gleiche als Nahrungsmitteladditiv zu verwendende Aminosäure unter Einsatz der gemäß (ii) feststoffabgereicherten Fermentationsbrühe hergestellt. Durch die vollständige oder teilweise Abtrennung der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile kann der Reinigungsaufwand bei der Aufarbeitung des Stoffwechselprodukts, dessen Anwendungsbereich eine höhere Reinheit erfordert, z.B. als Nahrungsmitteladditiv, reduziert werden.

[0144] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieser Vorgehensweise kann z.B. wie folgt vorgegangen werden. Man implementiert eine vorzugsweise großvolumige Fermentation zur Herstellung von Stoffwechselprodukten A, z.B. von Aminosäuren wie Lysin, Methionin, Glutamat oder Threonin, von Citronensäure oder von Ethanol, z.B. entsprechend den in der PCT/EP2005/005728 oder DE 10 2005 042 541.0 beschriebenen Verfahren oder entsprechend dem zur fermentativen Herstellung von Bioethanol bekannten Stand der Technik (s.o.). Gemäß (i) wird ein Teil des in Schritt a2) erhaltenen Flüssigmediums (1) oder dessen Mischung mit der weiteren Zuckerquelle entnommen. Der gemäß (i) entnommene Teil kann gemäß (ii) durch übliche Verfahren, z.B. Zentrifugation oder Filtration, vollständig oder teilweise von den Feststoffen befreit werden, je nach den Erfordernissen der Fermentation zur Herstellung von B. Das so gewonnene, gegebenenfalls vollständig oder teilweise von den Feststoffen befreite Flüssigmedium (1) wird gemäß (ii), gegebenenfalls zusammen mit einer weiteren Zuckerquelle, wie oben definiert, einer Fermentation zur Produktion eines Stoffwechselprodukts B zugeführt. Ein gemäß (ii) abgetrennter Feststoffstrom wird vorteilhafterweise zum Strom des zuckerhaltigen Flüssigmediums der großvolumigen Fermentation zurück gegeben.

[0145] Wenn das in der großvolumigen Fermentation hergestellte mikrobielle Stoffwechselprodukt (A) Ethanol ist, so erfolgt die Entnahme aus dem Flüssigmedium (1). Das Flüssigmedium (1) sollte dann Zuckergehalte aufweisen, wie sie bei der fermentativen Ethanol-Produktion (Bioethanol) üblich sind, z.B. im Bereich von 20 bis 30 Gew.-%. Üblicherweise führt man bei diesem Vorgehen die beim Schritt (i) Restmenge des zuckerhaltigen Flüssigmediums (1) der Fermentation zur Herstellung von A (d.h. hier Ethanol) zu. Zusammen mit der weiteren Zuckerquelle wird die in Schritt (i) entnommene Teilmenge des zuckerhaltigen Flüssigmediums (1), gegebenenfalls nach einer Abtrennung von Feststoffen gemäß Schritt (ii) der fermentativen Herstellung von B zugegeben.

[0146] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen Vorgehensweise handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt B um Riboflavin. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in der WO 01/011052, DE 198 40 709, WO 98/29539, EP 1186664 und Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44–48.

[0147] Zur Durchführung dieser Variante des Verfahrens implementiert man eine vorzugsweise großvolumige Fermentation zur Herstellung von Stoffwechselprodukten A, z.B. von Aminosäuren wie Lysin, Glutamat, Threonin oder Methionin, von Citronensäure oder von Ethanol, wie oben beschrieben. Gemäß (i) wird ein Teil des nach Schritt a2) erhaltenen, zuckerhaltigen Flüssigmediums (1) entnommen und gemäß (ii) durch übliche Verfahren, z.B. Zentrifugation oder Filtration, vollständig oder teilweise von den Feststoffen befreit. Das daraus gewonnene, im Wesentlichen vollständig oder teilweise von den Feststoffen befreite, zuckerhaltige Flüssigmedium wird nach Zugabe der weiteren Zuckerquelle gemäß (ii) einer Fermentation zur Produktion des Stoffwechselprodukts B, hier Riboflavin, zugeführt. Der in (ii) abgetrennte Feststoffstrom wird vorteilhafterweise zum Strom des zuckerhaltigen Flüssigmediums der großvolumigen Fermentation zurück gegeben.

[0148] Die auf diese Art und Weise gemäß (ii) erzeugte, Riboflavin-haltige Fermentationsbrühe kann nach analogen Bedingungen und Vorgehensweisen aufgearbeitet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen be-

schrieben wurden, z.B. in DE 40 374 41, EP 464582, EP 438767 und DE 38 197 45. Nach Lyse der Zellmasse erfolgt die Abtrennung des kristallin vorliegenden Riboflavins vorzugsweise durch Dekantieren. Andere Arten der Feststoffabtrennung, z.B. Filtration, sind ebenfalls möglich. Anschließend wird das Riboflavin getrocknet, bevorzugt mittels Sprüh- und Wirbelschichttrocknern. Alternativ dazu kann das gemäß (ii) erzeugte, Riboflavinhaltige Fermentationsgemisch nach analogen Bedingungen und Vorgehensweisen aufgearbeitet werden, wie z.B. in der EP 1048668 und EP 730034 beschrieben. Nach Pasteurisierung wird die Fermentationsbrühe hier zentrifugiert und die zurückbleibende feststoffhaltige Fraktion mit einer mineralischen Säure behandelt. Das gebildete Riboflavin wird aus dem wässrig-sauren Medium filtriert, gegebenenfalls gewaschen und anschließend getrocknet.

