



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

(21) **PI 0619022-7 A2**

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



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

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

(30) **Prioridade Unionista:** 28/11/2005 DE 10 2005 056 669.3

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

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

(74) **Procurador(es):** MOMSEN, LEONARDOS & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006068927 de 27/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/060234de 31/05/2007

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE PELO MENOS UM COMPOSTO ORGÂNICO. A invenção refere-se a um método para produzir por fermentação pelo menos um composto orgânico contendo pelo menos 3 átomos de C ou pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N. O citado método compreende as etapas de a1) uma carga de alimentação de amido é moída com o objetivo de obter um material de moagem que contém pelo menos uma parte de componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido, 2a) material de moagem é suspenso em um líquido aquoso e o citado material de moagem contido no líquido aquoso é liquefeito na presença de pelo menos uma enzima que liquefaz amido, uma substância aquosa que contém dextrina (1), que contém pelo menos uma parte dos componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido, é obtida; e b) a substância aquosa que contém dextrina (1) é usada na fermentação para cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir os compostos orgânicos; enzimas, que hidrolisam a dextrina a monossacarídeos, são não adicionadas ou são adicionadas em uma quantidade menor do que 0,001% em peso, em relação ao peso total da carga de alimentação de amido usada.



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

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

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

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

Baseado nas cargas de alimentação acima mencionadas, vários métodos e procedimentos para a produção fermentativa, baseada em açúcar, de metabólitos microbianos estão estabelecidos. Tomando L-lisina como um



exemplo, estes são descritos por exemplo por Pfefferle et al. (loc. cit.) com relação ao desenvolvimento de cepa, desenvolvimento de processo e produção industrial.

5 Uma carga de alimentação de carbono importante para a produção fermentativa mediada por microorganismo de metabólitos microbianos é amido. O último tem que ser primeiro liquefeito e sacarificado nas etapas de reação precedente antes de ele poder ser explorado como carga de alimentação de carbono em uma fermentação. Para este fim, o amido é normalmente obtido na forma pré-purificada de uma carga de alimentação de amido natural tal como batatas, mandioca, cereais, por exemplo trigo, milho, 10 cevada, centeio, tritcale ou arroz, e subsequente e enzimaticamente liquefeito e sacarificado, depois é empregado na fermentação real para produzir os metabólitos desejados.

15 Em adição ao uso de tais cargas de alimentação de amido pré-purificadas, o uso de cargas de alimentação de amido não-pré-tratadas para a preparação de cargas de alimentação de carbono para a produção fermentativa de metabólitos microbianos também tem sido descrito. Tipicamente, as cargas de alimentação de amido são inicialmente cominuídas por moagem. A massa moída base é então submetida à liquefação e à sacarificação. Visto que esta 20 massa moída base naturalmente compreende, além de amido, uma série de constituintes de não-amido que podem afetar adversamente a fermentação, estes constituintes são normalmente removidos antes da fermentação. A remoção pode ser efetuada quer diretamente após a moagem (WO 02/077252; JP 2001-072701; JP 56-169594; CN 1218111), após a liquefação (WO 02/077252; CN 1173541) quer subsequente e à sacarificação (CN 1266102; Beukema et al.: "Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potato saccharification to give culture medium" (Conference Abstract), Symp. Biotechnol. Res. Neth. (1983), 6; NL8302229). 25 Contudo, todas as variantes envolvem o uso de um hidrolisado de amido



substancialmente puro na fermentação.

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

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

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

microorganismos empregados (cf., neste contexto, Mersmann, A. et al.: "Selection and Design of Aerobic Bioreactors", Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357-370), mas também pode complicar consideravelmente o processamento subsequente.

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

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



Por outro lado, concentrações mais altas de monossacarídeos metabolizáveis no meio de fermentação podem resultar em inibição da fermentação ou do crescimento do microorganismo, ou acarretar mudanças metabólicas dos microorganismos empregados. em *E. coli*, por exemplo, uma

5 concentração indevidamente alta de glicose livre resulta na formação de ácidos orgânicos (acetato), enquanto que *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, muda para fermentação em um tal caso, embora oxigênio suficiente esteja presente em fermentadores aerados (efeito de Crabtree). Concentrações mais altas de monossacarídeos metabolizáveis nos meios contendo açúcar

10 alimentados à fermentação podem portanto ter um efeito vantajoso sobre a fermentação durante a fase de alimentação. O uso de o uso de meios concentrados mais altos na fase de batelada, i.e. durante a fase de crescimento dos microorganismos na batelada de fermentação, antes de outros açúcares serem alimentados na fermentação pela corrente de alimentação, também é

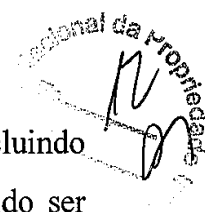
15 problemático visto que muitas cepas requerem concentrações de glicose de abaixo de 6% em peso para o seu crescimento.

Devido a estas dificuldades e limitações, métodos de moagem seca como têm sido empregados amplamente para a produção de bioetanol têm até agora permanecido sem importância econômica particular na

20 produção fermentativa de metabólitos microbianos diferentes de etanol.

Até hoje, tentativas para aplicar o conceito de moagem seca e as vantagens que existem em princípio em conexão com este método, na produção em escala industrial de metabólitos microbianos têm sido apenas descritas usando mandioca como carga de alimentação de amido. Assim, JP

25 2001/275693 descreve um método para a produção fermentativa de aminoácidos no qual tubérculos de mandioca descascados que têm sido moídos no estado seco são empregados como carga de alimentação de amido. É necessário, com o objetivo de realizar o processo, ajustar o tamanho de partícula da massa moída base para $\leq 150 \mu\text{m}$. Na etapa de filtração que é

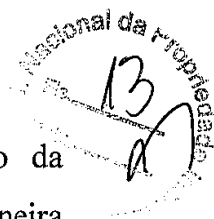


empregada para este propósito, parte da massa moída base usada, incluindo constituintes contendo não-amido, é removida antes de o amido obtido ser liquefeito/sacarificado e subseqüentemente fermentado. Neste processo, concentrações de açúcar moderadas são obtidas. Um processo similar é descrito JP 2001/309751 para a produção de um aditivo de alimento contendo aminoácido.

Concentrações de açúcar aumentadas no meio líquido empregado para a fermentação podem ser alcançadas pelo uso de uma massa moída base, para a sacarificação, que largamente compreende o constituinte sólido não-amiláceos da carga de alimentação de amido, pelo processo descrito em WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) da companhia requerente. Surpreendentemente, tem emergido que os constituintes sólidos não-amiláceos que estão presentes na carga de alimentação de amido não necessitam ser removidos antes da fermentação. O processo descrito pode ser realizado durante a sacarificação in-situ da carga de alimentação de amido liquefeita. Um processo similar usando carga de alimentação de amido selecionada dentre grãos de cereais é descrito em PCT/EP2006/066057 (o pedido de patente inicial DE 102005042541,0) da companhia requerente.

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

Surpreendentemente, temos verificado que um processo



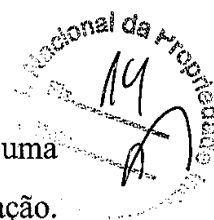
fermentativo para a produção de compostos orgânicos a despeito da introdução inerentemente alta de sólidos pode ser realizado em uma maneira efetiva pela preparação de um meio contendo dextrina (1) por moagem e liquefação da carga de alimentação de amido sem previamente remover todos os constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido e empregando este meio contendo dextrina em uma fermentação sem a adição de enzimas de sacarificação.

A invenção assim refere-se a um processo para a produção de pelo menos um composto orgânico possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N por meio de fermentação, compreendendo as seguintes etapas de:

- a1) moer uma carga de alimentação de amido, assim obtendo uma massa moída base que compreende pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido;
- a2) suspender a massa moída base em um líquido aquoso e liquefazer a massa moída base presente no líquido aquoso na presença de pelo menos uma enzima liquefatora de amido, obtendo um meio aquoso contendo dextrina (1) que compreende pelo menos a dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido; e
- b) usar o meio aquoso contendo dextrina (1) em uma fermentação para cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico;

enzimas que hidrolisam as dextrinas a monossacarídeos sendo adicionadas em uma quantidade de menor do que 0,001% em peso baseado no peso total da carga de alimentação de amido empregada, ou não são adicionadas.

A despeito dos constituintes sólidos, não-amiláceos da carga de alimentação de amido empregada no meio contendo dextrina (1), o



processo fermentativo de acordo com a invenção pode ser realizado em uma maneira eficiente sem requerer a adição de enzimas de sacarificação.

Contudo, quantidades pequenas que não são suficientes para realizar uma sacarificação completa, tipicamente menores do que 0,001% em peso, em particular menores do que 0,0005% em peso, baseado no peso total da carga de alimentação de amido empregada, podem ser adicionadas.

Como um resultado do uso de dextrinas para cultivar os microorganismos, uma concentração alta de açúcares metabolizáveis no meio de fermentação, tanto em fase de batelada quando em fase de alimentação, pode ser estabelecida sem isto resultar em reações secundárias indesejáveis, de modo que a diluição indesejável do licor de fermentação é evitada. Além disso, problemas de viscosidade que podem ocorrer durante a liquefação da carga de alimentação de amido em concentrações mais altas de massa moída base são evitados largamente pelo processo de acordo com a invenção.

Aqui e aqui abaixo, os termos "meio contendo dextrina" e "líquido contendo dextrina" são usados sinonimamente. O trabalhador experiente reconhecerá que o microorganismo empregado na fermentação tem que ser capaz de metabolizar as dextrinas presentes no meio aquoso contendo dextrina sem ser necessário que as primeiras sejam hidrolisadas para di- e/ou monossacarídeos pela adição externa de enzimas de sacarificação. as dextrinas são metabolizadas pelo microorganismo, provavelmente após tendo sido hidrolisadas pelas enzimas de sacarificação que são inerentes à cepa, por exemplo glicoamilases que são inerentes à cepa. um aspecto particularmente vantajoso do processo de acordo com a invenção é no último caso que a taxa de sacarificação durante a fermentação, em particular a liberação de glicose, é adaptada automaticamente ao requerimento dos microorganismos, primeiramente pela quantidade de biomassa e secundariamente pelo nível de expressão das enzimas de sacarificação que são inerentes à cepa.

Aqui e aqui abaixo, o termo "liquefação" significa a



degradação hidrolítica de amido em oligossacarídeos, em particular dextrinas.

Aqui e aqui abaixo, os termos “sacarificação” ou “para sacarificar” significam a hidrólise de dextrinas a monossacarídeos, em particular ta monossacarídeos tal como glicose. Conseqüentemente, uma

5 “enzima de sacarificação” é entendida com o significado de uma enzima que hidrolisa dextrinas a monossacarídeos.

Aqui e aqui abaixo, o termo “dextrina” é entendido com o significado de oligossacarídeos que são obtidos como um resultado da degradação hidrolítica de amido e que, como uma regra, consistem de 3 a 18,

10 em particular 6 a 12, unidades de monossacarídeo, em particular de unidades de glicose.

Os termos “teor de equivalentes de glicose” e “concentração de açúcar” referem-se à concentração total de mono-, di- e oligossacarídeos no meio que está potencialmente disponível para uma fermentação. O termo

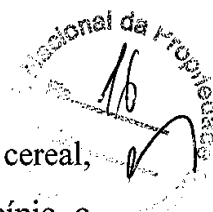
15 “equivalentes de glicose” também compreende as unidades de açúcar ou açúcares metabolizáveis que são diferentes de glicose.

Aqui e aqui abaixo, os termos “superproduzir” ou “superprodução” são usados quando se referem a um microorganismo para caracterizar a característica do último de produzir um ou mais de seus metabólitos em uma quantidade que ultrapassa a quantidade requerida para a multiplicação do microorganismo, resultando no acúmulo no meio de fermentação, cujo acúmulo ocorre em um modo intracelular ou extracelular.

20

Adequados como carga de alimentação de amido para o processo de acordo com a invenção são, principalmente, sementes ou cereais secos onde o amido totaliza pelo menos 40% em peso e preferivelmente pelo menos 50% em peso no estado sólido. São encontrados em muitas plantas de cereal que são correntemente crescidas em grande escala, tais como milho, trigo, aveia, cevada, centeio, tritcale, arroz, e em beterraba, batatas, mandioca e várias espécies de sorgo e de painço, por exemplo sorgo e milo. A carga de

25



alimentação de amido é preferivelmente selecionada dentre cereal, especialmente dentre milho, centeio, triticale e grãos de trigo. Em princípio, o processo de acordo com a invenção também pode ser realizado com cargas de alimentação de amido similares tais como, por exemplo, uma mistura de

5 várias sementes ou cereais contendo amido.

Para preparar o líquido contendo dextrina a carga de alimentação de amido em questão é moída em etapa a1), com ou sem a adição de líquido, por exemplo água, preferivelmente sem a adição de líquido. Também é possível combinar moagem seca com uma subsequente etapa de moagem.

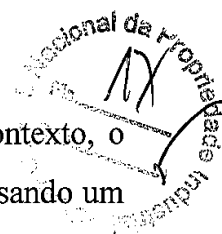
10

Aparelhagens que são tipicamente empregadas para moagem seca são moinhos de martelo, moinhos de rotor ou moinhos de rolo; aquelas que são adequadas para moagem úmida são misturadores de pá, moinhos de bola agitados, moinhos de circulação, moinhos de disco, moinhos de câmara

15 anular, moinhos oscilatórios ou moinhos planetários. Em princípio, outros moinhos são também adequados. A quantidade de líquido requerida para moagem úmida pode ser determinada pelo trabalhador experiente em experimentos de rotina. É normalmente ajustada em uma tal maneira que o teor de matéria seca está dentro da faixa de 10 a 20% em peso.