[0149] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieser Vorgehensweise handelt es sich bei dem in der Fermentation von den Mikroorganismen produzierten Stoffwechselprodukt B um Pantothensäure. Zur Durchführung der Fermentation können hier analoge Bedingungen und Vorgehensweisen angewendet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in der WO 01/021772.

[0150] Zur Durchführung dieser Variante des Verfahrens kann z.B. wie oben für Riboflavin beschrieben vorgegangen werden. Das gemäß (ii) vorgereinigte, vorzugsweise im Wesentlichen von den Feststoffen befreite, zuckerhaltige Flüssigmedium (1) oder dessen Mischung mit der weiteren Zuckerquelle wird einer Fermentation gemäß (ii) zur Produktion von Pantothensäure zugeführt. Dabei ist die im Vergleich zum feststoffhaltigen Flüssigmedium verringerte Viskosität besonders vorteilhaft. Der abgetrennte Feststoffstrom wird vorzugsweise zum Strom des zuckerhaltigen Flüssigmediums der großvolumigen Fermentation zurückgegeben.

[0151] Die gemäß (ii) erzeugte, Pantothensäure-haltige Fermentationsbrühe kann nach analogen Bedingungen und Vorgehensweisen aufgearbeitet werden, wie sie für andere Kohlenstoffquellen beschrieben wurden, z.B. in der EP 1050219 und WO 01/83799. Nach Pasteurisieren der gesamten Fermentationsbrühe werden die verbleibenden Feststoffe z.B. durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt. Der Klarlauf der Feststoffabtrennung wird teilweise eingedampft, gegebenenfalls mit Calciumchlorid versetzt und getrocknet, insbesondere sprühgetrocknet.

[0152] Die abgetrennten Feststoffe können im Rahmen des parallel betriebenen, großvolumigen Fermentationsverfahrens zusammen mit dem jeweiligen gewünschten mikrobiellen Stoffwechselprodukt (A) gewonnen werden.

[0153] Nach der Trocknung und/oder Formulierung bzw. Konfektionierung können der Produktformulierung bzw. Proteinzusammensetzung ganze oder gemahlene Getreidekörner, bevorzugt Mais, Weizen, Gerste, Hirse, Triticale und/oder Roggen zugegeben werden.

[0154] Die nachfolgenden Beispiele dienen der Veranschaulichung einzelner Aspekte der vorliegenden Erfindung, sie sind jedoch in keiner Weise als einschränkend zu verstehen.

Beispiele

1. Vermahlen der Stärkequelle

[0155] Die im folgenden eingesetzten Mahlgüter wurden wie folgt hergestellt. Ganze Maiskörner wurden unter Verwendung einer Rotormühle vollständig vermahlen. Unter Einsatz unterschiedlicher Schlägerwerke, Mahlbahnen bzw. Siebeinbauten wurden dabei drei verschiedene Feinheiten erzielt. Eine Siebanalyse des Mahlgutes mittels Labor-Vibrationssieb (Vibrations-Analysenmaschine: Retsch Vibrotronic Typ VE1; Siebzeit 5 min; Amplitude: 1,5 mm) ergab die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse.

Tabelle 1

Versuchsnummer	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
Mahlgutmenge gesamt	20 kg	11,45 kg	13,75 kg

II. Enzymatische Stärkeverflüssigung und -verzuckerung

II.1. Ohne Phytase im Verzuckerungsschritt

II.1a) Enzymatische Stärkeverflüssigung

[0156] Aus 320 g trocken vermahlenem Maismehl (T71/03) wurde unter stetem Rühren eine Suspension in 480 g Wasser angesetzt und mit 310 mg Calciumchlorid versetzt. Das Rühren wurde während der gesamten Versuchsdurchführung fortgesetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes mit H_2SO_4 auf 6,5 und Erhitzen auf 35°C wurden 2,4 g Termamyl 120L Typ L (Novozymes A/S) zugegeben. Über 40 min wurde das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur von 86,5°C erhitzt, wobei der pH gegebenenfalls mit NaOH auf den zuvor eingestellten Wert nachjustiert wurde. Innerhalb von 30 min wurden weitere 400 g des trocken vermahlenen Maismehls (T71/03) zugegeben, wobei die Temperatur auf 91°C erhöht wurde. Das Reaktionsgemisch wurde ca. 100 min bei dieser Temperatur gehalten. Anschließend wurden weitere 2,4 g Termamyl 120L zugegeben und die Temperatur ca. 100 min gehalten. Der Fortschritt der Verflüssigung wurde während der Durchführungsdauer mit der Jod-Stärke-Reaktion verfolgt. Die Temperatur wurde abschließend auf 100°C erhöht und das Reaktionsgemisch weitere 20 min gekocht. Zu diesem Zeitpunkt war keine Stärke mehr nachzuweisen. Der Reaktor wurde auf 35°C abgekühlt.

II.1 b) Verzuckerung

[0157] Die aus II.1a) erhaltene Reaktionsmischung wurde unter stetem Rühren auf 61°C erhitzt. Das Rühren wurde während der gesamten Versuchsdurchführung fortgesetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes mit H_2SO_4 auf 4,3 wurden 10,8 g (9,15 ml) Dextrozyme GA (Novozymes A/S) zugegeben. Die Temperatur wurde ca. 3 h gehalten, wobei der Fortschritt der Reaktion mit Glucoseteststäbchen (S-Glucotest von Boehringer) verfolgt wurde. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle 2 aufgeführt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 80°C erhitzt und danach abgekühlt. Es wurden ca. 1180 g flüssiges Produkt mit einer Dichte von ca. 1,2 kg/l und einem mittels Infrarottrockner bestimmten Gehalt an Trockenmasse von etwa 53,7 Gew.-% erhalten. Der Gehalt an Trockenmasse (ohne wasserlösliche Inhaltsstoffe) betrug nach Waschen mit Wasser etwa 14 Gew.-%. Der durch HPLC bestimmte Anteil an Glucose im Reaktionsgemisch betrug 380 g/l (vgl. Tab. 2, Probe Nr. 7).

Tabelle 2

Probe Nr.	min (ab Zugabe Glucoamylase)	Konz. Glucose im Überstand [g/l]
1	5	135
2	45	303
3	115	331
4	135	334
5	165	340
6	195	359
7	225	380

II.2. Mit Phytase im Verzuckerungsschritt

II.2a) Stärkeverflüssigung

[0158] Eine trocken vermahlene Maismehlprobe wird entsprechend II.1a) verflüssigt.

II.2b) Verzuckerung

[0159] Die aus II.2a) erhaltene Reaktionsmischung wird unter stetem Rühren auf 61°C erhitzt. Das Rühren wird während der gesamten Versuchsdurchführung fortgesetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes mit H₂SO₄ auf 4,3 werden 10,8 g (9,15 ml) Dextrozyme GA (Novozymes A/S) und 70 µl Phytase (700 Units Phytase, Natuphyt Liquid 10000L von der BASF Aktiengesellschaft) zugegeben. Die Temperatur wird ca. 3 h gehalten, wobei der Fortschritt der Reaktion mit Glucoseteststäbchen (S-Glucotest von Boehringer) verfolgt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 80°C erhitzt und danach abgekühlt. Das erhaltene Produkt wird mittels Infrarottrockner getrocknet und mit Wasser gewaschen. Der Anteil an Glucose im Reaktionsgemisch wird durch HPLC bestimmt.

II.3 Weitere Arbeitsvorschriften zur enzymatischen Stärkeverflüssigung und -verzuckerung

II.3a) Maismehl

[0160] 360 g deionisiertes Wasser werden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. 1,54 ml CaCl₂ Stammlösung (100 g CaCl₂ × 2H₂O/l) werden bis zu einer Endkonzentration von etwa 70 ppm Ca²⁺ in der Maische zugegeben. Unter stetem Rühren lässt man 240 g Maismehl langsam in das Wasser einrieseln. Nach Einstellung des pH auf 6,5 mit 50 Gew.-%iger wässriger NaOH-Lösung gibt man 4,0 ml (= 2 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Termamyl 120 L Typ L (Novozymes A/S) zu. Die Maische wird dann schnell auf bis zu 85°C erhitzt. Hierbei muss der pH fortwährend kontrolliert und gegebenenfalls angepasst werden.

[0161] Nach Erreichen der endgültigen Temperatur beginnt man die Zugabe von weiterem Mehl, zunächst von 50 g Mehl. Zusätzlich gibt man der Maische 0,13 ml CaCl₂ Stammlösung zu, um die Ca²⁺-Konzentration bei 70 ppm zu halten. Während der Zugabe hält man die Temperatur konstant bei 85°C. Man wartet mindestens 10 min ab, um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten, bevor man eine weitere Portion (50 g Mehl und 0,13 ml CaCl₂ Stammlösung) zugibt. Nach Zugabe von zwei Portionen gibt man 1,67 ml Termamyl zu; anschließend gibt man zwei weitere Portionen (jeweils 50 g Mehl und 0,13 ml CaCl₂ Stammlösung) zu. Es wird ein Gehalt an Trockenmasse von 55 Gew.-% erreicht. Nach der Zugabe erhöht man die Temperatur auf 100°C und kocht die Maische 10 min.