A moagem acarreta um tamanho de partícula que é adequado para as etapas de processo subsequentes. Neste contexto, tem se provado vantajoso quando a massa moída base obtida na etapa de moagem, em particular a etapa de moagem seca, em etapa a1) possui partículas de farinha, i.e. constituintes particulados, com um tamanho de partícula dentro da faixa

20 de 100 a 630 μm em uma quantidade de 30 a 100% em peso, preferivelmente 40 a 95% em peso e especialmente preferivelmente 50 a 90% em peso. Preferivelmente, a massa moída base obtida compreende 50% em peso de partículas de farinha com um tamanho de partícula de maior do que 100 μm . Como uma regra, pelo menos 95% em peso de partículas de farinha moídas



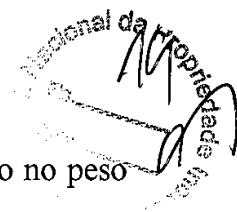
possuem um tamanho de partícula menor do que 2 mm. Neste contexto, o tamanho de partícula é medido por meio de análise de peneiração usando um analisador de vibração. Em princípio, um tamanho de partícula pequeno é vantajoso para obter um rendimento de produto alto. Contudo, um tamanho de partícula indevidamente pequeno pode resultar em problemas, em particular problemas devido à aglomeração/formação de grumos, quando a massa moída base é transformada em massa fluida durante liquefação ou processamento, por exemplo durante secagem dos sólidos após a etapa de fermentação.

Normalmente, farinhas são caracterizadas pela taxa de extração ou pelo grau de farinha, cuja correlação de um com o outro é tal que a característica do grau de farinha aumenta com o aumento da taxa de extração. A taxa de extração corresponde à quantidade em peso de farinha obtida baseada em 100 partes em peso de massa moída base empregada. Embora, durante o processo de moagem, farinha ultra-fina, pura, por exemplo do interior do grão de cereal, é inicialmente obtida, com moagem adicional, i.e. com o aumento da taxa de extração, a quantidade de teor de casca e fibra bruta na farinha aumenta e o teor de amido diminui. A taxa de extração é portanto também refletida no que é conhecido como o grau de farinha, que é usado como um número para classificar farinhas, em particular farinhas de cereais, e que é baseado no teor de cinza da farinha (conhecido como escala de cinza). O grau de farinha ou o número de tipo indica a quantidade de cinza (minerais) em mg que é deixada para trás quando 100 g de sólidos de farinha são incinerados. No caso de farinhas de cereais, um número de tipo mais alto significa uma taxa de extração maior porque o núcleo do grão de cereal compreende aproximadamente 0,4% em peso de cinza, enquanto que a casca compreende aproximadamente 5% em peso de cinza. No caso de uma taxa de extração menor, as farinhas de cereais portanto consistem predominantemente do endosperma cominuído, i.e. o teor de amido dos grãos de cereais; no caso de uma taxa de extração maior, as farinhas de cereais também compreendem a

camada de aleurona contendo proteína, cominuída dos grãos; no caso de farinha grossa, também compreendem os constituintes do embrião contendo gordura e contendo proteína e das cascas de sementes, que compreendem fibra bruta e cinza. Para os propósitos da invenção, farinhas com uma taxa de
5 extração alta, ou um número de tipo alto, são preferidas em princípio. Se cereal é empregado como carga de alimentação de amido, é preferido que os grãos intactos junto com suas cascas são moídas e adicionalmente processadas, se apropriado após antes da remoção mecânica antecipada do embrião e das cascas.

10 De acordo com a invenção, a massa moída base usada compreende pelo menos algum, preferivelmente pelo menos 20% em peso, em particular pelo menos 50% em peso, especificamente pelo menos 90% em peso e muito especificamente pelo menos 99% em peso de constituintes sólidos não-amiláceos que estão presentes nos grãos de cereais moídos,
15 correspondendo à taxa de extração. Baseado nos constituintes amiláceos da massa moída base (e portanto na quantidade de açúcar metabolizável no meio contendo dextrina (1)), os constituintes sólidos não-amiláceos na massa moída base preferivelmente totalizam pelo menos 10% em peso e em particular pelo menos 15% em peso, por exemplo de 15 a 75% em peso e especificamente
20 dentro da faixa de 20 a 60% em peso.

A massa moída base intencionada para liquefação em etapa a2) é misturada de acordo com a invenção com um líquido aquoso, por exemplo água fresca, água de processo recirculada, por exemplo da fermentação subsequente, ou com uma mistura de líquidos. Como uma regra, da
25 fermentação subsequente. Como uma regra, uma tal quantidade de carga de alimentação de amido ou massa moída base será misturada com o líquido aquoso e liquefeita no último de modo que a concentração de equivalentes de glicose de pelo menos 40% em peso, baseado no peso total do meio (1), está presente no líquido aquoso contendo dextrina (1). O teor de matéria seca no



meio resultante (1) é tipicamente pelo menos 50% em peso baseado no peso total do meio (1).

Para realizar o processo de acordo com a invenção, o líquido aquoso usado para suspender a massa moída base sólida pode ser pré-aquecido para uma temperatura moderadamente elevada, por exemplo na faixa de 40 a 60°C. Contudo, é preferido empregar os líquidos na temperatura ambiente.

Para realizar a liquefação da porção de amido da massa moída base de acordo com a etapa a2), tem se provado vantajoso antes de iniciar a liquefação apenas misturar uma parte da massa moída base inteira com o líquido aquoso e adicionar o restante da massa moída base mais tarde no líquido aquoso durante o processo de liquefação, quer continuamente quer em batelada.

A liquefação da massa moída base de acordo com a etapa a2) pode ser efetuada por processos costumeiros com os quais o trabalhador experiente está familiarizado, por exemplo pelos métodos descritos em "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", que tem sido descrito no início, Chapter 2, pp. 7 a 23.

De acordo com a invenção, o processo de liquefação em etapa a2) é realizado na presença de pelo menos uma enzima liquefatora de amido. Para este fim, é possível, em princípio, para empregar todas as enzimas liquefadoras de amido, em particular α -amilases (classe de enzima EC 3.2.1.1), por exemplo α -amilases que têm sido obtidas de *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus stearothermophilus*, especificamente aquelas que são usadas para liquidificar materiais, obtidos pelos métodos de moagem seca, para os propósitos de produção de bioetanol. As α -amilases que estão disponíveis para liquefação também estão comercialmente disponíveis for liquefação também estão comercialmente disponíveis, por exemplo de Novozymes sob o nome comercial Termamyl 120 L, tipo L; ou de Genencor



sob o nome comercial Spezyme. Uma combinação de diferentes α -amilases também pode ser empregada para a liquefação.

Isto dá um líquido aquoso que compreende a porção amilácea liquefeita da massa moída base, tipicamente dextrinas com, como uma regra, 3 a 18, em particular 6 a 12, unidades de monossacarídeo, se apropriado outros oligossacarídeos, se apropriado quantidades pequenas de mono- e/ou dissacarídeos (como uma regra $< 30\%$ em peso, freqüentemente $< 25\%$ em peso, $< 20\%$ em peso, em particular $< 10\%$ em peso, baseado na quantidade total de mono-, di- e oligossacarídeos) e os constituintes não-amiláceos da massa moída base empregada, em particular os constituintes sólidos não-amiláceos da massa moída base empregada para a liquefação.

As quantidades de enzima liquefatora de amido e de massa moída base serão escolhidas vantajosamente em uma tal maneira que a viscosidade durante o processo de gelatinização seja suficientemente reduzida para tornar possível uma mistura eficiente da suspensão, por exemplo por meio de agitação. A viscosidade da mistura reacional durante o processo de gelatinização é preferivelmente não mais do que 20 Pas, more preferivelmente não mais do que 15 Pas e mais preferivelmente não maior do que 8 Pas. Como uma regra, a viscosidade é medida usando um Haake viscometer type Roto Visko RV20 equipado com um Sistema de medição M5 e uma instrumentação MVDIN, em uma temperatura de 50°C e em uma taxa de cisalhamento de 200 s^{-1} .

As α -amilases (ou a enzima liquefatora de amido usada) podem inicialmente serem introduzidas no vaso de reação se não adicionadas durante a etapa a2). Preferivelmente, uma parte das α -amilases requerida em etapa a2) é adicionada no começo de etapa a2), ou esta parte é inicialmente introduzida no reator. A quantidade total de α -amilases está normalmente dentro da faixa de 0,002 a 3,0% em peso, preferivelmente de 0,01 a 1,5% em peso e especialmente preferivelmente de 0,02 a 0,5% em peso, baseado na

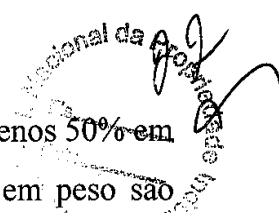


quantidade total de carga de alimentação de amido empregada.

A liquefação pode ser realizada acima ou abaixo da temperatura de liquefação. Preferivelmente, a liquefação em etapa a2) é realizada pelo menos em parte acima da temperatura de liquefação, ou temperatura de gelatinização, do amido empregado (conhecido como processo de cozimento). A temperatura requerida para o amido em questão é conhecida pelo trabalhador experiente (veja "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", que tem sido citado no início, Chapter 2, p. 11) ou pode ser determinada por ele por experimentação rotineira. Como uma regra, a temperatura escolhida está dentro da faixa de entre 80 e 165°C, preferivelmente entre 90 e 150°C e especialmente preferivelmente dentro da faixa de 100 a 140°C, a temperatura, como uma regra, estando pelo menos 5 K, preferivelmente pelo menos 10 K e especialmente preferivelmente pelo menos 20 K, por exemplo 10 a 100 K, em particular 20 a 80 K, acima da temperatura de gelatinização. Nestas temperaturas, a estrutura granular do amido é destruída (gelatinização), tornando possível a degradação enzimática do último.

Para as α -amilases (ou a enzima liquefatora de amido usada) serem otimamente efetivas, etapa a2) é preferivelmente realizada pelo menos por algum tempo no pH ótimo da enzima liquefatora, freqüentemente em um pH na faixa fracamente ácida, preferivelmente entre 4,0 e 7,0, more preferivelmente entre 5,0 e 6,5, o ajuste de pH normalmente sendo realizado antes ou no início da etapa a2); é preferido checar e, se apropriado, reajustar este pH durante um processo de liquefação. O pH é preferivelmente ajustado usando ácidos minerais diluídos tais como H_2SO_4 ou H_3PO_4 ou soluções aquosas diluídas de metal alcalino tais como NaOH ou KOH.

Em uma modalidade preferida para liquefazer a porção amilácea na massa moída base em etapa a2), pelo menos um pouco da massa moída base é adicionado continuamente ou em batelada no líquido aquoso.



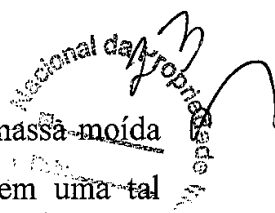
Preferivelmente, pelo menos 40% em peso, em particular pelo menos 50% em peso e muito especialmente preferivelmente pelo menos 55% em peso são adicionados durante o curso de um processo de liquefação no reator.

5 Frequentemente, a quantidade adicionada não ultrapassará 90% em peso, em particular 85% em peso e especialmente preferivelmente 80% em peso. Preferivelmente, a porção de massa moída base que é adicionada no curso do processo é alimentada no reator sob condições como as que prevalecem durante uma fase de liquefação. A adição pode ser efetuada em batelada, i.e. em porções, em várias porções, que totaliza preferivelmente em cada caso não mais do que 30% em peso, especialmente preferivelmente não mais do que 10 20% em peso, por exemplo 1 a 30% em peso e em particular 2 a 20% em peso da quantidade total de massa moída base a ser liquefeita, se não continuamente. Um aspecto essencial desta modalidade é que apenas um pouco da massa moída base, preferivelmente não mais do que 60% em peso, 15 em particular não maior do que 50% em peso e especialmente preferivelmente não mais do que 45% em peso da massa moída base está presente no reator no início da liquefação, enquanto que o restante da massa moída base é adicionado durante uma fase de liquefação.

20 A liquefação também pode ser realizada continuamente, por exemplo em uma cascata de reações em múltiplas etapas.

Em uma modalidade preferida, etapa a2) do processo de acordo com a invenção é realizada em uma tal maneira que uma porção totalizando não mais do que 60% em peso, preferivelmente não mais do que 50% em peso e especialmente preferivelmente não mais do que 45% em peso, 25 por exemplo 10 a 60% em peso, em particular 15 a 50% em peso, e especialmente preferivelmente 20 a 45% em peso, baseado na quantidade total de massa moída base, é inicialmente suspensa no líquido aquoso, e uma liquefação é subsequente realizada.