[0162] Man entnimmt eine Probe und kühlt diese auf Raumtemperatur. Nach Verdünnung der Probe mit deionisiertem Wasser (etwa 1:10) gibt man einen Tropfen konzentrierte Lugolsche Lösung (Mischung von 5 g I und 10 g KI pro Liter) zu. Eine tiefblaue Färbung zeigt einen Gehalt an verbleibender Stärke an; eine Braunfärbung tritt ein, wenn die Stärke vollständig hydrolysiert wurde. Wenn der Test einen Anteil verbleibender Stärke anzeigt, wird die Temperatur erneut auf 85°C erniedrigt und konstant gehalten. Man gibt weitere 1,67 ml Termamyl zu, bis die Iod-Stärke-Reaktion negativ ausfällt.

[0163] Die negativ auf Stärke getestete Mischung wird dann für die folgende Verzuckerungsreaktion auf 61°C gebracht. Der pH wird durch Zugabe von 50%iger Schwefelsäure auf 4.3 eingestellt. Im Verlauf der Reaktion wird der pH bei diesem Wert gehalten. Die Temperatur wird bei 61°C gehalten. 5,74 ml (= 1,5 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Dextrozym GA (Novozymes A/S) werden zugegeben, um die verflüssigte Stärke in Glucose umzuwandeln. Man lässt die Reaktion eine Stunde fortschreiten. Zur Inaktivierung des Enzyms erhitzt man die Mischung auf 85°C. Die heiße Mischung füllt man in sterile Behälter und lagert diese nach Abkühlung bei 4°C. Es wurde eine Endkonzentration an Glucose von 420 g/l erzielt.

II.3b) Roggenmehl (inklusive Cellulase/Hemicellulase-Vorbehandlung)

[0164] 360 g deionisiertes Wasser werden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter stetem Rühren lässt man 155 g Roggenmehl langsam in das Wasser einrieseln. Die Temperatur wird konstant bei 50°C gehalten. Nach Einstellung des pH auf 5,5 mit 50 Gew.-%iger wässriger NaOH-Lösung gibt man 3,21 ml (= 2,5 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Viscozyme L (Novozymes A/S) zu. Nach 30 min startet man die Zugabe von weiterem Mehl, zunächst gibt man 55 g Mehl zu. Nach weiteren 30 min gibt man erneut 50 g Mehl hinzu; 30 min später noch einmal 40 g Mehl. 30 min nach der letzten Zugabe kann mit der Verflüssigung begonnen werden.

[0165] 1,7 ml CaCl_2 Stammlösung (100 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O/l}$) werden zugegeben. Nach Einstellung des pH auf 6,5 mit 50 Gew.-%iger wässriger NaOH-Lösung gibt man 5,0 ml (= 2 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Termamyl 120 L Typ L (Novozymes A/S) zu. Die Maische wird dann schnell auf 85°C erhitzt. Hierbei wird der pH fortwährend kontrolliert und gegebenenfalls angepasst.

[0166] Nach Erreichen der endgültigen Temperatur beginnt man die Zugabe von weiterem Mehl, zunächst von 60 g Mehl. Zusätzlich gibt man der Maische 0,13 ml CaCl_2 Stammlösung zu, um die Ca^{2+} -Konzentration bei 70 ppm zu halten. Während der Zugabe hält man die Temperatur konstant bei 85°C. Man wartet mindestens 10 min ab, um eine vollständige Reaktion zu gewährleisten, bevor man eine weitere Portion (40 g Mehl und 0,1 ml CaCl_2 Stammlösung) zugibt. Man gibt 1,1 ml Termamyl zu; anschließend gibt man eine weitere Portion (40 g Mehl und 0,1 ml CaCl_2 Stammlösung) zu. Es wird ein Gehalt an Trockenmasse von 55 Gew.-% erreicht. Nach der Zugabe erhöht man die Temperatur auf 100°C und kocht die Maische 10 min.

[0167] Man entnimmt eine Probe und kühlt diese auf Raumtemperatur. Nach Verdünnung der Probe mit deionisiertem Wasser (etwa 1:10) gibt man einen Tropfen konzentrierte Lugolsche Lösung (Mischung von 5 g I und 10 g KI pro Liter) zu. Eine tiefblaue Färbung zeigt einen Gehalt an verbleibender Stärke an; eine Braunfärbung tritt ein, wenn die Stärke vollständig hydrolysiert wurde. Wenn der Test einen Anteil verbleibender Stärke anzeigt, wird die Temperatur erneut auf 85°C erniedrigt und konstant gehalten. Man gibt weitere 1,1 ml Termamyl zu, bis die Iod-Stärke-Reaktion negativ ausfällt.

[0168] Die negativ auf Stärke getestete Mischung wird dann für die folgende Verzuckerungsreaktion auf 61°C gebracht. Der pH wird durch Zugabe von 50%iger Schwefelsäure auf 4.3 eingestellt. Im Verlauf der Reaktion wird der pH bei diesem Wert gehalten. Die Temperatur wird bei 61°C gehalten. 5,74 ml (= 1.5 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Dextrozyme GA (Novozymes A/S) werden zugegeben, um die verflüssigte Stärke in Glucose umzuwandeln. Man lässt die Reaktion eine Stunde fortschreiten. Zur Inaktivierung des Enzyms erhitzt man die Mischung auf 85°C. Die heiße Mischung füllt man in sterile Behälter und lagert diese nach Abkühlung bei 4°C. Es wurde eine Endkonzentration an Glucose von 370 g/l erzielt.

II.3c) Weizenmehl (inklusive Xylanase-Vorbehandlung)

[0169] 360 g deionisiertes Wasser werden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Das Wasser wird auf 55°C erhitzt und der pH mit 50 Gew.-%iger wässriger NaOH-Lösung auf 6,0 eingestellt. Nach Einstellung von Temperatur und pH gibt man 3,21 ml (= 2,5 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Shearzyme 500L (Novozymes A/S) zu. Unter stetem Rühren lässt man 155 g Weizenmehl langsam in die Lösung einrieseln. Die Temperatur und der pH werden konstant gehalten. Nach 30 min startet man die Zugabe von weiterem Mehl, zunächst gibt man 55 g Mehl zu. Nach weiteren 30 min gibt man 50 g Mehl hinzu; 30 min später noch einmal 40 g Mehl. 30 min nach der letzten Zugabe kann mit der Verflüssigung begonnen werden.

[0170] Die Verflüssigung und Verzuckerung werden wie unter II.3b beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Endkonzentration an Glucose von 400 g/l erzielt.

III. Stamm ATCC13032 lysCfbr

[0171] In einigen der nachfolgenden Beispiele wurde ein modifizierter Stamm von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt, der unter der Bezeichnung ATCC13032 lysCfbr in der WO 05/059144 beschrieben wurde.

Beispiel 1

[0172] Je ein Mais-, Weizen-, und Roggenmehlhydrolysat wurde, wie unter 1) unten beschrieben, hergestellt. Der Gesamtzuckergehalt in jedem dieser Medien wurde mittels Zugabe verschiedener Zuckerlösungen (enthaltend Glucose, Rohrzucker, Melasse) erhöht. Die Medien wurden in Schüttelkolbenversuchen unter Verwendung von *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032 lysC^{fbr}) und *Bacillus* PA824 (genaue Beschreibung in der WO 02/061108) als Kohlenstoffquelle eingesetzt.

1) Herstellung des Mehlhydrolysats

a) Maismehlhydrolysat

[0173] 360 g deionisiertes Wasser wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter stetem Rühren ließ man 155 g Maismehl langsam in das Wasser einrieseln.

– Verflüssigung

[0174] Nach Einstellung des pH auf 5,8 mit 50 Gew.-%iger wässriger NaOH-Lösung gab man 2,6 ml (= 2 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Liquozyme SC (von Novozymes A/S) zu. Die Maische wurde dann schnell auf 100°C erhitzt und 10 Minuten gekocht. Hierbei wurde der pH fortwährend kontrolliert und gegebenenfalls angepasst.

[0175] Man entnahm eine Probe und kühlte diese auf Raumtemperatur. Nach Verdünnung der Probe mit deionisiertem Wasser (etwa 1:10) gab man einen Tropfen konzentrierte Lugolsche Lösung (Mischung von 5 g I und 10 g KI pro Liter) zu. Eine tiefblaue Färbung zeigt hierbei einen Gehalt an verbleibender Stärke an; eine Braunfärbung tritt ein, wenn die Stärke vollständig hydrolysiert wurde.

– Verzuckerung

[0176] Die negativ auf Stärke getestete Mischung wurde dann für die folgende Verzuckerungsreaktion auf 61°C gebracht. Der pH wurde durch Zugabe von 50%iger Schwefelsäure auf 4,3 eingestellt. Im Verlauf der Reaktion wurde der pH bei diesem Wert gehalten. Die Temperatur wurde bei 61°C gehalten. 2,0 ml (= 1.5 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Dextrozym GA (von Novozymes A/S) wurden zugegeben, um die verflüssigte Stärke in Glucose umzuwandeln. Man ließ die Reaktion eine Stunde fortschreiten. Zur Inaktivierung des Enzyms erhitzte man die Mischung auf 85°C. Die heiße Mischung füllte man in sterile Behälter und lagerte diese nach Abkühlung bei 4°C.

b) Weizenmehlhydrolysat

– Xylanasevorbehandlung

[0177] 360 g deionisiertes Wasser wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Das Wasser wurde auf 55°C erhitzt und der pH mit 50 Gew.-%iger wässriger NaOH-Lösung auf 6,0 eingestellt. Nach Einstellung von Temperatur und pH gab man 3,21 ml (= 2,5 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Shearyme 500L (von Novozymes A/S) zu. Unter stetem Rühren ließ man 155 g Weizenmehl langsam in die Lösung einrieseln. Die Temperatur und der pH wurden konstant gehalten. Nach 30 min konnte mit der Verflüssigung begonnen werden.