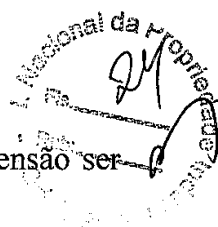
Em uma modalidade preferida, a adição descontínua ou



contínua, em particular a adição em porções, de um pouco da massa moída base na presença de pelo menos uma α -amilase é realizada em uma tal maneira que a viscosidade do meio líquido seja não maior do que 20 Pas, preferivelmente não mais do que 15 Pas e especialmente preferivelmente não mais do que 8 Pas. Para ajudar no controle da viscosidade, tem se mostrado vantajosa a adição de pelo menos 25% em peso, preferivelmente pelo menos 35% em peso e especialmente preferivelmente pelo menos 50% em peso da quantidade total de massa moída base adicionada em uma temperatura acima da temperatura de gelatinização do amido presente na massa moída base. Além disso, o controle da viscosidade pode ser adicionalmente influenciado pela adição de pelo menos uma enzima liquefatora de amido, preferivelmente uma α -amilase, e/ou de pelo menos uma enzima de sacarificação, preferivelmente uma glicoamilase, em porções das mesmas.

Para realizar o método de acordo com a invenção, é possível pré-aquecer o líquido aquoso usado para suspender a massa moída base sólida em uma temperatura moderadamente aumentada, por exemplo na faixa de 40 a 60°C. Contudo, é preferido empregar os líquidos na temperatura ambiente.

Então, a pelo menos uma enzima liquefatora de amido, preferivelmente uma α -amilase, é adicionada nesta suspensão da massa moída base. Se um pouco da massa moída base é adicionado apenas durante uma fase de liquefação, é vantajoso no início apenas adicionar um pouco das α -amilases, por exemplo 10 a 70% em peso, e em particular 20 a 65% em peso, baseado em todas as α -amilases empregada em etapa a2). A quantidade de α -amilases adicionada neste ponto no tempo depende da atividade das α -amilases em questão sob as condições de reação com relação à carga de alimentação de amido usada e está geralmente dentro da faixa de 0,0004 a 2,0% em peso, preferivelmente de 0,001 a 1,0% em peso e especialmente preferivelmente de 0,02 a 0,3% em peso, baseado na quantidade total da carga de alimentação de amido empregada. Como uma alternativa, as porções de α -

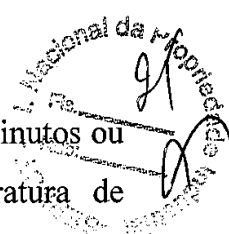


amilases podem ser misturadas com o líquido usado antes da suspensão ser preparada.

5 A quantidade ou porção de α -amilases empregada é preferivelmente adicionada na suspensão antes de o aquecimento para a temperatura usado para a liquefação ter iniciado, em particular na temperatura ambiente ou temperatura apenas moderadamente aumentada, por exemplo na faixa de 20 a 30°C.

10 A suspensão assim preparada é então aquecida, preferivelmente para uma temperatura acima da temperatura de gelatinização do amido usado. Como uma regra, uma temperatura dentro da faixa de entre 80 e 165°C, preferivelmente entre 90 e 150°C e especialmente preferivelmente entre 100 e 140°C é escolhida, a temperatura normalmente preferivelmente estando pelo menos 5 K, preferivelmente pelo menos 10 K e especialmente preferivelmente pelo menos 20 K, por exemplo 10 a 100 K, em 15 particular 20 a 80 K acima da temperatura de gelatinização. Enquanto se monitora a viscosidade, outras porções da carga de alimentação de amido, por exemplo em cada caso 1 a 30% em peso e em particular de 2 a 20% em peso, baseado em toda a massa moída base empregada, são adicionadas se apropriado gradualmente na suspensão contendo amido. É preferido neste 20 caso adicionar a porção da massa moída base a ser adicionada no custo da etapa de liquefação pelo menos 2, preferivelmente pelo menos 4 e especialmente preferivelmente pelo menos 6 frações da mistura reacional. Como uma alternativa, a porção da massa moída base que não tem sido empregada para preparar a suspensão pode ser adicionada continuamente 25 durante a etapa de liquefação nesta modalidade. Durante a adição, a temperatura deve vantajosamente ser mantida acima da temperatura de gelatinização do amido.

Após a temperatura desejada ter sido alcançada, ou, se apropriado, após toda a farinha tiver sido adicionada, a mistura reacional é



normalmente mantida por algum tempo, por exemplo por 10 a 60 minutos ou mais, se requerida, na temperatura ajustada acima da temperatura de gelatinização do amido, i.e. cozida. Então, como uma regra, a mistura reacional é esfriada para uma temperatura um pouco menor, mas
5 preferivelmente acima da temperatura de gelatinização, por exemplo a 70 a 90°C. Depois, se apropriado, uma outra porção de α -amilases, preferivelmente a porção maior, é adicionada. Neste caso, a quantidade de α -amilases adicionada neste ponto no tempo é, dependendo da atividade sob as condições de reação das α -amilases usadas, preferivelmente de 0,002 a 2,0% em peso, especialmente preferivelmente de 0,01 a 1,0% em peso e muito especialmente preferivelmente de 0,02 a 0,4% em peso, baseado na quantidade total da carga de alimentação de amido empregada.
10

Para totalmente degradar o amido em dextrinas, a mistura reacional é mantida na temperatura ajustada, ou, se apropriado, adicionalmente aquecido, até que a detecção de amido por meio de iodo ou, se
15 apropriado, outro teste para detectar amido for negativo ou pelo menos essencialmente negativo. Se apropriado, uma ou mais outras porções de α -amilases, por exemplo na faixa de 0,001 a 0,5% em peso e preferivelmente de 0,002 a 0,2% em peso, baseado na quantidade total da carga de alimentação de amido empregada, podem ser agora adicionadas na mistura reacional.
20

Alternativamente, é possível, para liquefazer a porção de amido, primeiro aquecer a suspensão aquosa compreendendo a massa moída base para uma temperatura acima da temperatura de gelatinização do amido presente na carga de alimentação de amido ou na massa moída base por meio
25 da introdução de vapor. Tipicamente, a suspensão será aquecida em uma temperatura que está pelo menos 10 K e em particular pelo menos 20 K, por exemplo 10 a 100 K, em particular 20 a 80 K, acima da temperatura de gelatinização em questão. Em particular, a suspensão é aquecida para temperaturas dentro da faixa de 90 a 150°C, especificamente dentro da faixa

de 100 a 140°C.

O vapor empregado para aquecer a suspensão é tipicamente vapor superaquecido com uma temperatura de pelo menos 105°C, em particular pelo menos 110°C, por exemplo 110 a 210°C. O vapor é preferivelmente introduzido na suspensão em uma pressão superatmosférica. Conseqüentemente, o vapor preferivelmente possui uma pressão de pelo menos 150 kPa, por exemplo 150 a 1.600 kPa, em particular 200 a 1,200 kPa.

Como uma regra, vapor é introduzido na suspensão em uma tal maneira que o vapor é introduzido na suspensão na pressão superatmosférica, preferivelmente na pressão superatmosférica de 100 a 1.000 ou 1.100 kPa, em particular 150 a 500 kPa, preferivelmente em velocidade alta. O resultado da introdução do vapor é que a suspensão é instantaneamente aquecida para temperaturas de acima de 90°C, isto é temperaturas acima da temperatura de gelatinização.

Aquecimento com vapor é preferivelmente realizado em um dispositivo de operação contínua que é carregado com a suspensão continuamente em uma pressão de alimentação específica que é o resultado da viscosidade da suspensão, da vazão de alimentação e da geometria do dispositivo e que, na zona de carregamento de suspensão, é carregada com vapor quente via um bocal ajustável em pressão elevada baseada na pressão de alimentação. Alimentação do vapor em pressão elevada significa que não apenas a suspensão aquecida, mas também energia mecânica é introduzida no sistema, e esta energia mecânica promove uma cominuição adicional das partículas de massa moída base, produz um fornecimento de energia particularmente uniforme, e assim produz gelatinização especialmente uniforme das partículas de amido granular na massa moída base. Estes dispositivos tipicamente possuem uma geometria tubular. O vapor é preferivelmente alimentado ao longo do eixo longitudinal do dispositivo tubular. Como uma regra, a suspensão é fornecida em um ângulo de pelo



menos 45° ou em um ângulo reto. O bocal de área ajustável tipicamente possui uma geometria cônica que se afila na direção de fluxo do vapor. A agulha, ou uma lâmina vertente que está arranjada sobre um bastão longitudinalmente deslocável, está arranjado dentro deste bocal. Agulha, ou

5 lâmina vertente, junto com o cone do bocal, formam uma abertura. Pelo deslocamento da agulha, ou do bastão, longitudinalmente, o tamanho da abertura, e portanto a área de seção transversal da porta do bocal pode ser ajustada em uma maneira simples, pelo qual a velocidade na qual vapor é fornecido pode ser controlada em uma maneira simples.

10 Estes dispositivos também são tipicamente equipados com um tubo de mistura para dentro do qual a suspensão é transportada após o vapor ter sido fornecido e no qual a suspensão deixa o dispositivo. Este tubo de mistura está normalmente arranjado ao longo do fornecimento de vapor e perpendicular a alimentação. O tubo de mistura e o bocal juntos

15 tipicamente formam uma abertura através da qual a suspensão é transportada. Como um resultado desta abertura, forças cisalhantes adicionais atuam sobre a suspensão durante o processo de transporte e assim aumentam o fornecimento de energia mecânica para a suspensão. O tubo de mistura pode ser arranjado em uma tal maneira que é longitudinalmente deslocável.

20 Deslocamento do tubo de mistura é um modo simples de ajustar o tamanho da abertura e assim a queda de pressão no dispositivo.

Tais dispositivos são conhecidos da técnica anterior sob o nome cozinhador de jato comercial, por exemplo o dispositivo que é mostrado em "The Alcohol Textbook", Chapter 2, loc. cit., Figure 13, e comercialmente

25 disponível, por exemplo sob o nome comercial HYDROHEATER® de Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, USA.

Quando a reação é realizada continuamente, a suspensão tratada com vapor é, como uma regra, subsequente transferida para dentro de uma zona de pós-reação com o propósito de continuar a

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

Após a suspensão ter deixado a zona de pós-reação, a pressão é liberada, como uma regra, e uma liquefação é subsequente realizada.
15 Liberação da pressão é preferivelmente realizada na forma de uma evaporação rápida com o objetivo de esfriar a suspensão para, preferivelmente, temperaturas abaixo de 100°C, em particular abaixo de 85°C. Como uma regra, o amido assim desintegrado é então liquefeito em um vaso de reação separado. A liquefação pode ser realizada como descrito acima.

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



dextrinas.

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

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

Visto que, como uma regra, massa moída base que compreende essencialmente todos ou virtualmente todos os constituintes da carga de alimentação de amido ou, além do amido, também uma porção dos constituintes sólidos não-amiláceos é empregada para a preparação do líquido contendo dextrina (1) (i.e. os constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido não são totalmente removidos), o líquido contendo dextrina (1) obtido também compreende um pouco dos ou todos os constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido. Isto freqüentemente acarreta a introdução de uma quantidade de fitato, por exemplo de cereal, cuja quantidade não é omitida. Para evitar o efeito inibitório que assim resulta, é vantajoso adicionar, em etapa a2), pelo menos

uma fitase no meio (1) antes de submeter o meio a uma etapa de fermentação.

A fitase pode ser adicionada antes da, durante a ou após a liquefação, se se for suficientemente estável nas respectivas temperaturas altas. Quaisquer fitases podem ser empregadas desde que sua atividade seja em cada caso não maior do que marginalmente afetada sob as condições de reação. Fitases usadas preferivelmente possuem uma estabilidade térmica (T_{50}) $> 50^{\circ}\text{C}$ e especialmente preferivelmente $> 60^{\circ}\text{C}$. A quantidade de fitase é normalmente de 1 a 10,000 unidades/kg de carga de alimentação de amido e em particular 10 a 4.000 unidades/kg de carga de alimentação de amido.

10 Tem se provado vantajoso durante a preparação do líquido contendo dextrina (1) também adicionar outras enzimas, por exemplo pululanases, celulasas, hemicelulasas, glicanases, xilanases ou proteases. A adição destas enzimas pode ter um efeito positivo sobre a viscosidade, i.e. reduz a viscosidade (por exemplo por clivagem dos (arabilo-)xilanos e/ou

15 glicanos de cadeia longa (também chamados de cadeia mais longa), e realização da liberação de glicosídeos metabolizáveis e a liberação de amido (residual). O uso de proteases possui efeitos positivos análogos, adicionalmente sendo possível liberar aminoácidos que atuam como fatores de crescimento para a fermentação.

20 O líquido contendo dextrina (1) obtido em etapa a2) possui, como uma regra, uma concentração de equivalentes de glicose de pelo menos 20% em peso (= 200 g/kg), em particular pelo menos 40% em peso e especificamente pelo menos 50% em peso, freqüentemente dentro da faixa de 30 a 75% em peso, preferivelmente dentro da faixa de 40 a 70% em peso, em

25 particular dentro da faixa de 50 a 65% em peso, in cada caso baseado no peso total do meio (1).

A concentração de matéria seca no líquido (1) resultante é tipicamente pelo menos 25% em peso, preferivelmente pelo menos 40% em peso, em particular pelo menos 50% em peso, especificamente pelo menos

60% em peso, e, como uma regra, não ultrapassará 80% em peso, in cada caso baseado no peso total do meio (1).

Os equivalentes de glicose presentes no líquido contendo dextrina (1) estão essencialmente presentes na forma de oligossacarídeos, em particular dextrinas. O constituinte principal destes oligossacarídeos, ou dextrinas, é tipicamente glicose, sendo também possível que o meio compreenda quantidades pequenas de mono- e/ou dissacarídeos e oligossacarídeos consistindo de outras unidades de monossacarídeo. Os constituintes contendo açúcar no meio contendo dextrina (1), i.e. os mono-, di- e oligossacarídeos, tipicamente compreendem pelo menos 70% em peso, freqüentemente pelo menos 75% em peso, em particular pelo menos 80% em peso, especificamente pelo menos 90% em peso de oligossacarídeos, em particular dextrinas, i.e. os mono- e dissacarídeos totalizam menos do que 30% em peso, freqüentemente menos do que 25% em peso, em particular menos do que 20% em peso e especificamente menos do que 10% em peso.