[0178] Die Verflüssigung und Verzuckerung wurden wie unter 1a) beschrieben durchgeführt.

c) Roggenmehlhydrolysat

Cellulase-/Hemicellulasevorbehandlung

[0179] 360 g deionisiertes Wasser wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter stetem Rühren ließ man 155 g Roggenmehl langsam in das Wasser einrieseln. Die Temperatur wurde konstant bei 50°C gehalten. Nach Einstellung des pH auf 5,5 mit 50%iger Schwefelsäure gab man 3,21 ml (= 2,5 Gew.-% Enzym/Trockenmasse) Viscozyme L (von Novozymes A/S) zu. Nach 30 min konnte mit der Verflüssigung begonnen werden.

[0180] Die Verflüssigung und Verzuckerung wurden wie unter 1a) beschrieben durchgeführt.

2) Herstellung des Inokulums

a) für *Corynebacterium glutamicum*

[0181] Die Zellen wurden nach dem Ausstreichen auf sterilem CM+CaAc-Agar (Zusammensetzung: siehe Tabelle 1; 20 min bei 121°C) über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von den Platten abgekratzt und in Saline resuspendiert. 25 ml des Mediums (siehe Tabelle 4) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen wurden jeweils mit einer solchen Menge der so hergestellten Zellsuspension angeimpft, dass die optische Dichte einen Wert von OD₆₁₀ = 0,5 bei 610 nm erreichte.

Tabelle 1: Zusammensetzung der CM+CaAc-Agarplatten

Konzentration	Inhaltsstoff
10,0 g/l	D-Glucose
2,5 g/l	NaCl
2,0 g/l	Harnstoff
5,0 g/l	Bacto Pepton (Difco)
5,0 g/l	Hefeextrakt (Difco)
5,0 g/l	Beef Extract (Difco)
20,0 g/l	Casaminoacids
20,0 g/l	Agar

b) für Bacillus

[0182] 42 ml des Vorkulturmediums (siehe Tabelle 2) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen wurden jeweils mit 0,4 ml einer Gefrierkultur angeimpft und 24 h bei 43°C unter Bewegen (250 Upm) in einem befeuchteten Schüttelschrank inkubiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Vorkulturmediums

Inhaltsstoff	Konzentration
Maltose	28,6 g/l
Sojamehl	19,0 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,6 g/l
Mononatriumglutamat	4,8 g/l
Natriumcitrat	0,95 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	9,5 mg/l
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	1,9 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,4 mg/l
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	1,9 mg/l

Inhaltsstoff	Konzentration
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,7 mg/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$	15,2 g/l
KH_2PO_4	3,9 g/l
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,9 g/l
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,09 g/l
MOPS	59,8 g/l
pH*	7,2

* mit verdünnter wässriger KOH-Lösung einzustellen

[0183] 42 ml des Hauptkulturmediums (siehe Tabelle 6) in 250 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen wurden jeweils mit 1 ml Vorkultur angeimpft

3) Herstellung der Fermentationsbrühe

a) für *Corynebacterium glutamicum*

[0184] Die Zusammensetzung des Kolbenmediums ist in Tabelle 4 aufgeführt. Es sollte eine Anfangszuckerkonzentration von 60 g/l vorliegen. Dabei stammte die Hälfte des Zuckers aus dem Hydrolysat (Fermentationsmedium (1)), die andere Hälfte wurde als Zuckerlösung zugesetzt. Hierzu wurde eine Mischung aus Hydrolysat und Zuckerlösung hergestellt und dem Kolbenmedium zugegeben. Im Kontrollmedium wurde eine entsprechende Menge Glucoselösung verwendet.

– Herstellung der Mehlhydrolysate mit Zuckerzusatz

[0185] Es wurden folgende Lösungen angesetzt (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Ansatz Mehlhydrolysate mit Zuckerzusatz

Mehlhydrolysat	Glucosekonzentration im Hydrolysat [g/l]	Hydrolysat pro Liter Ansatz [ml]	Zuckerlsg.	Konzentration in der Zuckerlsg. [g/l]	Zuckerlsg. pro Liter Ansatz [ml]
Mais 30%	250,0	240	Glucose	626	96
Mais 30%	250,0	240	Rohzucker	639	94
Weizen 30%	258,9	232	Glucose	626	96
Weizen 30%	258,9	232	Rohzucker	639	94
Roggen 30%	217,9	275	Glucose	626	96
Roggen 30%	217,9	275	Rohzucker		94

Tabelle 4: Kolbenmedium

Mehlhydrolysat mit Zuckerlösung	500 ml/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/l
Urea	5 g/l
KH_2PO_4	0,113 g/l
K_2HPO_4	0,138 g/l
ACES	52 g/l
MOPS	21 g/l
Citronensäure x H_2O	0,49 g/l
3,4-Dihydroxybenzoesäure	3,08 mg/l
NaCl	2,5 g/l
KCl	1 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	25 mg/l
$\text{MnSO}_4 \times 4 - 6 \text{H}_2\text{O}$	5 mg/l
ZnCl_2	10 mg/l
CaCl_2	20 mg/l
H_3BO_3	150 $\mu\text{g/l}$
$\text{CoCl} \times 6 \text{H}_2\text{O}$	100 $\mu\text{g/l}$
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	100 $\mu\text{g/l}$
$\text{NiSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	100 $\mu\text{g/l}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	25 $\mu\text{g/l}$
Biotin (Vit. H)	1050 $\mu\text{g/l}$
Thiamin x HCl (Vit B ₁)	2100 $\mu\text{g/l}$
Nicotinamid	2,5 mg/l
Pantothensäure	125 mg/l
Cyanocobalamin (Vit B ₁₂)	1 $\mu\text{g/l}$
4-Aminobenzoesäure (PABA; Vit. H ₁)	600 $\mu\text{g/l}$
Folsäure	1,1 $\mu\text{g/l}$
Pyridoxin (Vit. B ₆)	30 $\mu\text{g/l}$
Riboflavin (Vit. B ₂)	90 $\mu\text{g/l}$
CSL	40 ml/l
pH*	6,85

* mit verdünnter wässriger NaOH-Lösung einzustellen

[0186] Nach dem Animpfen wurden die Kolben drei Tage bei 30°C und unter Bewegen (200 Upm) in einem befeuchteten Schüttelschrank inkubiert. Nach dem Abbruch der Fermentation wurde der Gehalt an Lysin per HPLC bestimmt. Die HPLC-Analysen wurden mit Geräten der 1100 Series LC von Agilent durchgeführt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer Agilent 1100 Series LC System HPLC. Eine Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Pthalaldehyd erlaubt die Quantifizierung der gebildeten Aminosäuren, die Auftrennung des Aminosäuregemisches findet auf einer Hypersil AA-Säule (Agilent) statt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Mittelwerte

Mehlhydrolysat	Zuckerlsg.	Lysin [g/l]	Ausbeute*
Mais	Glucose	12,50	0,21
	Rohzucker	10,64	0,19
	Melasse	10,06	0,18
Weizen	Glucose	10,82	0,18
	Rohzucker	10,14	0,18
	Melasse	9,67	0,17
Roggen	Glucose	10,89	0,18
	Rohzucker	9,59	0,16
	Melasse	9,67	0,16
Kontrolle		11,54	0,20

b) für Bacillus

[0187] Die Zusammensetzung des Kolbenmediums ist in Tabelle 6 aufgeführt. Es sollte eine Anfangsglucosekonzentration von 28,6 g/l vorliegen. Dabei stammte die Hälfte des Zuckers aus dem Hydrolysat, die andere Hälfte wurde als Glucoselösung zugesetzt. Im Kontrollmedium wurde eine entsprechende Menge Glucoselösung verwendet.

Tabelle 6: Kolbenmedien

Mais	250 g/l †	57 ml/l ‡	
Weizen	259 g/l †		55 ml/l ‡
Roggen	218 g/l †		67 ml/l ‡
Glucoselösung (c=626 g/l)			23 ml/l
Sojamehl			19,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄			7,6 g/l
Mononatriumglutamat			4,8 g/l
Natriumcitrat			0,95 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O			9,5 mg/l
MnCl ₂ x 4 H ₂ O			1,9 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O			1,4 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O			1,9 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O			0,2 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O			0,7 mg/l
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O			15,2 g/l
KH ₂ PO ₄			3,9 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O			0,9 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O			0,09 g/l
MOPS			59,8 g/l
pH*			7,2

* mit verdünnter wässriger NaOH-Lösung einzustellen

† Glucosekonzentration im Hydrolysat

‡ benötigte Einwaage an Hydrolysat pro Liter Medium

[0188] Nach dem Animpfen wurden die Kolben 24 h bei 43°C und unter Bewegen (250 Upm) in einem be-

feuchteten Schüttelschrank inkubiert. Nach dem Abbruch der Fermentation wurde der Gehalt an Glucose und Pantothersäure per HPLC bestimmt. Die Glucosebestimmung erfolgte mit Hilfe einer Aminex HPX-87H Säule von Bio-Rad. Die Bestimmung der Pantothersäurekonzentration erfolgte über die Auftrennung auf einer Aqua C18-Säule (Phenomenex).

[0189] Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Mittelwerte nach 24 h

	Pantothersäure, t=24h [g/l]	Ausbeute [g Pantothersäure / g Glucose]
Mais	2,7	0,09
Weizen	2,4	0,08
Roggen	2,7	0,09
Kontrolle	2,7	0,09

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung wenigstens einer organischen Verbindung mit mindestens 3 C-Atomen oder mit mindestens 2 C-Atomen und mindestens 1 N-Atom durch Fermentation, umfassend die folgenden Schritte:
a1) Vermahlen einer Stärkequelle unter Erhalt eines Mahlguts, das wenigstens einen Teil der nicht-stärkehaltigen festen Bestandteile der Stärkequelle enthält;

a2) Suspendieren des Mahlguts in einer wässrigen Flüssigkeit und Hydrolyse des Stärkeanteils im Mahlgut durch enzymatisches Verflüssigen und gegebenenfalls anschließendes Verzuckern, wobei man ein erstes, Mono- oder Oligosaccharide enthaltendes Flüssigmedium (1) erhält; und