A glicose que está presente na forma livre ou ligada normalmente totaliza dentro da faixa de 50 a 99% em peso, em particular de 75 a 97% em peso e especificamente de 80 a 95% em peso dos equivalentes de glicose do meio (1), baseado na quantidade total de equivalentes de glicose.

O líquido aquoso contendo dextrina (1) que tem sido obtido em etapa a2) é usado de acordo com a invenção em etapa b) para a produção fermentativa do composto orgânico desejado. Para este fim, o líquido contendo dextrina (1) é alimentado em uma fermentação, onde it serves para cultivar os microorganismos empregada na fermentação. O composto orgânico em questão is aqui obtido como um metabólito microbiano volátil ou não-volátil.

Como uma regra, o líquido contendo dextrina (1) resultante é empregado diretamente em uma fermentação de acordo com a etapa b), sem

um tanque de sacarificação separado. Como uma regra, o líquido contendo dextrina (1) será esfriado para a temperatura de fermentação, normalmente dentro da faixa de 32 a 37°C, antes de ser alimentado para dentro da fermentação.

5 Antes da fermentação, o líquido aquoso contendo dextrina (1) pode, se apropriado, ser esterilizado, os microorganismos sendo normalmente destruídos por processos químicos ou térmicos. Por exemplo, o líquido aquoso contendo dextrina (1) é aquecido por temperaturas de normalmente acima de 80°C para este propósito. A destruição, ou lise, das células pode
10 ocorrer diretamente antes da fermentação. Para este fim, todo o líquido contendo dextrina (1) é submetido à etapa de destruição ou lise. Esta pode ser realizada térmica, mecânica ou quimicamente. Contudo, para os propósitos do processo de acordo com a invenção, não tem se mostrado necessário preceder a fermentação por uma etapa de esterilização como aqui descrito; em vez
15 disso, tem se provado vantajoso não realizar uma tal etapa de esterilização. Conseqüentemente, uma modalidade preferida da invenção refere-se a um processo no qual o meio (1) que é obtido em etapa a2) é diretamente alimentado para dentro da fermentação, i.e antes de ser previamente esterilizado.

20 Durante a fermentação, a metabolização das dextrinas ocorre de acordo com a invenção essencialmente sem a adição de enzimas de sacarificação. Aqui, as dextrinas são metabolizadas pelo microorganismo, provavelmente após terem sido hidrolisadas pelas enzimas de sacarificação inerentes da cepa, por exemplo glicoamilases inerentes da cepa. Os
25 constituintes de amido liquefeitos são provavelmente sacarificados em paralelo com a metabolização do açúcar, em particular do monossacarídeo glicose, pelos microorganismos.

Em uma modalidade preferida, o microorganismo empregado para a fermentação é portanto selecionado dentre microorganismos que

expressam, ou produzem, enzimas que hidrolisam dextrinas a monossacarídeos, em particular dentre aqueles que produzem, ou expressam, glicoamilases. Tais microorganismos são conhecidos pelo trabalhador experiente ou podem ser determinados por experimentos rotineiros, por exemplo por métodos de seleção, por exemplo por uma seleção de glicoamilase, por exemplo pelo crescimento do microorganismo em um teste de frasco agitado seguido pelo ensaio da atividade enzimática para glicoamilase, ou pela seleção com o auxílio dos iniciadores/sondas usando os métodos de seleção descritos na sessão de exemplos, e via pesquisas de banco de dados em banco de dados de enzimas tais como:

- Brenda [Schomburg I., Chang A., Hofmann O., Ebeling C., Ehrentreich F., Schomburg D. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. Trends Biochem Sci. 2002 Jan;27(1):54-6.],
- Swissprot [Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.-C., Estreicher A., Gasteiger E., Martin M.J., Michoud K., O'Donovan C., Phan I., Pilbout S., Schneider M. *The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003* Nucleic Ácidos Res. 31:365-370(2003)],
- ERGO-WIT [Overbeek R, Larsen N, Walunas T, D'Souza M, Pusch G, Selkov E Jr, Liolios K, Joukov V, Kaznadzey D, Anderson I, Bhattacharyya A, Burd H, Gardner W, Hanke P, Kapatral V, Mikhailova N, Vasieva O, Osterman A, Vonstein V, Fonstein M, Ivanova N, Kyrpides N. The ERGO(TM) genome analysis and discovery system. Nucleic Ácidos Res 2003 Jan 1;31(1): 164-71; Overbeek R, Larsen N, Pusch GD, D'Souza M, Selkov E Jr, Kyrpides N, Fonstein M, Maltsev N, Selkov E. WIT: integrated system for high-throughput genome sequence analysis and metabolic reconstruction. Nucleic Ácidos Research, 2000; Vol. 28, No.1: 123-125],

- CAZY [Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymas server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzimas: an integrated database approach. Em "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12] and
- PIR [Cathy H. Wu, Lai-Su L. Yeh, Hongzhan Huang, Leslie Arminski, Jorge Castro-Alvear, Yongxing Chen, Zhang-Zhi Hu, Robert S. Ledley, Panagiotis Kourtesis, Baris E. Suzek, C. R. Vinayaka, Jian Zhang, and Winona C. Barker. The Protein Information Resource. Nucleic Ácidos Research, 31: 345-347, 2003.]

seguindo o método descrito na sessão de exemplos.

Exemplos de microorganismos adequados com atividade de glicoamilase são:

Agrobacterium tumefaciens, *Arxula adeninivorans*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus kawachi*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus shirousami*, *Aspergillus terreus*, *Athelia rolfsii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Beta vulgaris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia pseudomallei*, *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida glabrata*, *Candida tsukubaensis*, *Caulobacter crescentus*, *Cephalosporium charticola*, *Cephalosporium eichhorniae*, *Ceratocystis paradoxa*, *Chaetomium thermophilum*, *Chlorobium tepidum*, *Chromobacterium violaceum*, *Cladosporium resinae*, *Clostridium sp.*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Coniophora puteana*, *Corticium rolfsii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces*

- hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Emericella nidulans*, *Endomyces* sp.,
Endomycopsis fibuligera, *Fusarium venenatum*, *Haloarcula marismortui*,
Hormoconis resinae, *Humicola grisea*, *Humicola lanuginosa*, *Hypocrea lixii*,
Kluyveromyces lactis, *Lentinula edodes*, *Lipomyces kononenkoae*,
5 *Magnaporthe grisea*, *Mesorhizobium loti*, *Methanocaldococcus jannaschii*,
Methanococcus jannaschii, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina*
acetivorans, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Monascus*
rubiginosus, *Monascus* sp., *Mucor rouxianus*, *Mycobacterium bovis*,
Mycobacterium leprae, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium*
10 *tuberculosis*, *Myrothecium* sp., *Neurospora crassa*, *Nostoc punctiforme*,
Oryza sativa, *Paecilomyces variotii*, *Penaeus japonicus*, *Penicillium*
chrysogenum, *Penicillium oxalicum*, *Picrophilus torridus*, *Pseudomonas*
fluorescens, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia*
eutropha, *Ralstonia metallidurans*, *Rana japonica*, *Rhizobium*
15 *leguminosarum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*,
Rhizopus oryzae, *Rhizopus* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodopseudomonas*
palustris, *Rhodospirillum rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces*
diastaticus, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*,
Schizosaccharomyces pombe, *Schwanniomyces occidentalis*, *Shewanella*
20 *oneidensis*, *Sphingomonas aromaticivorans*, *Streptomyces coelicolor*,
Sulfolobus acidocaldarius, *Sulfolobus solfataricus*, *Talaromyces emersonii*,
Termitomyces clypeatus, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoanaerobacter*
tengcongensis, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*,
Thermoascus crustaceus, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoproteus tenax*,
25 *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* e *Trichosporon adeninovorans*.

Se os microorganismos empregados na fermentação expressam glicoamilases intrínsecas de cepa, o pH do meio de fermentação pode ser ajustado para um valor na faixa de atividade ótima para glicoamilase, por exemplo para um valor dentro da faixa de entre 3,5 e 6,0. O pH será

freqüentemente ajustado para um valor ótimo para a fermentação que pode estar fora da faixa acima mencionada, por exemplo na faixa de 6,0 a 8,0. Isto pode ser inteiramente vantajoso para a fermentação a despeito da atividade limitada de numerosas glicoamilases nesta faixa de pH se não requerido como

5 um resultado das condições de fermentação a serem ajustadas, que são para serem adaptadas em particular ao microorganismo em questão. A faixa de pH que é ótima para a fermentação pode ser determinada pelo trabalhador experiente por experimentos rotineiros.

Para obter um grau alto de conversão das dextrinas

10 introduzidas no meio de fermentação via o meio (1), o meio de fermentação será normalmente mantido na temperatura ajustada durante um período de, por exemplo, 2 a 72 horas ou, se apropriado, mais longo, por exemplo de 2 a 96 horas, em particular de 5 a 48 horas. Os monossacarídeos obtidos das dextrinas por hidrólise, em particular glicose, são tipicamente metabolizados

15 muito rapidamente pelos microorganismos de modo que, como uma regra, não podem ser detectadas concentrações maiores de monossacarídeo ou de glicose.

A fermentação pode ser realizada na maneira costumeira conhecida pelo trabalhador experiente. Para este fim, o microorganismo

20 desejado respectivo será, como uma regra, cultivado no meio líquido obtido pelo método aqui descrito.

O processo de fermentação pode ser realizado quer como uma operação em batelada quer como uma operação em batelada alimentada (incluindo batelada alimentada com colheita intermediária), a operação em

25 batelada alimentada sendo preferida.

Por exemplo, o meio (1) que tem sido obtido pelo processo de acordo com a invenção, se apropriado junto com uma carga de alimentação de açúcar convencional, i.e. mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis ou media compreendendo mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis, se

apropriado após diluição com água e adição de constituintes de meio convencionais tais como as tampões, sais nutrientes, carga de alimentação de nitrogênio tal como sulfato de amônio, uréia, e semelhantes, componentes de meio nutrientes complexos compreendendo aminoácidos, tais como extratos de levedo, peptonas, CSL e semelhantes, podem ser inoculados com o microorganismo desejado e o último pode ser multiplicado sob condições de fermentação até que a concentração de microorganismo alcance o estado estacionário que é desejado para a fermentação. Aqui, as dextrinas presentes no meio de fermentação são metabolizadas e o metabólito desejado é formado (também conhecida como operação em batelada ou fase em batelada).

Quando se realiza uma operação em batelada alimentada, o meio (1) é adicionado continuamente ou em batelada no meio de fermentação após a fase em batelada, por exemplo quando a concentração de açúcar total tem caído para abaixo de um nível especificado.

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

b1) cultivar, em um meio de fermentação aquoso (2), o microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico; e

b2) adicionar o meio contendo dextrina (1), se apropriado junto com uma carga de alimentação de açúcar convencional, no meio de fermentação (2), no qual as dextrinas presentes no meio (1) são metabolizadas pelos microorganismos que superproduz o composto orgânico, se apropriado após ter sido previamente sacarificado.

Em etapa b1), por exemplo, um meio tradicional contendo açúcar, normalmente a solução de glicose, ou um meio líquido (1) de acordo com a invenção, ou uma mistura de (1) com uma carga de alimentação de açúcar convencional, pode ser primeiro trazido para uma concentração de açúcar adequada por diluição com um líquido aquoso, em particular água, e os componentes do meio convencionalmente usados para propósitos de

fermentação tais como tampões, sais nutrientes, cargas de alimentação nitrogenadas tais como sulfato de amônio, uréia e semelhantes, constituintes de meio nutriente complexo compreendendo aminoácidos, tais como extratos de levedo, peptonas, CSL e semelhantes são adicionados. Aqui, a razão entre a quantidade de sugar e líquido será, como uma regra, preferivelmente selecionada em um tal modo que a concentração total de monossacarídeo no meio de fermentação (2) é menor do que 6% em peso, por exemplo na faixa de ≥ 0 a 5% em peso, calculada como equivalentes de glicose e baseado no peso total do meio de fermentação (2). O meio de batelada contendo açúcar assim preparado é inoculado com o microorganismo desejado, e o microorganismo é multiplicado no meio de batelada (meio de fermentação (2)) sob condições de fermentação até que a concentração de microorganismo alcance um estado estacionário que é desejado para a fermentação. Durante este processo, o açúcar proporcionado com o meio de fermentação (2) é metabolizado e o metabólito desejado é formado.

Na fase em batelada alimentada subsequente, o processo de fermentação é mantido pela adição do meio contendo dextrina (1) no meio de fermentação (2), e o metabólito que é superproduzido pelo microorganismo se acumula no licor de fermentação, sendo possível a ocorrência do acúmulo na forma intracelular se não extracelular. A razão em volume de meio (1) adicionado para o meio de batelada proporcionado, que compreende o microorganismos (meio de fermentação (2)) está geralmente dentro da faixa de aproximadamente 1:10 a 10:1, por exemplo na faixa de 1:5 a 5:1 e em particular dentro da faixa de 1:1 a 5:1. A concentração de açúcar no meio de fermentação (2) pode ser controlada em particular via a vazão de alimentação de meio (1). Como uma regra, a vazão de alimentação será ajustada em uma tal maneira que a concentração de açúcar total, i.e. o total de oligossacarídeos e monossacarídeos, não ultrapassará um valor de 30% em peso, em particular 20% em peso. A concentração de monossacarídeo no licor de fermentação is



preferivelmente dentro da faixa de $> 0\%$ em peso a aproximadamente 5% em peso e é em particular não maior do que 3% em peso.

Em uma modalidade preferida, o meio de fermentação (2) em etapa b1) (i.e. aqui o meio de batelada) compreende essencialmente o meio contendo dextrina (1), os microorganismos que são capazes de superproduzir o composto orgânico, componentes de meio tais como tampões, sais nutrientes, cargas de alimentação nitrogenadas tais como sulfato de amônio, uréia e semelhantes, componentes de meio nutrientes complexos compreendendo aminoácidos, tais como extratos de levedo, peptonas, CSL e semelhantes e, se apropriado, água para diluição. Para este fim, um meio contendo dextrina (1) será, se apropriado, diluído para o teor de dextrina desejado, por exemplo na faixa de 15 a 30% em peso, calculada como equivalentes de glicose e baseado no peso total do meio contendo dextrina (1), e será usado diretamente para compor o meio de fermentação (2) (meio de batelada).

O teor de dextrina do meio contendo dextrina de acordo com a etapa b2) que é empregado para manter a fermentação é normalmente maior, por exemplo nas faixas acima mencionadas, com o objetivo de minimizar a diluição do meio de fermentação (2).

Preferivelmente, será seguido um procedimento no qual um meio contendo dextrina (1) com um teor de dextrina mais alto, por exemplo com um teor de pelo menos 30% em peso, especificamente pelo menos 40% em peso e muito especificamente pelo menos 50% em peso, calculada como equivalentes de glicose e baseado no peso total do meio contendo dextrina (1), é preparado. Este meio (1) é então usado primeiramente como descrito em etapa b1) para compor o meio de batelada, (meio de fermentação (2)), após diluição com água e, secundariamente, como descrito em etapa b2) for adição no meio de fermentação (2).

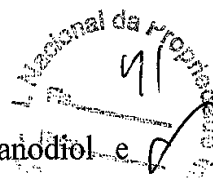
Com o uso do meio contendo dextrina (1), é possível produzir,

por intermédio de fermentação, metabólitos microbianos voláteis e não-voláteis, em particular não-voláteis possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e 1 átomo de N.

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

Contudo, também é possível empregar o meio aquoso contendo dextrina (1) em uma fermentação para a produção de metabólitos microbianos não-voláteis que, sob pressão atmosférica, possuem um ponto de ebulição abaixo do ponto de ebulição da água e/ou uma consistência oleosa.

15 O termo metabólitos microbianos não-voláteis compreende em particular ácidos mono-, di- e tricarboxílicos orgânicos que preferivelmente possuem 3 a 10 átomos de carbono e que, se apropriado, possuem m ou mais, por exemplo 1, 2, 3 ou 4, grupos hidroxila ligados neles, por exemplo ácido tartárico, ácido itacônico, ácido succínico, ácido propiônico, ácido láctico,
20 ácido 3-hidróxi-propionico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido 2,5-furano-dicarboxílico, ácido glutárico, ácido levúlico, ácido glicônico, ácido aconítico e ácido diamino-pimélico, ácido cítrico; aminoácidos proteinogênicos e não-proteinogênicos, por exemplo lisina, glutamato, metionina, fenilalanina, ácido aspártico, triptofano e treonina; bases purina e pirimidina; nucleosídeos e
25 nucleotídeos, por exemplo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e adenosina-5'-monofosfato (AMP); lipídeos; ácidos graxos saturados e insaturados possuindo preferivelmente 10 a 22 átomos de carbono, por exemplo ácido γ -linolênico, ácido di-homo- γ -linolênico, ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico; dióis possuindo



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

O termo “cofator” compreende compostos não-proteináceos que são requeridos para a ocorrência de uma atividade de enzima normal. Estes compostos podem ser orgânicos ou inorgânicos; preferivelmente, as moléculas de cofator da invenção são orgânicas. Exemplos de tais moléculas são NAD e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP); o precursor destes cofatores é niacina.

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

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

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

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

Tabela A:

Substância	Microorganismo	Referência
Ácido tartárico	<i>Lactobacilli</i> , (por exemplo <i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido itacônico	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus itaconicus</i>	Jakubowska, em Smith e Pateman (Eds.), Genetics and Physiology of <i>Aspergillus</i> , London: Academic Press 1977; Miall, em Rose (Ed.), Economic Microbiology, Vol. 2, pp. 47 -119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
Ácido succínico	<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), Inventores: Lemme e Datta; US 5504004 (1996), Inventores: Guettler, Jain e Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 -342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., “ <i>Actinobacillus succinogenes</i> sp. nov., a novel succinic-acid-

4B
2

Substância	Microorganismo	Referência
		producing strain of the bovine rumen". Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan; 49 Pt 1:207-16; US5723322, US5573931, US5521075, WO99/06532, US5869301, US5770435
Ácido hidróxi-propiónico	<i>Lactobacillus delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> ou <i>Sporolactobacillus inulinus</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Ácido propiónico	<i>Propionibacterium</i> , por exemplo <i>P. arabinosum</i> , <i>P. schermanii</i> , <i>P. freudenreichii</i> , <i>Clostridium propionicum</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido diamino-pimélico	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido cítrico	<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).
Ácido aconítico	<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 e 1993-1995;
Ácido málico	<i>Aspergilli</i> , por exemplo <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Corynebacterium</i>	US 3063910
Ácido glicônico	<i>Aspergilli</i> , por exemplo <i>A. niger</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido butírico	<i>Clostridium</i> (por exemplo <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995;
Ácido láctico	<i>Lactobacillus</i> por exemplo <i>L. delbrückii</i> , <i>L. leichmannii</i> ,	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995;
Lisina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Glutamato	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Metionina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Fenilalanina	<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>E.coli</i>	Trends Biotechnol. 3, 64-68 (1985); J. Ferment. Bioeng. 70, 253-260 (1990).
Treonina	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
Ácido aspártico	<i>E. coli</i>	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35 e referência citadas no mesmo, Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)

Substância	Microorganismo	Referência
Bases purina e pirimidina	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Adenosina-5'-monofosfato (AMP)	<i>Bacillus subtilis</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
ácido γ -linolênico	<i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Aspergillus</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Dihomo-ácido γ -linolênico	<i>Mortierella</i> , <i>Conidiobolus</i> , <i>Saprolegnia</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido araquidônico	<i>Mortierella</i> , <i>Pythium</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido eicosapentaenóico	<i>Mortierella</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido docosahexaenóico	<i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> spp., <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp.	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated ácidos graxos, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by <i>Pythium irregulare</i> for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Propanodiol	<i>E. coli</i>	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309
Butanodiol	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), H.G. SCHLEGEL and H.W. JANNASCH, 1981; Afschar et al.: Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol [Microbial production of 2,3-butanediol. CIT 64 (6), 2004, 570-571

Substância	Microorganismo	Referência
Butanol	<i>Clostridium</i> (eg <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>C. propionicum</i>)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Glicerol	<i>Yeast, Saccharomyces rouxii</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Manitol	<i>Aspergillus candida</i> , <i>Torulopsis mannito-faciens</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),
Xilitol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Ácido hialurônico	<i>Streptococcus</i> sp.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995;
Trealose	<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.: Threalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, <i>Filobasidium floriforme</i> . Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
Ácido ascórbico	<i>Gluconobacter melanogenes</i>	RÖMPP Online Version 2.2
Vitamina B ₁₂	<i>Propionibacterium</i> spp., <i>Pseudomonas denitrificans</i>	Chem. Ber. 1994, 923 -927; RÖMPP Online Version 2.2
Riboflavina	<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 B2) and character of this riboflavin". Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48.
Vitamina B ₆	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>R. meliloti</i>	EP0765939
Enzimas	<i>Aspergilli</i> (por exemplo <i>Aspergillus niger</i> <i>A. oryzae</i>), <i>Trichoderma</i> , <i>E.coli</i> , <i>Hansenula</i> ou <i>Pichia</i> (por exemplo <i>Pichia pastorius</i>), <i>Bacillus</i> (por exemplo <i>Bacillus licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>) and many outros	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Zeaxantina	<i>Dunaliella salina</i>	Jin et al (2003) Biotech.Bioeng. 81:115-124
Cantaxantina	<i>Brevibacterium</i>	Nelis et al (1991) J Appl Bacteriol 70:181-191
Liconeno	<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

Substância	Microorganismo	Referência
β-caroteno	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Candida utilis</i>	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene of <i>Blakeslea trispora</i> com Span'20, Biotechnology Letters, Vol 19, Na 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and morphology of <i>Blakeslea trispora</i> in a stirred tank reactor: mathematical modelling, Biochemical Engineering Journal 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
Astaxantina	<i>Phaffia rhodozyma</i> ; <i>Candida utilis</i>	US 5,599,711; WO 91/02060, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229
Polihidroxi- alcanoatos, poliésteres	<i>Escherichia coli</i> , <i>Alcaligenes latus</i> , and many outros	S. Y. Lee, Plastic Bacteria, Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, Vol. 14, (1996), pp. 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (Ed.), Biopolímeros, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim e referência citadas no mesmo
Polissacarídeos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L. dextranicum</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , and many outros	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Poliisoprenóides	<i>Lactarius</i> sp., <i>Hygrophorus</i> sp., <i>Russula</i> sp.	Steinbüchel (Ed.), Biopolímeros, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim e referência citadas no mesmo
Acetona	<i>Clostridium</i> (for exemplo <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>propionicum</i>) C.	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 e 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),
Acetoína	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Eds., Biology of the Prokaryotes, Thieme, Stuttgart (1999), p. 307; RÖMPP Online-Edition
Vanilina	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Amycolatopsis</i> sp.	Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296-314 (2001)
Turingensina	<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. Biotechnology and Bioengineering 48 (3) (2004), 207-213.
Policetídeos	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Sorangium cellulosum</i>	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. Pure & Appl. Chem. 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle et al.: Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of <i>Sorangium cellulosum</i> So ce26 in <i>Streptomyces lividans</i> . Microbiology 150 (8), (2004), 2761-74.
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Hollmann et al.: Extractive fermentation of Gibberellic acid using <i>Gibberella fujikuroi</i> . CIT 7 (1995), 892-895.
Índigo	<i>Escherichia coli</i> JB 102	Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech índigo. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28 (2002), 127-133.



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

Uma primeira modalidade preferida da invenção refere-se ao uso do meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de enzimas tais como fitases, xilanases ou glicanases.

Uma segunda modalidade preferida da invenção refere-se ao uso do meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de aminoácidos tais como lisina, metionina, treonina and glutamato.

Uma outra modalidade preferida da invenção refere-se ao uso do meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de vitaminas tal como ácido pantotênico e riboflavina, e seus precursores e derivados.

Uma forma de realização especialmente preferida de uma invenção se refere à produção fermentativa de

- ácidos mono-, di- e tricarboxílico, em particular ácidos mono-, di- e tricarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, tais como ácido propiônico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido itacônico, ácido cítrico e ácido dimetil-malônico,



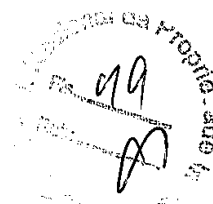
- ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, tal como ácido láctico e 3-ácido hidróxi-propiónico;
- álcoois de cadeia longa como mencionado acima de, em particular álcoois possuindo 4 a 10 átomos de C, tal como butanol;
- 5 - dióis como mencionado acima de, em particular alcanodióis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

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

20 misturas destes. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em S.Y. Lee, "Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria", Tibtech, Vol. 14, (1996), pp. 431-438, podem ser empregados.

25 Em uma modalidade preferida, os microorganismos que são empregados na fermentação são portanto selecionados dentre microorganismos naturais ou recombinantes que superproduzem pelo menos um dos seguintes metabólitos:

- enzimas tais como fitase, xilanase ou glicanase, em particular fitase;



- aminoácidos tais como lisina, treonina ou metionina, em particular lisina e metionina;
- vitaminas tais como ácido pantotênico e riboflavina; e seus precursores e/ou derivados;
- 5 - dissacarídeos tal como trealose;
- ácidos mono-, di- e tricarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, tais como ácido propiônico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido itacônico, ácido cítrico e ácido dimetil-malônico;
- 10 - poli(hidróxi-alcanoatos) tais como poli(3-hidróxi-butirato) e copoliésteres de ácido 3-hidróxi-butírico;
- ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C tal como ácido láctico e 3-ácido hidróxi-propiónico;
- cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C tal como acetona;
- álcoois possuindo 4 a 10 átomos de C tal como butanol; e
- 15 - alcanodióis possuindo 3 a 8 átomos de C tal como propanodiol.

Microorganismos adequados são normalmente selecionados dentre os gêneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* e *Clostridium*, em particular dentre cepas de

20 *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* ou *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*, *Lactobacillus leichmannii*, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*,

25 *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhizopus arrhizus* e *Rhizopus oryzae*.

Em uma modalidade preferida, o microorganismo empregado na fermentação é uma cepa do gênero *Corynebacterium*, em particular uma cepa de *Corynebacterium glutamicum*. Em particular, é uma cepa do gênero

Corynebacterium, especificamente de *Corynebacterium glutamicum*, que superproduz um aminoácido, especificamente lisina, metionina ou glutamato.

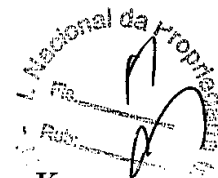
Em uma outra modalidade preferida, o microorganismo empregado na fermentação é uma cepa do gênero *Escherichia*, em particular
5 uma cepa de *Escherichia coli*. Em particular, é uma cepa do gênero *Escherichia*, especificamente de *Escherichia coli*, que superproduz um aminoácido, especificamente lisina,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

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

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

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

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



WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1.186.664 e Fujioka, K.:
“New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this
riboflavin”. *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48, podem ser empregados.

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

10 Em uma outra modalidade especialmente preferida, o
metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é ácido
succínico. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos
como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por
exemplo em *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 498 –504 (1976); EP 249773 (1987), to
15 Lemme & Datta; US 5504004 (1996), de Guettler, Jain & Soni; *Arch.*
Microbiol. **167**, 332 –342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK.,
“*Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain
of the bovine rumen”. *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Jan;49 Pt 1:207-16; US
5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO99/06532, US 5,869.301 ou US
20 5.770.435, podem ser empregados.

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

A fermentação gera um licor de fermentação que, em adição
ao metabólito microbiano desejado, essencialmente compreende a biomassa
produzida durante a fermentação, os constituintes não-metabolizados da
solução de amido liquidificado e, em particular, os constituintes sólidos não-

amiláceos da carga de alimentação de amido tais como, por exemplo, fibras e açúcares não utilizados, e também tampão e sais nutrientes não utilizados. No presente pedido, este meio líquido também é referido como licor de fermentação, o termo licor de fermentação também compreende o meio

5 contendo dextrina (1) adicionado no qual os açúcares presentes têm sido apenas submetidos à conversão parcial ou incompleta, i.e. no qual uma metabolização microbiana parcial ou incompleta dos açúcares utilizáveis (por exemplo mono- e dissacarídeos) tem ocorrido.

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

Uma modalidade específica (I) da invenção refere-se a um processo no qual pelo menos um metabólito microbiano é exaurido ou isolado

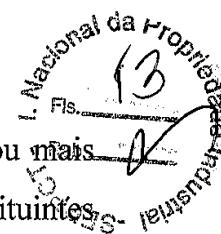
15 do licor de fermentação. A maior parte dos constituintes voláteis do licor de fermentação é subsequenteemente removida, produzindo uma composição de proteína sólida ou semi-sólida. Uma descrição mais detalhada para realizar um tal processo, e da composição de proteína obtida, é tema de WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) da companhia requerente, à qual se faz

20 referência com relação a outros detalhes.

O isolamento ou depleção dos metabólitos do licor de fermentação é normalmente realizado em um tal modo que pelo menos um metabólito é exaurido ou isolado do licor de fermentação de modo que o teor deste metabólito no licor de fermentação que permanece não seja maior do

25 que 20% em peso, em particular não maior do que 10% em peso, especificamente não maior do que 5% em peso e muito especificamente não maior do que 2,5% em peso, em cada caso baseado no peso total do licor de fermentação restante.

Compostos de química fina (i.e. o metabólito microbiano)



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

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

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



companhia requerente. Exemplos de compostos que podem ser vantajosamente preparados nesta maneira são ácido γ -linolênico, ácido di-homo- γ -linolênico, ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosaheptaenóico, ademais ácido propiônico, ácido láctico, propanodiol, butanol e acetona. Estes compostos na formulação pseudo-sólida também são entendidos como sendo, para os propósitos da presente invenção, metabólitos microbianos não-voláteis na forma sólida.

Uma outra modalidade específica (II) refere-se a um processo no qual os constituintes voláteis do licor de fermentação são substancialmente removidos, sem isolamento ou depleção prévia de um metabólito microbiano não-volátil, e, se apropriado, sem isolamento dos constituintes sólidos previamente removidos, produzindo uma formulação sólida de um metabólito microbiano não-volátil. Uma descrição mais detalhada para realizar um tal processo pode ser encontrada em PCT/EP2006/066057 (o pedido de patente inicial DE 102005042541,0) da companhia requerente.

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



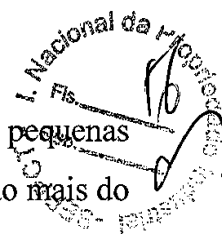
experiente está familiarizado, por exemplo, por meio de termogravimetria (Hemminger et al., "Methoden der thermischen Analyse" [Métodos de Análise Térmica], Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989).

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

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

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

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



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

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



pastoso é obtido que compreende o metabólito não-volátil e os constituintes não-voláteis, geralmente sólidos, não-amiláceos da carga de alimentação de amido ou pelo menos grandes porções do mesmo, freqüentemente pelo menos 90% em peso ou todos os constituintes sólidos não-amiláceos.

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

15 Os auxiliares de formulação que são convencionalmente usados incluem, por exemplo, aglutinantes, materiais veículo, adjuvantes de fluxo / de polvilhação, ademais pigmentos de cor, biocidas, dispersantes, antiespumantes, reguladores de viscosidade, ácidos, álcalis, antioxidantes, estabilizadores de enzima, inibidores de enzima, absorbatos, gorduras, ácidos 20 graxos, óleos ou misturas destes. Tais auxiliares de formulação são vantajosamente empregados como auxiliares de secagem em particular quando se usam métodos de secagem e formulação tais como secagem por pulverização, secagem em leito fluidizado e secagem por congelamento. Outros detalhes são encontrados em PCT/EP2006/066057 (pedido inicial DE 25 102005042541,0).

A quantidade dos aditivos acima mencionados e, se apropriados, outros aditivos tais como materiais de revestimento pode variar grandemente, dependendo dos requerimentos específicos do metabólito em questão e das propriedades dos aditivos empregados e pode estar por exemplo



na faixa de 0,1 a 80% em peso e em particular dentro da faixa de 1 a 30% em peso, em cada caso baseado no peso total da mistura de produto ou substância em sua forma formulada acabada.

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

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

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



produtos de valor e etapas de formulação, são descritos, por exemplo em Belter, P. A, "Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology", John Wiley & Sons (1988), e "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", 5th ed. em CD-ROM CD-ROM, Wiley-VCH. Métodos, equipamento, auxiliares e modalidades gerais ou específicas que são conhecidos pelo trabalhador experiente que podem ser empregados dentro do escopo do processamento ou da formulação de produto após o término da fermentação são adicionalmente descritos em EP 1038 527, EP 0648 076, EP 835613, EP 0219 276, EP 0394 022, EP 0547 422, EP 1088 486, WO 98/55599, EP 0758 018 e WO 92/12645.

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

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



secas.

Em uma modalidade preferida, a remoção dos constituintes voláteis do licor de fermentação compreende um método de secagem por pulverização ou um método de secagem em leito fluidizado, incluindo granulação em leito fluidizado. Para este fim, o licor de fermentação, se apropriado após uma separação preliminar para remover partículas sólidas grossas que compreendem apenas quantidades pequenas de metabólito microbiano não-volátil, se houver, é alimentado a uma ou mais aparelhagens de secagem em leito fluidizado ou de secagem por pulverização. O transporte, ou a alimentação, do licor de fermentação carregado de sólidos é convenientemente efetuado por meio de dispositivos de transporte costumeiros para líquidos compreendendo sólidos, por exemplo bombas, tais como bombas de fuso excêntrico (por exemplo de Delasco PCM) ou bombas de pressão alta (por exemplo de LEWA Herbert Ott GmbH).

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

- (i) uma porção de não maior do que 50% em peso, por exemplo na faixa de 5 a 45% em peso, baseado no peso total, é removido de o meio contendo dextrina (1) obtido em etapa a2), que compreende constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido, o restante é fornecido a uma fermentação para a produção de um primeiro metabólito (A), por exemplo um metabólito não-volátil (A) na forma sólida ou um metabólito volátil (A); e
- (ii) esta porção, se apropriado após tendo sido previamente removido todos ou um pouco dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido, é fornecida a uma fermentação para a produção de um segundo metabólito (B), que é idêntico ao, ou diferente de, o metabólito (A).

Se os constituintes sólidos não-amiláceos de (ii) são separados,



o teor de sólidos da porção restante do meio líquido compreendendo açúcar totaliza preferivelmente não mais do que 50% em peso, em particular não maior do que 30% em peso, especialmente preferivelmente não mais do que 10% em peso e muito especialmente preferivelmente não mais do que 5% em peso. Em um tal caso, é particularmente preferido separar todos os sólidos antes da fermentação para a produção do segundo metabólito (B).

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

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



processa o metabólito cujo campo de aplicação possui o requerimento de pureza maior, por exemplo como aditivo de alimento, pode ser reduzida.

Em uma outra modalidade preferida, este procedimento pode ser realizado por exemplo como segue. Uma fermentação de volume preferivelmente grande para a produção de metabólitos A, por exemplo aminoácidos tais como lisina, metionina, glutamato ou treonina, de ácido cítrico ou de etanol, é implementada de acordo com os processos descritos em WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) ou PCT/EP2006/066057 (o pedido de patente inicial DE 102005042541,0), ou de acordo com os métodos conhecidos da produção fermentativa de bioetanol. De acordo com i), algum do meio (1) obtido em etapa a2) é removido. A porção removida de acordo com i) pode ser liberada de acordo com ii) completamente ou em parte dos sólidos por métodos costumeiros, por exemplo centrifugação ou filtração, dependendo do que é requerido na fermentação para a produção de B. O meio (1) obtido neste modo, que é, se apropriado, totalmente ou parcialmente liberado dos sólidos, é, de acordo com ii), fornecido a uma fermentação para a produção de um metabólito B. Uma corrente de sólidos separada de acordo com i) é vantajosamente retornada para a corrente do meio (1) da fermentação de volume grande.

Se o metabólito microbiano (A) que é produzido na fermentação de volume grande é etanol, o meio (1) preparado de acordo com a etapa ii) possui concentrações de oligossacarídeos que são costumeiras na produção fermentativa de etanol (bioetanol), por exemplo na faixa de 20 a 33% em peso. De novo, a remoção de sólidos de acordo com a etapa ii) depende do que é requerido na fermentação para a produção de o metabólito B em questão.

Em uma modalidade preferida do procedimento descrito acima, o metabólito B produzido pelos microorganismos na fermentação é riboflavina. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos



como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 e Fujioka, K.: "New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin". Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48, podem ser empregados.

Para realizar esta variante do processo, uma fermentação preferivelmente de volume grande é implementada para a produção de metabólitos A, por exemplo de aminoácidos tais como lisina, metionina ou glutamato, ou de ácido cítrico ou de etanol, como descrito acima de. De acordo com i), algum do meio (1) obtido em etapa a2) é removido e liberado de acordo com ii) completamente ou em parte dos sólidos por métodos costumeiros, por exemplo centrifugação ou filtração. O meio (1) obtido do mesmo, que está essencialmente totalmente ou parcialmente liberado dos sólidos, é, de acordo com ii), fornecido a uma fermentação para a produção de metabólito B, no presente caso riboflavina. A corrente de sólidos separada de acordo com ii) é vantajosamente retornada para a corrente do meio (1) da fermentação de volume grande.

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



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

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

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

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

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

Após a secagem e/ou formulação, grãos de cereais integrais ou

moídos, preferivelmente milho, trigo, cevada, painço, tritcale e/ou centeio, podem ser adicionados na composição de proteína ou formulação de processo.

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

Exemplos

I. Moagem da carga de alimentação de amido

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

Tabela 1

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

II. Liquefação enzimática de amido e sacarificação de amido

II.1. Sem fitase na etapa de sacarificação

II.1a) Liquefação enzimática de amido

320 g farinha de milho moída seca (T71/03) foram suspensos em 480 g de água e misturados com 310 mg cloreto de cálcio por agitação contínua. Agitação foi continuada durante o experimento inteiro. Após o pH ter sido trazido para 6,5 com H_2SO_4 a mistura ter sido aquecida a 35°C, 2,4 g de Termamyl 120L tipo L (Novozymes A/S) foram adicionados. No curso de

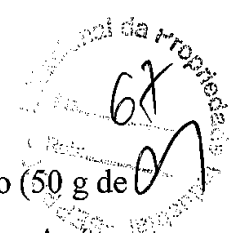
40 minutos, a mistura reacional foi aquecida para uma temperatura de 86,5°C, o pH sendo ajustado com NaOH o valor previamente ajustado, se apropriado. Dentro de 30 minutos, mais 400 g de farinha de milho moída seca (T71/03) foram adicionados, durante cujo processo a temperatura foi elevada para 91°C. A mistura reacional foi mantida nesta temperatura por aproximadamente 100 minutos. Mais 2,4 g de Termamyl 120L foram subsequentemente adicionados e a temperatura foi mantida por aproximadamente 100 minutos. O progresso da liquefação foi monitorado durante a experimentação usando a reação de iodo-amido. A temperatura foi inicialmente elevada para 100°C e a mistura reacional foi fervida por mais 20 minutos. Neste ponto no tempo, amido não foi mais detectável. O reator foi esfriado para 35°C.

II.3 Outros protocolos para a liquefação enzimática de amido

II.3a) Farinha de milho

360 g de água deionizada foram introduzidos em um vaso de reação. 1,54 mL de solução de estoque de CaCl_2 (100 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O/L}$) foram adicionados na mistura para uma concentração final de aproximadamente 70 ppm de Ca^{2+} . 240 g de farinha de milho foram lentamente adicionados na água, com agitação constante. Após o pH ter sido trazido para 6,5 usando solução aquosa de NaOH de concentração de 50% em peso, 4,0 mL (= 2% em peso de enzima/matéria seca) de Termamyl 120 L tipo L (Novozymes A/S) foram adicionados. A mistura foi então rapidamente aquecida para 85°C. Durante este processo, foi necessário constantemente monitorar e, se apropriado, ajustar o pH.

Após a temperatura final ter sido alcançada, mais farinha foi adicionada, inicialmente 50 g de farinha. Em adição, 0,13 mL de solução de estoque de CaCl_2 foi adicionado na mistura com o propósito de manter a concentração de Ca^{2+} em 70 ppm. Durante a adição, a temperatura foi mantida constante em 85°C. Pelo menos 10 minutos foram permitidos passarem com o



objetivo de garantir uma reação completa antes que uma outra porção (50 g de farinha e 0,13 mL de solução de estoque de CaCl_2) foram adicionados. Após a adição das duas porções, 1,67 mL de Termamyl foram adicionados; depois, duas outras porções (em cada caso 50 g de farinha e 0,13 mL de solução de estoque de CaCl_2) foram adicionados. O teor de matéria seca de 55% em peso foi obtido. Após a adição, a temperatura foi elevada para 100°C, a mistura foi fervida por 10 minutos.

Uma amostra foi tirada e esfriada para a temperatura ambiente. Após a amostra ter sido diluída com água deionizada (aproximadamente 1:10), uma gota de solução de Lugol (mistura de 5 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio por litro) foi adicionada. Uma coloração azul intensa indicou que amido residual estava presente; uma coloração marrom foi observada quando todo o amido havia sido hidrolisado. Quando o teste indicou que uma porção de amido residual estava presente, a temperatura foi de novo abaixada para 85°C e mantida constante. Mais 1,67 mL de Termamyl foram adicionados até que a reação de iodo-amido fosse negativa.

II.3b) Farinha de centeio (incluindo pré-tratamento com celulase/hemicelulase)

360 g de água deionizada foram introduzidos em um vaso de reação. 155 g de farinha de centeio foram adicionados lentamente na água, com agitação constante. A temperatura foi mantida constante em 50°C. Após o pH ter sido trazido para 5,5 usando solução aquosa de NaOH de concentração de 50%, 3,21 mL (= 2,5% em peso de enzima/matéria seca) de Viscozyme L (Novozymes A/S) foram adicionados. Após 30 minutos, mais 25 farinha foi adicionada, com 55 g de farinha sendo adicionados inicialmente. Após mais 30 minutos, mais 50 g de farinha foram adicionados; 30 minutos mais tarde, mais 40 g de farinha foram adicionados. 30 minutos após a última adição, uma liquefação pôde ser iniciada.

1,7 mL de solução de estoque de CaCl_2 (100 g CaCl_2 x 2

H₂O/L) foram adicionados. Após o pH ter sido ajustado para 6,5 usando solução aquosa de NaOH de 50% em peso, 5,0 mL (= 2% em peso de enzima/matéria seca) de Termamyl 120 L tipo L (Novozymes A/S) foram adicionados. A mistura foi então rapidamente aquecida para 85°C. Durante este processo, o pH foi continuamente monitorado e, se apropriado, ajustado.

Após a temperatura final ter sido alcançada, mais farinha foi adicionada, inicialmente 60 g de farinha. Em adição, 0,13 mL de solução de estoque de CaCl₂ foi adicionado na mistura com o propósito de manter a concentração de Ca²⁺ em 70 ppm. Durante a adição, a temperatura foi mantida constante em 85°C. Pelo menos 10 minutos foram permitidos passarem com o objetivo de garantir uma reação completa antes que uma outra porção (40 g de farinha e 0,1 mL de solução de estoque de CaCl₂) fosse adicionada. 1,1 mL de Termamyl foram adicionados; depois, uma outra porção (40 g de farinha e 0,1 mL de solução de estoque de CaCl₂) fosse adicionada. O teor de matéria seca de 55% em peso foi alcançado. Após a adição, a temperatura foi elevada para 100°C, a mistura foi fervida por 10 minutos.

Uma amostra foi tirada e esfriada para a temperatura ambiente. Após a amostra ter sido diluída com água deionizada (aproximadamente 1:10), uma gota de solução de Lugol (mistura de 5 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio por litro) foi adicionada. Uma coloração azul intensa indicou que amido residual estava presente; uma coloração marrom foi observada quando todo o amido havia sido hidrolisado. Quando o teste indicou que uma porção de amido residual estava presente, a temperatura foi de novo abaixada para 85°C e mantida constante. Mais 1,1 mL de Termamyl foram adicionados até que a reação de iodo-amido fosse negativa.

II.3c) Farinha de trigo (incluindo pré-tratamento com xilanase)

360 g de água deionizada foram introduzidos em um vaso de reação. A água foi aquecida para 55°C, o pH foi ajustado para 6,0 usando solução aquosa de NaOH de concentração de 50% em peso. Após a



temperatura e o pH terem sido ajustados, 3,21 mL (= 2,5% em peso de enzima/matéria seca) de Shearzyme 500L (Novozymes A/S) foram adicionados. 155 g de farinha de trigo foram lentamente adicionados na solução, com agitação constante. A temperatura e o pH foram mantidos constantes. Após 30 minutos, mais farinha foi adicionada, com 55 g de farinha sendo adicionados inicialmente. Após mais 30 minutos, 50 g de farinha foram adicionados; 30 minutos mais tarde, mais 40 g de farinha foram adicionados. 30 minutos após a última adição, uma liquefação pôde ser iniciada.

10

A liquefação foi realizada como descrito in II.3b.

III. Cepa

ATCC13032 lysC^{fbr}

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

15

IV: Identificação de cepas produtoras de / expressando glicoamilase

IVa) Triagem em banco de dados de genes

Uma pesquisa de cepas produtoras de glicoamilase

20

1. Glicoamilase (1,4-alfa-D-glicano-glico-hidrolase) é classificada no seguinte número EC de EC 3.2.1.3 [1].

2. Foi realizada uma pesquisa com a questão EC 3.2.1.3 nos seguintes bancos de dados: Brenda, Swissprot, ERGO-WIT, CAZY e PIR, resultando em cada caso em uma lista de proteínas com EC 3.2.1.3.

25

3. Os resultados respectivos foram combinados, filtrados para os sucessos dos reinos taxonômicos Archaea, Bacteria e Fungi e classificados por nomes de espécie.

4. As espécies que atenderam ao critério de filtro do parágrafo 3 e para as quais foi encontrada uma entrada de glicoamilase foi verificada em pelo menos um dos bancos de dados mencionados no parágrafo 2 são

elevadamente provavelmente capazes de produzirem glicoamilase. Especificamente, elas são as seguintes espécies:

- Agrobacterium tumefaciens*, *Arxula adeninivorans*, *Ashbya gossypii*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus foetidus*,
 5 *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus kawachi*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi*,
Aspergillus shirousami, *Aspergillus terreus*, *Athelia rolfsii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Beta vulgaris*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia fungorum*, *Burkholderia pseudomallei*,
 10 *Candida albicans*, *Candida antarctica*, *Candida glabrata*, *Candida tsukubaensis*, *Caulobacter crescentus*, *Cephalosporium charticola*, *Cephalosporium eichhorniae*, *Ceratocystis paradoxa*, *Chaetomium thermophilum*, *Chlorobium tepidum*, *Chromobacterium violaceum*, *Cladosporium resinae*, *Clostridium* sp., *Clostridium thermocellum*,
 15 *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Coniophora puteana*, *Corticium rolfsii*, *Corynebacterium glutamicum*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Emericella nidulans*, *Endomyces* sp., *Endomycopsis fibuligera*, *Fusarium venenatum*, *Haloarcula marismortui*, *Hormoconis resinae*, *Humicola grisea*, *Humicola lanuginosa*, *Hypocrea lixii*,
 20 *Kluyveromyces lactis*, *Lentinula edodes*, *Lipomyces kononenkoae*, *Magnaporthe grisea*, *Mesorhizobium loti*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis*, *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Monascus rubiginosus*, *Monascus* sp., *Mucor rouxianus*, *Mycobacterium bovis*,
 25 *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Myrothecium* sp., *Neurospora crassa*, *Nostoc punctiforme*, *Oryza sativa*, *Paecilomyces variotii*, *Penaeus japonicus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxalicum*, *Picrophilus torridus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia*



- eutropha*, *Ralstonia metallidurans*, *Rana japonica*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Shewanella oneidensis*, *Sphingomonas aromaticivorans*, *Streptomyces coelicolor*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Talaromyces emersonii*, *Termitomyces clypeatus*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Thermoascus crustaceus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoproteus tenax*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* e *Trichosporon adeninovorans*.

IVb) Triagem por meio do teste de frasco agitado e subsequente ensaio de atividade enzimática

- 15 Uma variedade de microorganismos é estudada para a atividade de glicoamilase em um teste de frasco agitado. Um meio que é adequado para este propósito é qualquer meio convencional que é apropriado para o crescimento do organismo e acarreta a expressão de uma glicoamilase. Meios adequados estão comercialmente disponíveis ou podem ser preparados seguindo protocolos publicados (por exemplo como descritos em catálogos da American Type Culture Collection).

- 20 Por exemplo, uma mistura de oligômeros de glicose com diferentes comprimentos de cadeia pode ser empregada como a podem ser empregados como a única carga de alimentação de carbono em um meio definido. Visto que não ocorre hidrólise térmica dos oligossacarídeos sob as condições de fermentação, apenas as cepas com uma atividade de glicoamilase e/ou maltase são capazes de crescer neste meio. Um exemplo de um substrato adequado é Maldex 150 (Amylum Group). A triagem é realizada sob várias condições de fermentação (pH, temperatura).



Com o objetivo de distinguir entre atividade de glicoamilase e de maltase, a composição de oligossacarídeo da mistura é analisada antes do experimento, por exemplo usando HPLC. Assim, por exemplo, Maldex 150 possui a seguinte composição (veja Tabela 2):

5 Tabela 2: Composição de Maldex 150 (Amylum Group)

Grau de PO	[%]
DP1	1,1
DP2	4,0
DP3	7,4
DP4	5,0
DP5	4,8
DP6	8,4
DP7	9,6
DP8	4,6
DP9	3,5
>DP9	51,6

Um meio de controle com maltose e glicose é composto de acordo com esta análise. Crescimento e produção de lisina no meio de oligossacarídeo que ultrapassaram os valores deste controle podem ser então claramente atribuídos a uma atividade de glicoamilase.

10 Uma alternativa a uma mistura de maltodextrina que pode ser empregada como carga de alimentação de carbono para uma triagem seria maltotetraose, maltopentaose puras e semelhantes.

Após o cultivo ter sido interrompido, a biomassa é centrifugada e o sobrenadante é filtrado.

15 O sobrenadante límpido é empregado em um ensaio de atividade de glicoamilase (CHEN et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **51**, 175-181 (2005)). Para este fim, uma mistura reacional de 0,2 mL de tampão acetato / acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) e 0,5% de amido solúvel e 0,2 mL de sobrenadante é empregada para este propósito. A reação é interrompida após
20 um tempo de reação de 10 minutos a 60°C por fervura por 10 minutos a 100°C. A quantidade de glicose liberada é determinada com o auxílio do método de glicose oxidase/peroxidase (Bergmayer e Bernt, 1974). Neste contexto, uma unidade de atividade de glicoamilase é definida como a



quantidade de enzima que libera 1 μmol de glicose por minuto de amido solúvel sob as condições de reação prevalecentes.

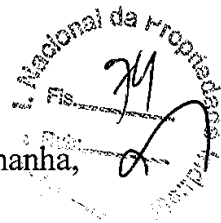
IVc) Triagem com o auxílio de iniciadores/sondas

Um método alternativo para testar o organismo a ser estudado para seqüências codificadoras de glicoamilase é uma triagem com o auxílio de iniciadores ou sondas que são específicos para estas seqüências

i) Partindo das regiões conservadas de genes de glicoamilase conhecidos, uma sonda é construída para identificação e clonagem, de vários organismos, as seqüências de DNA que codificam os polipeptídeos com atividade de glicoamilase. Tais sondas podem ser exploradas em particular para hibridização com o cDNA ou DNA genômico do organismo desejado, seguido por um Southern blot realizado pelo método padrão com o objetivo de identificar o gene desejado.

O trabalhador experiente encontrará instruções para a identificação de seqüências de DNA por meio de hibridização no livro-texto “The DIG System Users Guide for Filter Hybridization” de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemanha, 1993) e em Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260), inter alia.

ii) Partindo de regiões conservadas de genes de glicoamilase conhecidos, iniciadores de PCR são sintetizados. Estes iniciadores são empregados em uma reação PCR com o DNA do organismo a ser estudado. Se sítios de ligação adequados para os iniciadores, i.e. genes codificadores de glicoamilase, estão presentes, os oligonucleotídeos amplificados correspondentes podem ser identificados com o auxílio de eletroforese em gel que é subsequente realizada. O trabalhador experiente encontrará instruções para a amplificação de seqüências de DNA com o auxílio da reação em cadeia de polimerase (PCR) no livro-texto de Gait: “Oligonucleotide synthesis: a practical approach” (IRL Press, Oxford, UK, 1984) e em Newton e



Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemanha, 1994), inter alia.

Exemplo 1

5 Hidrolisado de farinha de milho liquefeito foi empregado em experimentos em frasco agitado usando *Corynebacterium glutamicum*.

I) Liquefação

10 360 g de água deionizada foram introduzidos em um vaso de reação. 240 g de farinha de milho foram lentamente adicionados na água, com agitação constante. Após o pH ter sido trazido para 5,8 com solução aquosa de NaOH de concentração de 50%, 4, 0 mL (= 2% em peso de enzima/matéria seca) de Liquozyme SC (de Novozymes A/S) foram adicionados. A mistura foi então rapidamente aquecida para 85°C. Durante este processo, o pH foi checado constantemente e, se apropriado, ajustado.

15 Após a temperatura final ter sido alcançada, mais farinha foi adicionada, inicialmente 50 g de farinha. Durante a adição, a temperatura foi mantida constante em 85°C. Pelo menos 10 minutos foram permitidos passarem com o objetivo de garantir uma reação completa antes que uma outra porção (50 g) de farinha é adicionada. Após a adição das duas porções, 1,67 mL de Liquozyme foram adicionados; depois, duas outras porções (em
20 cada caso 50 g) de farinha foram adicionados. O teor de matéria seca de 55% em peso foi obtido. Após a adição, a temperatura foi elevada para 100°C, a mistura foi fervida por 10 minutos.

Uma amostra foi tirada e esfriada para a temperatura ambiente. Após a amostra ter sido diluída com água deionizada (aproximadamente
25 1:10), uma gota de solução de Lugol (mistura de 5 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio por litro) foi adicionada. uma coloração azul intensa indica que amido residual está presente; uma coloração marrom é observada quando todo o amido tem sido hidrolisado. Quando a mistura foi testada negativa para amido, ela foi filtrada para dentro de recipientes estéreis enquanto quente em,



após esfriamento, foi armazenada a 4°C.

II) Fermentação com *Corynebacterium glutamicum*

Cepa

Foi usado o tipo selvagem modificado com aspartocinase de retro-alimentação-desregulada ATCC13032 lysCfbr.

Preparação de inóculo

As células foram riscadas sobre ágar estéril CM+CaAC (composição: veja Tabela 3; 20 min a 121°C) e então incubadas durante a noite a 30°C. Depois, as células foram raspadas das placas e ressuspensas em solução salina. 25 mL do meio (veja Tabela 4) em frascos Erlenmeyer de 250 mL equipados com dois defletores foram inoculados em cada caso com uma tal quantidade de suspensão celular resultante que a densidade óptica alcançou um valor de OD₆₁₀ de 0,5 a 610 nm.

Tabela 3: Composição das placas de ágar CM+CaAc

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

15 Preparação do licor de fermentação

A composição do meio do frasco é mostrada em Tabela 4. O experimento foi repetido três vezes.

Tabela 4: Meio do frasco

Hidrolisado de farinha de milho	180 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	g/L
Uréia	5	g/L
KH ₂ PO ₄	0,113	g/L
K ₂ HPO ₄	0,138	g/L
ACES	52	g/L
MOPS	21	g/L
Ácido cítrico x H ₂ O	0,49	g/L
Ácido 3,4-di-hidróxi-benzóico	3,08	mg/L
NaCl	2,5	g/L

Hidrolisado de farinha de milho	180 g/L	
KCl	1	g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3	g/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	25	mg/L
MnSO ₄ x 4 - 6 H ₂ O	5	mg/L
ZnCl ₂	10	mg/L
CaCl ₂	20	mg/L
H ₃ BO ₃	150	µg/L
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	100	µg/L
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	100	µg/L
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	100	µg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25	µg/L
Biotina (vit. H)	1050	µg/L
Tiamina x HCl (vit B ₁)	2100	µg/L
Nicotinamida	2,5	mg/L
Ácido pantotênico	125	mg/L
Cianocobalamina (vit B ₁₂)	1	µg/L
Ácido 4-amino-benzóico (PABA; vit. H ₁)	600	µg/L
Ácido fólico	1,1	µg/L
Piridoxina (vit. B ₆)	30	µg/L
Riboflavina (vit. B ₂)	90	µg/L
CSL	40	mL/L
pH*	6,85	

* ajustado com solução aquosa diluída de NaOH

Após a inoculação, os frascos foram incubados por 3 dias a 30°C e com agitação (200 rpm) em um agitador umidificado. Após o término da fermentação, o teor de lisina foi determinado por HPLC. As análises por HPLC foram realizadas com um sistema Agilent 1100 series LC. A concentração de aminoácido foi determinada por meio de cromatografia líquida de pressão alta em um Agilent 1100 series LC System HPLC. Derivação de pré-coluna com orto-ftalaldeído permite a quantificação dos aminoácidos formados; a mistura de aminoácido é separada usando uma coluna Agilent Hypersil AA.

10

Os resultados são compilados em Tabela 5.

Tabela 5: Produção de Lisina (meios)

Tempo de fermentação	Lisina [g/L]
45 h	11,5
70 h	12,8
Controle (45 h)	11,1

Exemplo 2

Hidrolisado de farinha de milho liquefeito foi empregado em experimentos de frasco agitado usando *Aspergillus niger*.

I) Liquefação

5 A liquefação foi realizada como descrito in exemplo 1 em I).

II) Fermentação com *Aspergillus niger*

Cepa

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

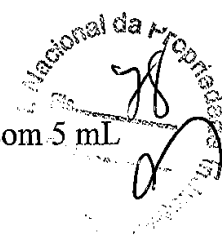
Preparação de inóculo

15 20 mL de meio de pré-cultura (veja Tabela 6) em frascos Erlenmeyer de 100 mL equipados com um defletor são cada um inoculados com 100 µl de uma cultura congelada e incubados por 24 horas a 34°C em um agitador umidificado, com agitação (170 rpm).

Tabela 6: Composição de meio de pré-cultura

Constituinte	Concentração
Glicose	30,0 g/L
Peptona de caseína	10,0 g/L
Extrato de Levedo	5,0 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/L
ZnCl ₂	30 mg/L
CaCl ₂	20 mg/L
MnSO ₄ x 1 H ₂ O	9 mg/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3 mg/L
Tween 80	3,0 g/L
Penicilina	50000 IU/l
Estreptomicina	50 mg/L
pH*	5,5

* ajustado usando ácido sulfúrico diluído



Erlenmeyer de 250 mL equipados com um defletor são inoculados com 5 mL de pré-cultura.

Preparação do licor de fermentação

- 5 A composição do meio é mostrada em Tabela 7. Foram configurados dois frascos para cada amostra.

Tabela 7: Meio do frasco

Hidrolisado de farinha de milho	200 g/L
Peptona de caseína	25,0 g/L
Extrato de Levedo	12,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
K ₂ SO ₄	2,0 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/L
ZnCl ₂	30 mg/L
CaCl ₂	20 mg/L
MnSO ₄ x 1 H ₂ O	9 mg/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3 mg/L
Penicilina	50000 IU/l
Estreptomicina	50 mg/L
pH*	5,6

* a ser ajustado com ácido sulfúrico diluído

- Após a inoculação, os frascos foram incubados por 6 dias a 34°C em um agitador umidificado, com agitação (170 rpm). Após o término da fermentação, a atividade de fitase foi determinada em um nível de
- 10 atividade de fitase adequado (padrão: 0,6 U/mL) em tampão de ácido acético / acetato de sódio 250 mM / Tween 20 (0,1% em peso), pH 5,5, usando ácido fítico como o substrato. O ensaio foi padronizado para uso em placas de microtítulo (MTPs). 10 µl de solução de enzima foram misturados com 140 µL de solução de fitato 6,49 mM em tampão acetato de sódio 250 mM, pH
- 15 5,5 (fitato: sal de dodecassódio de ácido fítico). Após incubação por uma hora a 37°C, a reação foi interrompida pela adição de um volume igual (150 µl) de ácido tricloroacético. Uma alíquota desta mistura (20 µL) foi transferida para dentro de 280 µL de uma solução compreendendo H₂SO₄ 0,32 N, 0,27% em peso de molibdato de amônio e 1,08% em peso de ácido ascórbico. Isto foi
- 20 seguido pela incubação por 25 minutos a 50°C. A absorção da solução azul foi medida a 820 nm. Os resultados são compilados em Tabela 8.

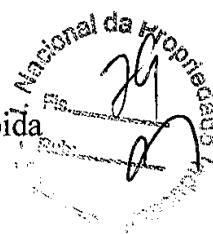


Tabela 8: Atividade de fitase após a fermentação foi interrompida

Frasco	Atividade de Fitase [FTU/mL]
1	569
2	696
Controle	393



REIVINDICAÇÕES

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

- a1) moer uma carga de alimentação de amido, assim obtendo uma massa moída base que compreende pelo menos dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido;
- a2) suspender a massa moída base em um líquido aquoso e liquefazer a massa moída base presente no líquido aquoso na presença de pelo menos uma enzima liquefatora de amido, obtendo um meio aquoso contendo dextrina (1) que compreende pelo menos uma parte dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido; e
- b) usar o meio aquoso contendo dextrina (1) em uma fermentação para cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico;

enzimas que hidrolisam as dextrinas a monossacarídeos sendo adicionadas em uma quantidade de menor do que 0,001% em peso baseado no peso total da carga de alimentação de amido empregada, ou não são adicionadas.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a suspensão da massa moída base no líquido aquoso é aquecida para uma temperatura acima da temperatura de gelatinização do amido presente na carga de alimentação de amido.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o aquecimento é realizado na presença de enzima liquefatora de amido.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações



precedentes, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma porção da massa moída base é adicionada continuamente ou em batelada no líquido aquoso durante a liquefação etapa.

5 5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a massa moída base é suspensa em uma tal quantidade no líquido aquoso e liquefeita no mesmo que o meio aquoso contendo dextrina (1) resultante possui um teor de matéria seca de pelo menos 50% em peso baseado no peso total do meio (1).

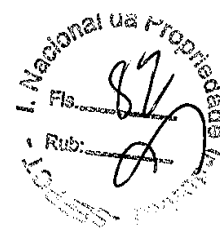
10 6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a massa moída base é suspensa em uma tal quantidade no meio líquido aquoso e liquefeita no mesmo que o meio aquoso contendo dextrina (1) resultante possui uma concentração equivalente de glicose de pelo menos 40% em peso baseado no peso total do meio (1).

15 7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre microorganismos que produzem enzimas que hidrolisam dextrinas a monossacarídeos.

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

- b1) cultivar, em um meio de fermentação aquoso (2), o microorganismo que é capaz de superproduzir o composto orgânico; e
 - b2) adicionar o meio contendo dextrina (1) no meio de fermentação (2) no qual as dextrinas presentes no meio (1) são metabolizadas pelos
- 25 microorganismos que superproduz o composto orgânico.

9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o meio de fermentação (2) em etapa b1) compreende essencialmente o meio (1), os microorganismos que são capazes de superproduzir o composto orgânico, constituintes de meio convencionais e, se



apropriado, água para diluição.

10. Processo de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que, em etapa b1), uma tal quantidade do meio (1) é usada para compor o meio de fermentação (2) que a concentração de açúcar total no meio de fermentação (2) está dentro da faixa de 6 a 30% em peso, calculada como equivalentes de glicose e baseado no peso total do meio de fermentação (2).

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os grãos de cereais são usados como carga de alimentação de amido em etapa a1).

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a massa moída base compreende pelo menos 20% em peso de todos os constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido.

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

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



15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o microorganismo empregado para a fermentação é selecionado dentre microorganismos naturais ou recombinantes que superproduzem pelo menos um dos seguintes metabólitos:

5 enzimas, aminoácidos, vitaminas, dissacarídeos, ácidos mono-, di- e tricarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C, álcoois possuindo 4 a 10 átomos de C, alcanodióis possuindo 3 a 8 átomos de C e poli(hidróxi-alcanoatos).

10 16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre aqueles que superproduzem um ou mais aminoácidos.

15 17. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre aqueles que superproduzem um ou mais ácidos mono-, di- e tricarboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C.

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

20 19. Processo de acordo com a reivindicação 15 ou 18, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre aqueles que superproduzem uma fitase.

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

21. Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado de cepas do gênero



Corynebacterium.

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

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que pelo menos alguns dos constituintes voláteis do licor de fermentação são removidos sem prévio isolamento ou depleção de um metabólito microbiano não-volátil e, se apropriado, sem prévia remoção de constituintes sólidos, sendo obtida uma formulação sólida de um metabólito microbiano não-volátil.



RESUMO

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

A invenção refere-se a um método para produzir por fermentação pelo menos um composto orgânico contendo pelo menos 3 átomos de C ou pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N. O citado método compreende as etapas de a1) uma carga de alimentação de amido é moída com o objetivo de obter um material de moagem que contém pelo menos uma parte de componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido, 2a) material de moagem é suspenso em um líquido aquoso e o citado material de moagem contido no líquido aquoso é liquefeito na presença de pelo menos uma enzima que liquefaz amido, uma substância aquosa que contém dextrina (1), que contém pelo menos uma parte dos componentes sólidos contendo não-amido da carga de alimentação de amido, é obtida; e b) a substância aquosa que contém dextrina (1) é usada na fermentação para cultivar um microorganismo que é capaz de superproduzir os compostos orgânicos; enzimas, que hidrolisam a dextrina a monossacarídeos, são não adicionadas ou são adicionadas em uma quantidade menor do que 0,001% em peso, em relação ao peso total da carga de alimentação de amido usada.