b) Zugabe des Flüssigmediums (1) zusammen mit verstoffwechselbaren Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden oder einer Zusammensetzung, die verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthält und die im wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen, zu einem Fermentationsmedium, das einen Mikroorganismus enthält, welcher zur Überproduktion der organischen Verbindung befähigt ist, unter Fermentationsbedingungen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Gesamtkonzentration an Mono-, Di- und Oligosacchariden des in Schritt a2) erhaltenen Flüssigmediums (1) im Bereich von 100 bis 400 g/kg liegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die durch Zugabe des Flüssigmediums (1) in die Fermentation eingebrachte Menge an Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden, 40 bis 95 Gew.-% der Gesamtmenge der in die Fermentation eingebrachte an Mono-, Di- und Oligosacchariden ausmacht.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man die Gesamtkonzentration an Mono-, Di- und Oligosacchariden in dem ersten Flüssigmedium (1) durch Zugabe von verstoffwechselbaren Mono-, Di- und/oder Oligosacchariden oder durch Zugabe von einem Medium, das verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide in einer Konzentration von wenigstens 50 Gew.-% enthält und das im wesentlichen frei ist von in Wasser unlöslichen Feststoffen, um wenigstens 50 g/kg erhöht.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei man die Gesamtkonzentration an Mono-, Di- und Oligosacchariden im Flüssigmedium auf einen Wert im Bereich von 450 bis 600 g/kg erhöht.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man als Medium, das verstoffwechselbare Mono- oder Oligosaccharide enthält, ein Glukose und/oder Saccharose und gegebenenfalls Dextrine enthaltendes Nebenprodukt der Zuckerherstellung einsetzt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei man als Medium, das verstoffwechselbare Mono-, Di- und/oder Oligosaccharide enthält, Melasse der Rübenzuckerherstellung einsetzt.

8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei man in Schritt a1) als Stärkequelle Getreidekörner verwendet.

9. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei man in Schritt a2) mindestens eine Teilmenge des aus Schritt a1) erhaltenen Mahlguts durch kontinuierliche oder diskontinuierliche Zugabe zur wässrigen

Flüssigkeit unter Hydrolysebedingungen hydrolysiert.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei man in Schritt a2) die Suspension des Mahlguts durch Einbringen von Wasserdampf in die Suspension auf Temperaturen oberhalb der Verkleisterungstemperatur der im Mahlgut enthaltenen Stärke erhitzt.

11. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die hergestellte organische Verbindung unter gegebenenfalls Hydroxylgruppen tragenden Mono-, Di- und Tricarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen, proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Purinbasen, Pyrimidinbasen; Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden; gesättigten und ungesättigten Fettsäuren; Diolen mit 4 bis 10 C-Atomen, höherwertigen Alkoholen mit 3 oder mehr Hydroxylgruppen, längerkettigen Alkoholen mit wenigstens 4 C-Atomen, Kohlenhydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Provitaminen, Cofaktoren, Nutrazeutika, Proteinen, Carotenoiden, Ketonen mit 3 bis 10 C-Atomen, Lactonen, Biopolymeren und Cyclodextrinen ausgewählt ist.

12. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der zur Fermentation eingesetzte Mikroorganismus ausgewählt ist unter natürlichen oder rekombinanten Mikroorganismen, die wenigstens eines der folgenden Stoffwechselprodukte überproduzieren: Enzyme, Aminosäuren, Vitamine, Disaccharide, aliphatische Mono- und Dicarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen, aliphatische Hydroxycarbonsäuren mit 3 bis 10 C-Atomen, Ketone mit 3 bis 10 C-Atomen, Alkanole mit 4 bis 10 C-Atomen, Alkandiole mit 3 bis 8 C-Atomen und Polyhydroxyalkanoate.

13. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die Mikroorganismen ausgewählt sind unter den Gattungen *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Clostridium* und *Rhizopus*,.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei der zur Fermentation eingesetzte Mikroorganismus ausgewählt ist unter natürlichen oder rekombinanten Mikroorganismen, die Aminosäuren überproduzieren.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei der Mikroorganismus ein Stamm der Gattung *Corynebacterium* ist.

16. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei der zur Fermentation eingesetzte Mikroorganismus ausgewählt ist unter natürlichen oder rekombinanten Mikroorganismen, die ein Enzym überproduzieren.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der Mikroorganismus ausgewählt ist unter Phytase überproduzierenden Mikroorganismen.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man die organische Verbindung aus der Fermentationsbrühe abreichert oder isoliert und anschließend die flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend entfernt, wobei man eine feste oder halbfeste Proteinzusammensetzung erhält.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei man die flüchtigen Bestandteile der Fermentationsbrühe ohne vorherige Isolierung oder Abreicherung eines nichtflüchtigen mikrobiellen Stoffwechselprodukts, und gegebenenfalls ohne vorherige Abtrennung fester Bestandteile, mindestens teilweise entfernt, wobei man eine feste Formulierung eines nichtflüchtigen mikrobiellen Stoffwechselprodukts erhält.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen