



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

(21) **PI 0619017-0 A2**

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



(51) *Int.Cl.:*
C12P 13/02
C12P 13/08

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

(30) **Prioridade Unionista:** 28/11/2005 DE 10 2005 056 668.5

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

(72) **Inventor(es):** Markus Lohscheidt, Markus Pompejus, Matthias Boy, Oskar Zelder, Stephan Freyer

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2006068926 de 27/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/060233de 31/05/2007

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE PELO MENOS UM COMPOSTO ORGÂNICO. A invenção refere-se a um método para produzir por fermentação pelo menos um tipo de composto orgânico contendo pelo menos 3 átomos de C ou pelo menos dois átomos de C e pelo menos um átomo de N consistindo de a1) na moagem de uma carga de alimentação de amido para obter um produto moído contendo pelo menos uma parte de componentes sólidos destituídos de amido da carga de alimentação de amido, 2a) na moagem de material moído em um fluido aquoso e na hidrólise por liquefação enzimática da parte de amido da carga de alimentação de amido e eventualmente subsequente sacarificação, obtendo deste modo um primeiro líquido contendo mono- e oligossacarídeo (1), b) na adição, sob condições de fermentação, do líquido contendo mono- e oligossacarídeo (1) junto com monossacarídeos, dissacarídeos e/ou oligossacarídeos metabolizáveis ou com composição contendo monossacarídeos, dissacarídeos e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso que está praticamente destituída de sólidos insolúveis em água, em um meio de fermentação contendo um microorganismo que permite que um composto orgânico seja sobreproduzido.

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

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

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

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

substancialmente puro na fermentação.

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

Cargas de alimentação de amido não processadas, em contraste, são conhecidamente aplicadas em uma grande escala na produção fermentativa de bioetanol. Aqui, as cargas de alimentação de amido, normalmente grãos de cereais integrais, são primeiro submetidas à moagem seca, e o constituinte amido da carga de alimentação de amido é subsequente hidrolisado usando enzimas. Aqui, a hidrólise pode ser realizada em batelada, por exemplo em vasos agitados, se não continuamente, por exemplo em refervedores a jato. Descrições de processos adequados podem ser encontradas por exemplo em "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Jaques et al. (Ed.), Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735, Chapter 2, pp. 7 to 23, e em McAloon et al., "Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks", NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory, Outubro 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 em até o ponto que concentrações maiores não podem ser convertidas de qualquer maneira em um modo significativo como o resultado da toxicidade dos produtos para as leveduras empregadas
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 e secundariamente o rendimento de espaço-tempo diminui. Estas considerações são de importância em particular no caso onde um hidrolisado de amido que é
25 produzido para uma produção de bioetanol em volume grande e que tradicionalmente possui concentrações baixas de açúcar ou de glicose de até aproximadamente 30 ou 33% em peso é intencionado para ser alimentado em parte em uma fermentação secundária de volume menor para a produção de outros compostos químicos.

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

5 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 2001/275693 descreve um método para a produção fermentativa de
10 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, partes da massa moída base, incluindo
15 constituintes contendo não-amido, são removidas antes de o amido presente ser liquefeito / sacarificado e subsequente fermentado. Neste processo, concentrações de açúcar moderadas são obtidas. Um processo similar é descrito JP 2001/309751 para a produção de um aditivo de alimento contendo aminoácido.

20 Concentrações de açúcar aumentadas no meio líquido empregado para a fermentação podem ser alcançadas pelo uso de uma massa moída base, para a sacarificação, que largamente compreende o constituinte sólido não-amiláceo da carga de alimentação de amido, pelo processo descrito em WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) da companhia requerente.
25 Surpreendentemente, tem emergido que os constituintes sólidos não-amiláceos que estão presentes na carga de alimentação de amido não necessitam ser removidos antes da fermentação. Um processo similar usando carga de alimentação de amido selecionada dentre grãos de cereais é descrito em PCT/EP2006/066057 (pedido de patente inicial DE 102005042541.0) da

companhia requerente. Em alguns casos, foi observada multiplicação inibida ou retardada dos microorganismos.

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. 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, agora tem sido verificado que os problemas acima da arte anterior podem ser suplantados primeiro pela preparação de um primeiro meio líquido contendo açúcar (1) por moagem, liquefação e sacarificação de carga de alimentação de amidos sem remoção prévia dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido e provisão de uma fermentação com este meio junto com mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis ou junto com uma composição que compreende mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que está essencialmente livre de sólidos que são insolúveis em água.

A invenção assim proporciona um processo para a produção fermentativa de pelo menos um composto orgânico possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos um 1 átomo de N, compreendendo 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 hidrolisar a porção amilácea da massa moída base por liquefação enzimática

e, se apropriada, subsequente sacarificação, por meio do qual um primeiro líquido (1) que compreende mono- ou oligossacarídeos é obtido; e

b) adicionar o líquido (1) que compreende mono- ou oligossacarídeos junto com mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis ou
5 junto com uma composição que compreende mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que está essencialmente livre de sólidos que são insolúveis em água em um meio de fermentação compreendendo um microorganismo que é capaz de reproduzir o composto orgânico sob condições de fermentação.

10 Uso do líquido (1) que compreende mono- ou oligossacarídeos, que tem sido obtido por hidrólise enzimática, resulta em custos marcadamente reduzidos na produção fermentativa dos compostos orgânicos. A adição paralela de açúcares metabolizáveis (i.e. os mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis) na forma concentrada adicionalmente evita
15 qualquer diluição indesejada do licor de fermentação. Além disso, problemas de viscosidade que podem ocorrer sob liquefação da carga de alimentação de amido em concentrações de massa moída base mais altas podem ser evitados como o resultado do processo de acordo com a invenção. Ademais, problemas com a multiplicação do microorganismo podem ser evitados nesta maneira.

20 Quando é feita referência ao líquido (1) que compreende mono- ou oligossacarídeos, os termos "líquido (1)" e "meio líquido (1)" serão usados sinonimamente aqui e aqui abaixo.

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

de amido é preferivelmente selecionada dentre cereal, especialmente preferivelmente dentre milho, centeio, triticales 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 meio líquido (1), 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 anular, moinhos oscilatórios ou moinhos planetários. Em princípio, outros

15 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 conteúdo de matéria seca está dentro da faixa de 10 a 20% em peso.

20 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 de 100 a 630 μm em uma quantidade de 30 a 100% em peso, preferivelmente

25 40 a 95% em peso e especialmente preferivelmente 50 a 90% em peso. Preferivelmente, a massa moída base obtida compreende 50% em peso de partículas de farinha com um tamanho de partícula de maior do que 100 μm . Como uma regra, pelo menos 95% em peso das partículas de farinha moídas possuem um tamanho de partícula menor do que 2 mm. Neste contexto, o

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 aplicada. Embora, durante o processo de moagem, farinha ultra-fina, pura, por exemplo do interior do grão de cereal, é inicialmente obtida, com moagem adicional, i.e. com o aumento da taxa de extração a quantidade de conteúdo de casca e fibra bruta na farinha aumenta e o conteúdo 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 conteúdo 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 conteúdo de amido dos grãos de cereais; no caso de uma taxa de extração maior, as farinhas de cereais também compreendem a camada de aleurona contendo

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

- De acordo com a invenção, a massa moída base usada para a preparação do meio líquido (1) compreende pelo menos algum, preferivelmente pelo menos 20% em peso, em particular pelo menos 50% em peso, especificamente pelo menos 90% em peso e muito especificamente pelo menos 99% em peso de constituintes sólidos não-amiláceos que estão presentes nos grãos de cereais moídos, correspondendo à taxa de extração.
- Baseado nos constituintes amiláceos da massa moída base (e portanto na quantidade de mono-, di- ou oligossacarídeo no meio líquido (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 dentro da faixa de 20 a 60% em peso.

A hidrólise enzimática da massa moída base de acordo com a etapa a2) pode ser realizada por métodos costumeiros para o trabalhador experiente, por exemplo seguindo os métodos descritos em "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Chapter 2, p. 7 to 23, que tem sido citado no início.

Para este fim, para este fim a massa moída base será primeiro misturada com um líquido aquoso, por exemplo água fresca, água de processo recirculada, por exemplo de fermentação subsequente, ou com uma mistura de líquidos, dando uma suspensão aquosa. Este procedimento é frequentemente

também referido como transformação em massa fluida.

Como uma regra, as quantidades de massa moída base e de líquido aquoso são escolhidas de tal modo que a hidrólise dá um meio líquido aquoso (1) no qual a concentração de mono-, di- e/ou oligossacarídeo está dentro da faixa de 100 a 750 g/kg, preferivelmente dentro da faixa de 150 a 700 g/kg e em particular dentro da faixa de 200 a 650 g/kg. Conseqüentemente, a massa moída base é tipicamente empregada em uma quantidade de 150 a 800 g/kg, freqüentemente dentro da faixa de 200 a 750 g/kg e em particular dentro da faixa de 250 a 700 g/kg, baseado no peso da suspensão (massa fluida).

Em uma modalidade preferida da invenção, as quantidades de massa moída base e de líquido aquoso são escolhida de modo que a hidrólise dá um meio líquido aquoso (1) no qual a concentração de mono-, di- e/ou oligossacarídeo está dentro da faixa de 100 a 400 g/kg, preferivelmente dentro da faixa de 150 a 350 g/kg e em particular dentro da faixa de 200 a 300 g/kg. Conseqüentemente, a massa moída base é tipicamente empregada em uma quantidade de 150 a 550 g/kg, freqüentemente dentro da faixa de 200 a 500 g/kg e em particular dentro da faixa de 250 a 450 g/kg, baseado no peso da suspensão (massa fluida). Em princípio, também é possível empregar quantidades maiores de massa moída base com o objetivo de alcançar concentrações mais altas de mono-, di- e/ou oligossacarídeo, por exemplo concentrações de acima de 400 g/kg a 700 g/kg, em particular dentro da faixa de 450 a 650 g/kg ou 500 g/kg a 650 g/kg.

Para a hidrólise enzimática da porção amilácea da massa moída base, a massa moída base será, como uma regra, primeiro liquefeita na presença de uma enzima liquidificadora de amido, como uma regra uma α -amilase. Outras enzimas que são ativas sob as condições de reação e amido estável liquefeito também podem ser empregadas.

Para liquefazer o amido presente na massa moída base, é

possível, em princípio, empregar todas as enzimas liquidificadoras, em particular α -amilases (classe de enzima EC 3.2.1.1), por exemplo α -amilase que têm sido obtidas de *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus staerothermophilus*, 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, por exemplo de Novozymes sob o nome comercial Termamyl 120 L, type 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 meio líquido que compreende a porção amilácea liquefeita da massa moída base, tipicamente oligossacarídeos com, como uma regra, 3 a 18, em particular 6 a 12, unidades de monossacarídeo, em particular unidades de glicose, 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 liquidificadora de amido e de massa moída base serão escolhidas vantajosamente em uma tal maneira que a viscosidade durante o processo de geleificação 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 geleificação é preferivelmente não maior do que 20 Pas, especialmente preferivelmente não maior do que 15 Pas e muito especialmente preferivelmente não maior do que 8 Pas. Como uma regra, a viscosidade é medida usando um Haake Viskosimeter 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 liquidificadora 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 geleificação, 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, capítulo 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, em particular 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 geleificação. Nestas temperaturas, a estrutura granular do amido é destruída (geleificação), tornando possível a degradação enzimática do último.

Para as α -amilases (ou a enzima liquidificadora de amido usada) serem otimamente efetivas, etapa a2) é preferivelmente realizada pelo menos por algum tempo no pH ótimo da enzima liquidificadora, freqüentemente em um pH na faixa fracamente ácida, preferivelmente entre 4,0 e 7,0, especialmente 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 solução aquosa diluída de hidróxido de metal alcalino tal 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, mas antes da ocorrência de qualquer sacarificação. 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 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 maior do que 60% em peso, em particular não maior do que 50% em peso e especialmente preferivelmente não maior 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.

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 maior do que

50% em peso e especialmente preferivelmente não maior do que 45% em peso, 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
5 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 em etapa a2) é realizada em uma tal maneira que a viscosidade do meio líquido seja não maior do que 20 Pas, preferivelmente não maior do que 15
10 Pas e especialmente preferivelmente não maior 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 geleificação do
15 amido presente na massa moída base. Além disso, o controle da viscosidade pode ser adicionalmente influenciado pela adição de pelo menos uma enzima liquidificadora de amido, preferivelmente uma α -amilase, e/ou de pelo menos uma enzima de sacarificação, preferivelmente uma glicoamilase, em porções das mesmas.

20 Para realizar o método de acordo com a invenção, é possível 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.

25 Então, a pelo menos uma enzima liquidificadora 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, em particular 20 a 65% em peso,

baseado em todas as α -amilases empregadas 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 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.

10

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.

15

A suspensão assim preparada é então aquecida, preferivelmente em uma temperatura acima da temperatura de geleificação 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 preferivelmente estando pelo menos 5 K, em particular 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 geleificação (temperatura de geleificação). 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 gradualmente na suspensão contendo amido. É preferido adicionar a porção da massa moída base a ser adicionada no curso 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

25

base que não tem sido empregada para preparar a suspensão pode ser adicionada continuamente durante a etapa de liquefação nesta modalidade. Durante a adição, a temperatura deve vantajosamente ser mantida acima da temperatura de geleificação do amido.

5 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 geleificação do amido, i.e. cozida. Então, como uma regra, a mistura reacional
10 é esfriada para uma temperatura ligeiramente mais baixa, mas preferivelmente acima da temperatura de geleificação, 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 -
15 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.

20 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 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
25 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.

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 geleificação do amido

presente na carga de alimentação de amido ou na massa moída base por meio 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 geleificação 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 geleificação.

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 ajustável tipicamente possui uma geometria cônica que se afila na direção de fluxo do vapor. Uma agulha, ou um cone que está arranjado sobre um bastão longitudinalmente deslocável, está arranjado dentro deste bocal. Agulha, ou cone, junto com o cone do bocal, forma uma abertura. Pelo deslocamento da agulha, ou do bastão, longitudinalmente, o tamanho da abertura, e assim a área da seção transversal da extremidade do bocal pode ser ajustada em uma maneira simples, pelo qual a velocidade na qual vapor é fornecido pode ser controlada em uma maneira simples.

Estes dispositivos também são tipicamente equipados com um tubo de mistura para dentro do qual a suspensão é transportada após o vapor ter sido fornecido e no qual a suspensão deixa o dispositivo. Este tubo de mistura está normalmente arranjado ao longo do fornecimento de vapor e perpendicular a alimentação. O tubo de mistura e o bocal juntos tipicamente formam uma abertura através da qual a suspensão é transportada. Como o resultado desta abertura, forças cisalhantes adicionais atuam sobre a suspensão durante o processo de transporte e assim aumentam o fornecimento de energia mecânica para a suspensão. O tubo de mistura pode ser arranjado em uma tal maneira que é longitudinalmente deslocável. Deslocamento do tubo de mistura é um modo simples de ajustar o tamanho da abertura e assim da queda de pressão dentro do dispositivo.

Tais dispositivos são conhecidos da arte anterior sob o nome referedor a jato comercial, por exemplo o dispositivo que é mostrado em

"The Alcohol Textbook", capítulo 2, loc. cit., Figure 13, e comercialmente disponível, por exemplo sob o nome comercial HYDROHEATER® de Hydro Thermal Corp. Waukesha WI, USA.

Quando a reação é realizada continuamente, a suspensão
5 tratada com vapor é, como uma regra, subseqüentemente transferida para dentro de uma zona de pós-reação com o propósito de continuar a geleificação 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
10 tipicamente dentro da faixa de 90 a 150°C. O tempo de residência nesta zona de pós-reação pode estar dentro da faixa de 1 minuto a 4 horas, dependendo da temperatura da suspensão. As zonas de pós-reação tipicamente possuem uma geometria tubular ou colunar. Em uma modalidade, a zona de pós-reação possui a geometria de uma coluna verticalmente arranjada. Aqui, a suspensão,
15 uma vez tendo deixado o dispositivo de tratamento com vapor, é aplicada na zona superior da coluna e removida na zona inferior. Em outra modalidade da invenção, a zona de pós-reação possui uma geometria tubular.

Após a suspensão ter deixado a zona de pós-reação, a pressão é liberada, como uma regra, e uma liquefação é subseqüentemente realizada.
20 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.

25 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 liquidificadora de amido é adicionada na suspensão da massa moída base no líquido aquoso antes do processo de aquecimento com vapor. Nesta maneira, o processo de liquefação já ocorre enquanto a mistura é

aquecida para temperaturas de acima da temperatura de geleificação. Aquecimento com vapor, e a fase de pós-reação, são realizados apropriadamente. Uma etapa de liquefação subsequente em um vaso de reação separado pode ser eliminada. Contudo, uma tal etapa de liquefação
5 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
10 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
15 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
20 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.

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

Após a liquefação de amido ter terminado, as dextrinas presentes no meio líquido podem ser sacarificadas, i.e. degradadas em glicose, quer continuamente quer em batelada, em uma maneira per se conhecida. O meio liquefeito pode ser sacarificado totalmente em um tanque de
5
sacarificação específico antes de ser empregado em, por exemplo, uma etapa de fermentação subsequente.

Em uma primeira modalidade da invenção, apenas uma sacarificação parcial é realizada antes da fermentação subsequente. Por exemplo, um procedimento pode ser seguido no qual um pouco das dextrinas
10
presentes no meio líquido, por exemplo na faixa de 10 a 90% em peso e em particular dentro da faixa de 20 a 80% em peso, baseado no peso total das dextrinas (ou do amido original) é sacarificado e o meio líquido contendo açúcar resultante é empregado na fermentação. Uma sacarificação adicional
15
pode ser então efetuada in situ no meio de fermentação. Além disso, a sacarificação pode ser realizada diretamente no fermentador (in situ), dispensando com um tanque de sacarificação separado.

Vantagens da sacarificação in situ, i.e. da sacarificação que é realizada em parte ou totalmente no fermentador, são em primeiro lugar um gasto de investimento reduzido; em segundo lugar, uma liberação retardada
20
da glicose pode, se apropriado, permitir inicialmente que ocorra a introdução de uma concentração de glicose mais alta na batelada sem inibição ou mudanças metabólicas nos microorganismos empregados. Em *E. coli*, por exemplo, uma concentração de glicose indevidamente alta acarreta a formação de ácidos orgânicos (acetato), enquanto que *Saccharomyces*
25
cerevisae em um tal caso muda para fermentação, a despeito da presença de oxigênio suficiente em fermentadores aerados (Efeito de Crabtree). Uma liberação retardada de glicose pode ser ajustada pelo controle da concentração de glicoamilase. Isto torna possível suprimir os efeitos acima mencionados, e mais substrato pode ser introduzido inicialmente de modo que diluição, que é

o resultado da corrente de alimentação fornecida, pode ser reduzida.

A sacarificação das dextrinas (i.e. oligossacarídeos) na solução de amido liquefeito é realizada enzimaticamente, i.e. com o auxílio de pelo menos uma enzima de sacarificação de dextrina. Enzimas que podem ser usadas para este propósito são, em princípio, todas as glicoamilases (classe de enzima EC 3.2.1.3), em particular glicoamilases obtidas de *Aspergillus* e especificamente aquelas que são usadas para sacarificar materiais obtidos pelos métodos de moagem seca em conexão com a produção de bioetanol. As glicoamilases que são adequadas para a sacarificação também estão comercialmente disponíveis, por exemplo de Novozymes sob o nome comercial Dextrozime GA; ou de Genencor sob o nome comercial Optidex. Uma combinação de diferentes glicoamilases também pode ser usada.

De pelo menos uma enzima de sacarificação, em particular pelo menos uma glicoamilase, é adicionada no meio líquido contendo dextrina obtido após a liquefação em uma quantidade de normalmente 0,001 a 5,0% em peso, preferivelmente 0,005 a 3,0% em peso e especialmente preferivelmente 0,01 a 1,0% em peso, baseado na quantidade total da carga de alimentação de amido empregada.

Se a sacarificação é realizada no fermentador, a solução de amido liquefeito será, como uma regra, esfriada para a temperatura de fermentação, i.e. 32 a 37°C, antes de ser adicionada no fermentador. Neste caso, a glicoamilase (ou de pelo menos uma enzima de sacarificação) para a sacarificação é adicionada diretamente no licor de fermentação. A sacarificação do amido liquefeito de acordo com a etapa a2) agora ocorre em paralelo com a metabolização do açúcar pelos microorganismos.

Se a sacarificação ocorre em um tanque de sacarificação, a solução de amido liquefeito é normalmente esfriada ou aquecida para a temperatura ótima da enzima de sacarificação ou ligeiramente abaixo de, por exemplo a 50 a 70°C, preferivelmente 60 a 65°C, e subsequentemente tratada

com glicoamilase.

É vantajoso antes adicionar a enzima de sacarificação, em particular a glicoamilase, para ajustar o pH do meio líquido para um valor dentro da faixa de atividade ótima da glicoamilase empregada, preferivelmente dentro da faixa de entre 3,5 e 6,0; especialmente preferivelmente entre 4,0 e 5,5 e muito especialmente preferivelmente entre 4,0 e 5,0. Contudo, em particular quando se realiza a sacarificação diretamente no fermentador, também é possível ajustar o pH para um valor fora das faixas acima mencionadas, por exemplo na faixa de acima de 6,0 a 8,0. Isto pode ser em geral vantajoso por exemplo na produção fermentativa de lisina, pantotenato e vitamina B₂ a despeito da atividade limitada de glicoamilases padrão nesta faixa de pH e necessária como o resultado das condições de fermentação a serem ajustadas.

Em uma modalidade preferida, a sacarificação é realizada em um tanque de sacarificação específico. Para este fim, a solução de amido liquefeito é aquecida para uma temperatura que é ótima para a enzima, ou ligeiramente abaixo de abaixo de, e o pH é ajustado na maneira descrita acima para um valor que é ótimo para a enzima.

Após a adição da enzima de sacarificação, a suspensão contendo dextrina é preferivelmente aquecida na temperatura ajustada por um período de, por exemplo, de 2 a 72 horas ou mais longo, se requerido, em particular de 5 a 48 horas, durante cujo tempo as dextrinas são sacarificadas para dar monossacarídeos. O progresso do processo de sacarificação pode ser monitorado pelo trabalhador experiente usando métodos conhecidos, por exemplo HPLC, ensaios de enzima ou tiras de teste de glicose. A sacarificação tem terminado quando a concentração de monossacarídeo não mais aumenta substancialmente ou cai de novo.

Visto que, como uma regra, massa moída base que compreende pelo menos um pouco dos ou todos os constituintes da carga de

alimentação de amido é empregada para a preparação do meio líquido contendo açúcar (1) (i.e. os constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido não são removidos, ou não totalmente removidos), o meio líquido (1) obtido também compreende um pouco dos ou todos os

5 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 líquido antes de submeter o meio líquido contendo açúcar

10 em uma etapa de fermentação.

A fitase pode ser adicionada antes da, durante a ou após a liquefação ou a sacarificação, se for suficientemente estável nas respectivas temperaturas altas.

Quaisquer fitases podem ser empregadas desde que sua

15 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

20 unidades/kg de carga de alimentação de amido.

Para aumentar o rendimento de açúcar total, ou para obter aminoácidos livres, outras enzimas, por exemplo pululanases, celulasas, hemicelulasas, glicanases, xilanases, glicosidases ou proteases, podem ser adicionalmente adicionadas na mistura reacional durante a produção do meio

25 líquido contendo açúcar. A adição destas enzimas pode ter um efeito positivo sobre a viscosidade, i.e. viscosidade reduzida (por exemplo por clivagem de glicanos de cadeia longa (também referidos como de cadeia mais longa) e/ou de (arabino-)xilanos, e 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.

Dependendo de se uma sacarificação tem sido ou não realizada, a aplicação de etapas a1) e a2) aqui descritas resulta em um meio líquido que compreende dextrina ou mono- ou dissacarídeo e que possui uma
5 concentração total de mono-, di- e/ou oligossacarídeo nas faixas acima mencionadas.

Os açúcares que estão presentes no meio líquido (1) após a sacarificação são, em particular, glicose, com a presença de outros monossacarídeos tais como hexoses e pentoses diferentes de glicose, por
10 exemplo frutose, manose, galactose, sorbose, xilose, arabinose e ribose, também sendo possível. A quantidade de monossacarídeos diferentes de glicose pode depender da carga de alimentação de amido usada e dos constituintes não-amiláceos presentes na mesma e pode ser influenciada pelo
15 controle de processo, por exemplo pela degradação de constituintes de celulose pela adição de celulasas. Os monossacarídeos do meio líquido contendo açúcar preferivelmente compreendem um conteúdo de glicose de pelo menos 60% em peso, freqüentemente pelo menos 70% em peso, em particular pelo menos 80% em peso e especificamente pelo menos 85% em
20 peso, baseado na quantidade total de açúcar presente no meio líquido contendo açúcar. O conteúdo de glicose está normalmente dentro da faixa de 75 a 99,9% em peso, em particular 80 a 99% em peso e especificamente 85 a 97% em peso, baseado na quantidade total de açúcar presente no meio líquido contendo açúcar. Se sacarificação não tem sido realizada, a quantidade de
25 dextrinas nos mono-, di- e oligossacarídeos presentes no meio (1) corresponde essencialmente à quantidade de glicose.

Se sacarificação não tem sido realizada, os equivalentes de glicose metabolizáveis 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. Em um tal caso, os constituintes contendo açúcar no meio líquido (1), i.e. os mono-, di- e oligossacarídeos, tipicamente compreendem pelo menos 60% em peso, freqüentemente pelo menos 70% 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 40% em peso, freqüentemente menos do que 30% 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.

De acordo com a invenção, a fermentação subsequente é realizada usando ambos o meio líquido (1) e uma carga de alimentação de mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis (aqui abaixo também referidos como carga de alimentação de açúcar) diferente do meio líquido. Os mono-, di- e/ou oligossacarídeos usados para este propósito podem ser empregados quer como tais quer na forma de uma composição que compreende mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso, preferivelmente em uma concentração de pelo menos 60% em peso, baseado no peso total do meio, e que, em contraste ao meio líquido aquoso (1), está essencialmente livre de sólidos que são insolúveis em água.

Os mono-, di- ou oligossacarídeos presente na carga de alimentação de açúcar são preferivelmente selecionados dentre monossacarídeos, normalmente hexoses e/ou pentoses, por exemplo glicose, frutose, manose, galactose, sorbose, xilose, arabinose e ribose,

especificamente dentre glicose, frutose e galactose, e dissacarídeos tais como sacarose, maltose, lactose, especificamente sacarose. Também são adequadas as misturas de monossacarídeos e dissacarídeos, e oligossacarídeos com uma proporção alta de componentes de glicose incorporados, e misturas destes com monossacarídeos e/ou dissacarídeos.

Exemplos de composições que compreendem mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que estão essencialmente livres de sólidos que são insolúveis em água compreendem xaropes de glicose, xaropes de sacarose, sucos espessos, xaropes de maltose, xaropes de dextrina, mas também produtos residuais da produção de açúcar (melaço), em particular melaço de produção de açúcar de beterraba e melaço de produção de açúcar de cana.

Especialmente preferidas são as substâncias que compreendem predominantemente mono- e/ou dissacarídeos, em particular glicose e/ou sacarose, e misturas que compreendem glicose e/ou sacarose e oligossacarídeos com uma proporção alta de componentes de glicose incorporados, por exemplo, glicose, sacarose, xaropes de glicose, xaropes de sacarose, sucos espessos e melaço.

Como o meio líquido (1), os mono-, di- e/ou oligossacarídeos, as composições compreendendo-os, podem ser empregados não apenas para inicialmente preparar o meio de fermentação (fase em batelada), mas também para a alimentação durante a fermentação se a última é realizada na forma de uma batelada alimentada, ou semicontinuamente.

A quantidade total de mono-, di- e/ou oligossacarídeos introduzida na fermentação pela adição do meio líquido (1) preferivelmente totaliza pelo menos 40% em peso, em particular pelo menos 50% em peso, especialmente preferivelmente pelo menos 60% em peso, por exemplo 40 a 95% em peso, em particular 50 a 90% em peso e especificamente 60 a 90% em peso, da quantidade total de mono-, di- e oligossacarídeos introduzida na

fermentação.

Meio líquido (1) e os mono-, di- e/ou oligossacarídeos, ou as composições compreendendo-os, podem ser alimentados na fermentação separadamente um do outro se não juntos.

5 Em uma modalidade preferida da invenção, meio líquido (1) e os mono-, di- e/ou oligossacarídeos, ou a composição compreendendo-os, são misturados um com o outro antes de serem alimentados na fermentação. Assim, quando se emprega um meio líquido que, como uma regra, possui uma concentração total baixa de mono-, di- e oligossacarídeo de 100 a 400 g/kg, o
10 conteúdo de açúcar total do meio líquido (1) contendo açúcar que é obtido após as etapas a1) e a2) é aumentada, preferivelmente em pelo menos 50 g/kg, em particular em pelo menos 100 g/kg, especificamente em pelo menos 150 g/kg, por exemplo em 50 a 300 g/kg, em particular em 100 a 250 g/kg e especificamente em 120 a 200 g/kg, para totalizar mais do que 40% em peso,
15 preferivelmente pelo menos 45% em peso, em particular pelo menos 50% em peso e especialmente preferivelmente pelo menos 55% em peso, baseado no peso total.

Após a adição destas cargas de alimentação de açúcar no meio líquido (1), o meio líquido resultante preferivelmente possui um conteúdo de
20 matéria seca dentro da faixa de 45 a 80% em peso e especialmente preferivelmente dentro da faixa de 50 a 75% em peso ou 55 a 75% em peso, baseado no peso total. Neste contexto, é vantajoso controlar a viscosidade do meio líquido (1), por exemplo pelo ajuste da temperatura, de modo que valores máximos de 20 Pas, especialmente preferivelmente 15 Pas e muito
25 especialmente preferivelmente 8 Pas não sejam ultrapassados.

Em uma modalidade preferida da invenção, os mono- e/ou dissacarídeos são adicionados no primeiro meio líquido (1) na forma de um subproduto da produção de açúcar compreendendo glicose ou sacarose. Exemplos são os melaços que são gerados na produção de açúcar da cana-de-

açúcar ou em particular de açúcar de beterraba.

De acordo com a invenção, o meio líquido (1) que é preparado em etapas a1) e a2), e as cargas de alimentação de açúcar que diferem do mesmo, são alimentados em uma fermentação, onde servem para a cultura de microorganismos. Na fermentação, os metabólitos microbianos são produzidos pelos microorganismos.

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

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

Por exemplo, o meio líquido (1) obtido pelo método de acordo com a invenção ou uma carga de alimentação de açúcar convencional, i.e. mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis ou a composição que compreende mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que está tipicamente essencialmente livre de sólidos que são insolúveis em água, ou sua mistura, pode ser inoculada com o microorganismo desejado, se apropriado após diluição com água e adição de constituintes de meio costumeiros tais como tampões, sais nutrientes, cargas de alimentação nitrogenadas tais como sulfato de amônio, uréia e semelhantes, constituintes de meio nutriente complexo, compreendendo aminoácidos tais como extratos de levedo, peptonas, CSL e semelhantes, e este microorganismo pode ser multiplicado sob condições de fermentação até que a concentração de microorganismo alcance o estado estacionário que é desejado para a fermentação. Aqui, o açúcar presente no meio líquido (1) é metabolizado e o metabólito desejado é formado (também conhecido como processo em batelada ou fase em batelada).

Quando se realiza um processo em batelada alimentada, o processo de fermentação então será continuado pelo fornecimento de mais meio líquido (1) obtenível pelo método de acordo com a invenção e a carga de alimentação de açúcar diferente do meio líquido (1), em particular pelo fornecimento de meio líquido obtido pela misturação do meio líquido (1) com a carga de alimentação de açúcar diferente do meio líquido (1), e o metabólito que é sobreproduzido pelo microorganismo se acumula no licor de fermentação, sendo possível que o metabólito esteja presente tanto nas células do microorganismo quanto na fase aquosa do meio de fermentação.

10 A fermentação preferivelmente será realizada como um processo de batelada alimentada. Assim fazendo, um procedimento será seguido no qual o microorganismo é primeiro multiplicado usando um meio líquido contendo açúcar, por exemplo usando um meio líquido (1) ou outra carga de alimentação de açúcar, até que a concentração de microorganismo no fermentador tenha sido alcançada. Depois, o meio líquido (1) junto com a 15 outra carga de alimentação de açúcar, i.e. mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis ou um meio que compreende mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que está essencialmente livre de sólidos que são insolúveis em água, são então 20 alimentados no fermentador. Isto mantém o processo de fermentação, e o metabólito que é sobreproduzido pelo microorganismo se acumula no licor de fermentação (veja aqui acima). A razão em volume de meio líquido (1) contendo açúcar que é alimentado e a outra carga de alimentação de açúcar para o meio de batelada que foi inicialmente introduzido e que compreende os 25 microorganismos está geralmente dentro da faixa de aproximadamente 1:10 a 10:1 e preferivelmente aproximadamente 1:5 a 5:1 e especificamente dentro da faixa de 1:1 a 5:1. O conteúdo de açúcar no licor de fermentação pode ser controlado em particular via a vazão de alimentação de meio líquido compreendendo açúcar. Como uma regra, a vazão de alimentação será

ajustada em uma tal maneira que o conteúdo de monossacarídeo no licor de fermentação esteja dentro da faixa de $> 0\%$ em peso a aproximadamente 5% em peso e em particular não ultrapassa um valor de 3% em peso.

5 O meio líquido compreendendo açúcar obtido em etapa a2), ou sua mistura com a outra carga de alimentação de açúcar, pode, se apropriado, ser esterilizado antes da fermentação, os microorganismos normalmente sendo destruídos por métodos químicos ou térmicos. Para este propósito, o meio líquido compreendendo açúcar é normalmente aquecido em temperaturas de acima de 80°C . A destruição ou lise das células pode ocorrer
10 imediatamente após a fermentação. Para este fim, todo o meio líquido compreendendo açúcar é submetido à lise ou à destruição. Isto pode ser realizado por meio térmico, mecânico ou químico.

A invenção particularmente se refere a um processo para a produção de compostos orgânicos não-voláteis possuindo pelo menos 3
15 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos 1 átomo de N. Neste contexto, compostos orgânicos não-voláteis são entendidos com o significado daqueles compostos que não podem ser recuperados por destilação do licor de fermentação sem sofrerem decomposição. Como uma regra, estes compostos possuem um ponto de ebulição acima do ponto de
20 ebulição da água, freqüentemente acima de 150°C e em particular acima de 200°C sob pressão atmosférica. Como uma regra, são compostos que estão no estado sólido sob condições padrão (298 K , $101,3\text{ kPa}$).

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

O termo metabólitos microbianos não-voláteis compreende em particular ácidos mono-, di- e tricarbóxicos orgânicos que preferivelmente

possuem 3 a 10 átomos de carbono e que, se apropriado, possuem m ou mais, por exemplo 1, 2, 3 ou 4, grupos hidroxila ligados neles, por exemplo ácido tartárico, ácido itacônico, ácido succínico, ácido propiônico, ácido láctico, ácido 3-hidróxi-propionico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido 2,5-furano-

5 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, fenil-alanina, ácido aspártico, triptofano e treonina; bases purina e pirimidina; nucleosídeos e nucleotídeos, por exemplo nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e

10 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

15 butanodiol; alcoóis poli-hídricos (também referidos como alcoóis de funcionalidade superior) possuindo 3 ou mais, por exemplo 3, 4, 5 ou 6, Grupos OH, por exemplo glicerol, sorbitol, manitol, xilitol e arabinitol; alcoóis de cadeia longa (também referidos como de cadeia mais longa), possuindo pelo menos 4 átomos de carbono, por exemplo 4 a 22 átomos de

20 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,

25 celulases ácidas, híbridas ou neutras, esterases tais como lipases, pancreases, proteases, xilanasas e óxido-redutases tais como lacase, catalase e peroxidase, glicanasas, 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 precusores e derivados dos compostos acima mencionados. Outros
5 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.
10 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
15 promovem saúde em plantas e animais, em particular humanos. Exemplos de tais moléculas são vitaminas, antioxidantes e certos lipídeos, por exemplo ácidos orgânicos poliinsaturados.

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

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

Os microorganismos empregados na fermentação dependem

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

5 Tabela A:

Substâncias	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-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;

Substâncias	Microorganismo	Referência
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.
Fenil-alanina	<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)
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 ω -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

Substâncias	Microorganismo	Referência
		Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido di-homo- α -linolênico	<i>Mortiella</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 Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido araquidônico	<i>Mortiella</i> , <i>Phytium</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 Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido eicosapentaenóico	<i>Mortiella</i> , <i>Phytium</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 Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
Ácido docosaheptaenóico	<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 Lousiana 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
Butanol	<i>Clostridium</i> (e.g. <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</i> , <i>Saccharomyces rouxii</i>	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973),

Substâncias	Microorganismo	Referência
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 glaucum</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> spp.	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>	ROMPP 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. <i>Fragrance Journal</i> (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) <i>Biotech.Bioeng.</i> 81:115–124
Cantaxantina	<i>Brevibacterium</i>	Nelis et al (1991) <i>J Appl Bacteriol</i> 70:181–191

Substâncias	Microorganismo	Referência
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
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> with 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
Poli(hidróxi-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>C. propionicum</i>)	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.

Substâncias	Microorganismo	Referência
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, alcoóis poli-hídricos possuindo 3 ou mais grupos hidroxila, alcoóis 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.

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 tais como ácido pantotênico e riboflavina, e os precursores e derivados.

5 Outras modalidades preferidas da invenção referem-se ao uso do meio líquido compreendendo açúcar que pode ser obtido de acordo com a invenção em uma produção fermentativa de

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

10 - ácidos hidróxi-carboxílicos alifáticos possuindo 3 a 10 átomos de C, tal como ácido láctico;

- alcoóis de cadeia longa como mencionado acima de, em particular alcoóis possuindo 4 a 10 átomos de C, tal como butanol;

15 - dióis como mencionado acima de, em particular alcanodióis possuindo 3 a 10, em particular 3 a 8, átomos de C, tal como propanodiol;

- cetonas como mencionado acima de, em particular cetonas possuindo 3 a 10 átomos de C, tal como acetona; e

20 - 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-alcenoatos) tais como poli(3-hidróxi-butirato) e copoliésteres com outros ácidos hidróxi-carboxílicos orgânicos tais como ácido 3-hidróxi-valérico, ácido 4-hidróxi-butírico e outros que são descritos em Steinbüchel (loc. cit.), incluindo por exemplo ácidos hidróxi-carboxílicos de cadeia longa (também referidos como de cadeia mais longa) tais como ácido 3-hidróxi-octanóico, ácido 3-hidróxi-decanóico e ácido 3-hidróxi-tetradecanóico, e misturas destes. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos

25

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.

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

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

Microorganismos adequados são normalmente selecionados dentre os gêneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Ashbya*, *Escherichia*,
 25 *Aspergillus*, *Alcaligenes*, *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Rhizopus* e *Clostridium*, em particular dentre cepas de *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* ou *Alcaligenes latus*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Lactobacillus delbrückii*,

Lactobacillus leichmannii, *Propionibacterium arabinosum*, *Propionibacterium schermanii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Clostridium propionicum*, *Clostridium formicoaceticum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Rhizopus arrhizus* e *Rhizopus oryzae*.

5 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 sobreproduz um aminoácido, especificamente lisina, metionina ou glutamato.

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

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

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

 Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é ácido

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.

5 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
10 riboflavin". *Fragrance Journal* (2003), 31(3), 44-48, podem ser empregados.

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

Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é ácido succínico. Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos
20 como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 498 -504 (1976); EP 249773 (1987), de Lemme e Datta; US 5.504.004 (1996), de Guettler, Jain e Soni; *Arch. Microbiol.* **167**, 332 -342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., "Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic-acid-producing
25 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 5.770.435, podem ser empregados.

Em uma outra modalidade especialmente preferida, o metabólito produzido pelos microorganismos na fermentação é uma fitase.

Para realizar a fermentação, condições e procedimentos análogos como têm sido descritos para outras cargas de alimentação de carbono, por exemplo em WO 98/55599, podem ser empregados.

5 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 sacarificado 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
10 presente pedido, este meio líquido também é referido como licor de fermentação, o termo licor de fermentação também compreendendo o meio líquido (compreendendo açúcar) no qual os açúcares presentes têm sido apenas submetidos à conversão fermentativa parcial ou incompleta, i.e. no qual uma metabolização microbiana parcial ou incompleta dos açúcares
15 utilizáveis (por exemplo mono- e dissacarídeos) tem ocorrido.

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

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

O isolamento ou depleção dos metabólitos do licor de fermentação, i.e. o composto orgânico possuindo pelo menos 3 átomos de C

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

O metabólito microbiano pode ser isolado ou exaurido do licor de fermentação em uma ou mais etapas. Uma etapa essencial neste contexto é a remoção dos constituintes sólidos do licor de fermentação. Esta pode ser realizada quer antes quer depois do isolamento do produto de valor. Métodos convencionalmente usados na arte 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, 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 subsequenteemente 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 docosa-hexaenóico, 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 refere-se a um processo no qual os constituintes voláteis do licor de fermentação são largamente ou totalmente removidos, sem isolamento ou depleção prévia de um metabólito microbiano não-volátil, e, se apropriado, sem remoção prévia de pelo menos alguns constituintes sólidos, produzindo uma formulação sólida de um metabólito microbiano não-volátil. Uma descrição mais detalhada para realizar um tal processo pode ser encontrada em PCT/EP2006/066057 (pedido de patente inicial DE 102005042541,0) da companhia requerente.

"Largamente" significa que, uma vez tendo sido removidos os constituintes voláteis, um resíduo sólido ou pelo menos semi-sólido permanece que pode, se apropriado, ser convertido em produto sólido pela adição de sólidos. Como uma regra, isto significa a remoção dos constituintes voláteis decrescentemente para um conteúdo 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 descendentemente para um conteúdo 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 conteúdo de umidade residual pode ser determinado por métodos convencionais com os quais o trabalhador experiente está familiarizado, por exemplo, por meio de termogravimetria (Hemminger et al., "Methoden der thermischen Analyse" [Métodos de Análise Térmica], Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989).

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

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

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

De acordo com esta modalidade, os constituintes voláteis são essencialmente removidos do meio líquido sem depleção prévia ou realmente isolamento do produto de valor. Como uma consequência, quando se removem os constituintes voláteis do licor de fermentação, o metabólito não-volátil essencialmente não é removido junto com os constituintes voláteis do meio líquido, mas permanece no resíduo resultante junto com pelo menos uma parte, normalmente com a maior parte dos e em particular com todos os outros constituintes sólidos do licor de fermentação. Conseqüentemente, contudo, também é possível remover quantidades - preferivelmente pequenas - do metabólito microbiano não-volátil desejado, como uma regra não mais do que 20% em peso, por exemplo 0,1 a 20% em peso, preferivelmente não mais do que 10, em particular não mais do que 5% em peso, especialmente preferivelmente não mais do que 2,5% em peso e muito especialmente preferivelmente não mais do que 1% em peso, baseado na matéria seca total do metabólico, junto com os constituintes voláteis do licor de fermentação quando se removem estes constituintes. Em uma modalidade muito especialmente preferida, o metabólito microbiano não-volátil desejado permanece em pelo menos 90% em peso, em particular pelo menos 95% em peso, especificamente 99% em peso e muito especificamente aproximadamente 100% em peso, em cada caso baseado no peso seco total do metabólito, como sólido em mistura com a porção dos constituintes sólidos do meio de fermentação que tem sido obtido após a remoção dos constituintes voláteis, ou com todos os constituintes sólidos do meio de fermentação.

Se desejado, uma porção, por exemplo 5 a 80% em peso e em particular 30 a 70% em peso, dos constituintes sólidos não-amiláceos pode ser separada do licor de fermentação, por exemplo por meio de centrifugação ou filtração, antes de os constituintes voláteis serem removidos. Se apropriado, uma tal separação preliminar será realizada com o objetivo de remover partículas sólidas mais grossas que não compreendem ou compreendem

apenas quantidades pequenas de, metabólito microbiano não-volátil. Esta filtração preliminar pode ser realizada usando métodos convencionais que são conhecidos pelo trabalhador experiente, por exemplo usando peneiras grossas, redes, placas de orifício perfurado ou semelhantes. Se apropriado, partículas sólidas grossas também podem ser separadas em um separador de força centrífuga. O equipamento aqui empregado, tal como decantador, centrífugas, sedimentador-decantador e separadores também são conhecidos pelo trabalhador experiente. Nesta maneira, um resíduo sólido ou semi-sólido, por exemplo pastoso é obtido que compreende o metabólito não-volátil e os constituintes não-voláteis, geralmente sólidos, não-amiláceos da carga de alimentação de amido ou pelo menos grandes porções do mesmo, freqüentemente pelo menos 90% em peso ou todos os constituintes sólidos não-amiláceos.

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 conteúdo de substância ativa, tamanho de partícula, forma de partícula, tendência a empoar, higroscopicidade, estabilidade, em particular estabilidade de armazenagem, cor, odor, comportamento de fluidez, tendência para aglomerar, carga eletrostática, sensibilidade à luz e sensibilidade à temperatura, estabilidade mecânica e redispersibilidade, pela adição de auxiliares de formulação tais como veículo e materiais de revestimento, aglutinantes e outros aditivos.

Os auxiliares de formulação que são convencionalmente usados incluem, por exemplo, aglutinantes, materiais veículo, adjuvantes de fluxo / de polvilhação, ademais pigmentos de cor, biocidas, dispersantes, antiespumantes, reguladores de viscosidade, ácidos, álcalis, antioxidantes, estabilizadores de enzima, inibidores de enzima, absorbatos, gorduras, ácidos graxos, óleos ou misturas destes. Tais auxiliares de formulação são

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 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.

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

Assim, por exemplo, os auxiliares podem ser misturados com 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

auxiliares de formulação é efetuada em particular após secagem, por exemplo quando se aplicam camadas de revestimento / revestimentos nas partículas secas. Adjuvantes adicionais podem ser adicionados no produto tanto após a secagem quanto após uma etapa de revestimento opcional.

5 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
10 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
15 conhecidos pelo trabalhador experiente que podem ser empregados dentro do escopo da formulação ou processamento de produto após o término da fermentação são adicionalmente descritos em EP 1038 527, EP 0648 076, EP 835613, EP 0219 276, EP 0394 022, EP 0547 422, EP 1088 486, WO 98/55599, EP 0758 018 e WO 92/12645.

20 Em uma primeira variante desta modalidade, 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,
25 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, 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 de rotor único excêntricas (por exemplo de Delasco PCM) ou bombas de pressão alta (por exemplo de LEWA Herbert Ott GmbH).

Uma fermentação 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 removida do meio líquido (1) obtido em etapa a2), ou sua mistura com a outra carga de

alimentação de açúcar, o restante, se apropriado junto com uma outra carga de alimentação de açúcar, tal como definido acima, isto 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

- 5 (ii) a porção que tem sido removida, se apropriado após tendo sido previamente removido todos ou um pouco dos constituintes sólidos não-amiláceos da carga de alimentação de amido, se apropriado junto com uma outra carga de alimentação de açúcar como definido acima é fornecida a uma fermentação para a produção de um segundo metabólito (B), que é idêntico ao, ou diferente de, o metabólito (A).

10 Se os constituintes sólidos não-amiláceos de (ii) são separados, o conteúdo de sólidos da porção restante do meio líquido totaliza preferivelmente não mais do que 50% em peso, particularmente não mais do que 30% em peso, especialmente preferivelmente não mais do que 10% em peso e muito especialmente preferivelmente não mais do que 5% em peso. Em um tal caso, é particularmente preferido separar todo o sólido antes da fermentação para a produção do segundo metabólito (B).

15 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 25 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.

5 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 completa ou parcial dos

10 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

15 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

20 inicial DE 102005042541,0), ou de acordo com a arte anterior conhecida da produção fermentativa de bioetanol (veja aqui acima). De acordo com (i), um pouco do meio líquido (1) obtido em etapa a2) é removido ou sua mistura com a outra carga de alimentação de açúcar é removida. A porção removida de acordo com (i) pode ser liberada de acordo com (ii) completamente ou em

25 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 líquido (1) obtido neste modo, que é opcionalmente totalmente ou parcialmente liberado dos sólidos, é, de acordo com (ii), alimentada a uma fermentação para a produção de um metabólito B, se apropriado junto com

uma outra carga de alimentação de açúcar como definido acima. Uma corrente de sólidos separada de acordo com (ii) é vantajosamente retornada para a corrente do meio líquido (1) contendo açúcar da fermentação de volume grande.

5 Se o metabólito microbiano (A) que é produzido na fermentação de volume grande é etanol este é recuperado do meio líquido (1). O meio líquido (1) deve agora possuir conteúdos de açúcar como são normais na produção fermentativa de etanol (bioetanol), por exemplo na faixa de 20 a 30% em peso. Normalmente, o restante do meio líquido (1) contendo açúcar

10 (1) obtido em etapa (i) é, neste procedimento, fornecido à fermentação para a produção de A (i.e. no presente caso etanol). A porção do meio líquido (1) contendo açúcar (1) que tem sido removida em etapa (i), junto com a outra carga de alimentação de açúcar, é fornecida à produção fermentativa de B, se apropriado após os sólidos terem sido removidos de acordo com a etapa (ii).

15 Em uma outra 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

20 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

25 metabólitos A, por exemplo de aminoácidos tais como lisina, glutamato, treonina ou metionina, de ácido cítrico ou de etanol, como descrito acima de. De acordo com (i), um pouco do meio líquido (1) contendo açúcar 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 líquido (1) contendo açúcar obtido do mesmo, que está essencialmente totalmente ou parcialmente liberado dos sólidos, é após a adição de uma outra carga de alimentação de açúcar, de acordo com (ii), alimentado a uma fermentação para a produção de metabólito B, neste caso
5 riboflavina. A corrente de sólidos separada de acordo com (ii) é vantajosamente retornada para a corrente do meio líquido (1) contendo açúcar da fermentação de volume grande.

O licor de fermentação contendo riboflavina que é assim gerado de acordo com (ii) pode ser processado por condições e procedimentos
10 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
15 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 sob condições análogas e usando procedimentos análogos como descrito em, por exemplo, EP 1048668 e EP 730034. após pasteurização, o licor de
20 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 subsequêntemente seca.

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

Para realizar esta variante de processo, um procedimento tal como descrito acima para riboflavina pode ser seguido. O meio líquido (1)

contendo açúcar (1) que tem sido submetido a uma purificação preliminar de acordo com (ii) e que tem sido preferivelmente essencialmente liberado de sólidos, ou sua mistura com a outra carga de alimentação de açúcar, é alimentado 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 contendo sólidos é particularmente vantajoso. A corrente de sólidos separada é preferivelmente retornada para a corrente do meio líquido (1) contendo açúcar da fermentação de volume grande.

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

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

Após a etapa de secagem e/ou formulação, os grãos de cereais moídos preferivelmente de milho, trigo, cevada, painço, triticale 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: 5 Retsch Vibrotronic type VE1; tempo de peneiração de 5 minutos, amplitude: 1,5 mm) deram os resultados listados em Tabela I.

Tabela I

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

II. Liquefação enzimática de amido e sacarificação de amido

II.1. Sem fitase na etapa de sacarificação

10

II.1a) Liquefação enzimática de amido

15

- 320 g de 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 para acima do valor se necessário. 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 subsequente-mente 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

20

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.1b) Sacarificação

5 A mistura reacional obtida em II.1a) foi aquecida para 61°C, com agitação constante. Agitação foi continuada durante o experimento inteiro. Após o pH ter sido trazido para 4,3 com H₂SO₄, 10,8 g(9,15 mL) de Dextrozyme GA (Novozymes A/S) foram adicionados. A temperatura foi mantida por aproximadamente 3 horas, durante cujo tempo o progresso da

10 reação foi monitorado com tiras de teste de glicose (S-Glucotest de Boehringer). Os resultados são listados em Tabela II aqui abaixo. A mistura reacional foi subseqüentemente aquecida para 80°C e então esfriada. Isto deu aproximadamente 1180 g de produto líquido com uma densidade de aproximadamente 1,2 kg/L e um conteúdo de matéria seca que, conforme

15 determinado por secador de infravermelho totalizou aproximadamente 53,7% em peso. Após lavagem com água, um conteúdo de matéria seca (sem constituintes solúveis em água) de aproximadamente 14% em peso foi obtido. O conteúdo de glicose da mistura reacional, conforme determinado por HPLC, totalizou 380 g/L (veja Tabela 2, amostra de No. 7).

20 Tabela II

Amostra de No.	min (de adição de glicoamilase)	Concentração de glicose em sobrenadante [g/L]
1	5	135
2	45	303
3	115	331
4	135	334
5	165	340
6	195	359
7	225	380

II.2. Com fitase na etapa de sacarificação

II.2a) Liquefação de amido

Uma amostra de farinha de milho moída seca foi liquefeita como descrito em II.1a).

II.2b) Sacarificação

A mistura reacional obtida em II.2a) foi aquecida para 61°C com agitação constante. Agitação foi continuada durante o experimento inteiro. Após o pH ter sido trazido para 4,3 com H₂SO₄, 10,8 g(9,15 mL) de Dextrozyme GA (Novozymes A/S) e 70 µl de fitase (700 unidades de fitase, Natuphyt Liquid 10 000L de BASF AG) foram adicionados. A temperatura foi mantida por aproximadamente 3 horas, durante cujo tempo o progresso da reação foi monitorado com tiras de teste de glicose (S-Glucotest de Boehringer). A mistura reacional foi subsequentemente aquecida para 80°C e então esfriada. O produto obtido foi seco por secador infravermelho e lavado com água. O conteúdo de glicose da mistura reacional foi determinado por HPLC.

15 II.3 Outros protocolos para a liquefação e sacarificação enzimáticas 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 CaCl₂ (100 g CaCl₂ x 2 H₂O/L) foram adicionados na massa fluida para uma concentração final de aproximadamente 70 ppm de Ca²⁺. 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 massa fluida foi então aquecida rapidamente 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 adicionada na massa fluida com o objetivo 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) fosse adicionada. 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 adicionadas. Um conteúdo de matéria seca de 55% em peso foi alcançado. Após a adição, a temperatura foi elevada para 100°C , e a massa fluida foi permitida ferver 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.

Para a reação de sacarificação subsequente, a mistura, que testada negativa para amido, foi trazida para 61°C . O pH foi trazido para 4,3 pela adição de ácido sulfúrico de concentração de 50%. No curso da reação, o pH foi mantido neste valor. A temperatura foi mantida em 61°C . 5,74 mL (= 1,5% em peso de enzima/matéria seca) de Dextrozym GA (Novozymes A/S) foram adicionados com o objetivo de converter o amido liquefeito em glicose. A reação foi permitida prosseguir por uma hora. Para inativar a enzima, a mistura foi aquecida para 85°C . A mistura quente foi adicionada em recipientes estéreis, que foram esfriados e então armazenados a 4°C . Foi obtida uma concentração final de glicose de 420 g/L.

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 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 $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O/L}$) 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 massa fluida 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 CaCl_2 foi adicionado na massa fluida com o objetivo 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 (40 g de farinha e 0,1 mL de solução de estoque de CaCl_2) 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 CaCl_2) foi adicionada. Um conteúdo de matéria seca de 55% em peso foi alcançado. Após a adição, a temperatura foi elevada

para 100°C, e a massa fluida foi permitida ferver 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.

Para a reação de sacarificação subsequente, a mistura, que testada negativa para amido, foi trazida para 61°C. O pH foi trazido para 4,3 pela adição de ácido sulfúrico de concentração de 50%. No curso da reação, o pH foi mantido neste valor. A temperatura foi mantida em 61°C. 5,74 mL (= 1,5% em peso de enzima/matéria seca) de Dextrozym GA (Novozymes A/S) foram adicionados com o objetivo de converter o amido liquefeito em glicose. A reação foi permitida prosseguir por uma hora. Para inativar a enzima, a mistura foi aquecida para 85°C. A mistura quente foi adicionada em recipientes estéreis, que foram esfriados e então armazenados a 4°C. Foi obtida uma concentração final de glicose de 370 g/L.

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 a 55°C, e 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, 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.

5 A liquefação e a sacarificação foram realizadas como descrito em II.3b. Foi obtida uma concentração final de glicose de 400 g/L.

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.

Exemplo 1

Em cada caso um hidrolisado de farinha de milho, de trigo e de centeio foi preparado como descrito sob 1) aqui abaixo. O conteúdo de açúcar total em cada um destes meios foi aumentado pela adição de várias soluções de açúcar (compreendendo glicose, açúcar bruto, melaço). Os meios foram empregados em experimentos em frascos de agitação usando *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032 lysC^{fbr}) e *Bacillus* PA824 (descrito em detalhe em WO 02/061108) como carga de alimentação de carbono.

1) Preparação do hidrolisado de farinha

a) Hidrolisado de farinha de milho

360 g de água deionizada foram introduzidos em um vaso de reação. 155 g de farinha de milho foram lentamente adicionados na água, com agitação constante.

25 - Liquefação

Após o pH ter sido trazido para 5,8 usando solução aquosa de NaOH de concentração de 50% em peso, 2,6 mL (= 2% em peso de enzima/matéria seca) de Liquozyme SC (de Novozymes A/S) foram adicionados. A massa fluida foi então aquecida rapidamente para 100°C e

fervida por 10 minutos. Durante este processo, o pH foi constantemente monitorado e, se apropriado, ajustado.

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.

- Sacarificação

10 Para a reação de sacarificação subsequente, a mistura, que testa negativa para amido, foi trazida para 61°C. O pH foi trazido para 4,3 pela adição de ácido sulfúrico de concentração de 50%. No curso da reação, o pH foi mantido neste valor. A temperatura foi mantida em 61°C. 2,0 mL (= 1,5% em peso de enzima/matéria seca) de Dextrozym GA (Novozymes A/S) 15 foram adicionados com o objetivo de converter o amido liquefeito em glicose. A reação foi permitida prosseguir por uma hora. Para inativar a enzima, a mistura foi aquecida para 85°C. A mistura quente foi adicionada em recipientes estéreis, que foram esfriados e então armazenados a 4°C.

b) Hidrolisado de farinha de trigo

- Pré-tratamento com xilanase

20 360 g de água deionizada foram introduzidos em um vaso de reação. A água foi aquecida a 55°C, e o pH foi ajustado para 6,0 usando solução aquosa de NaOH de concentração de 50% em peso. Após a temperatura e pH serem ajustados, 3,21 mL (= 2,5% em peso de 25 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. 30 minutos após a última adição, uma liquefação pôde ser iniciada.

A liquefação e a sacarificação foram realizadas como descrito em 1a).

c) Hidrolisado de farinha de centeio

Pré-tratamento com celulase/hemicelulase

5 360 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 foi trazido para 5,5 usando ácido sulfúrico de concentração de 50% em peso, 3,21 mL (= 2,5% em peso de enzima/matéria seca) de Viscozyme L 10 (Novozymes A/S) foram adicionados. 30 minutos após a última adição, uma liquefação pôde ser iniciada.

A liquefação e a sacarificação foram realizadas como descrito em 1a).

2) Preparação de inóculo

15 a) Para *Corynebacterium glutamicum*

As células foram riscadas sobre ágar estéril CM+CaAC (composição: veja Tabela 1; 20 minutos a 121°C) e então incubadas durante a noite a 30°C. As células foram subsequenteiramente raspadas das placas e ressuspensas em solução salina. 25 mL do meio (veja Tabela 4) em frascos 20 Erlenmeyer de 250 mL equipados com dois defletores foram inoculadas em cada caso com uma quantidade tal de suspensão celular assim preparada que a densidade óptica alcançou um valor de OD₆₁₀ de 0,5 a 610 nm.

Tabela 1: Composição das placas de ágar CM+CaAc

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

b) Para *Bacillus*

42 mL de meio de pré-cultura (veja Tabela 2) em frascos Erlenmeyer de 250 mL equipados com dois defletores foram inoculadas em cada caso com 0,4 mL de uma cultura congelada e incubados por 24 horas a 43°C com agitação (250 rpm) em um agitador umidificado.

Tabela 2: Composição de meio de pré-cultura

Constituinte	Concentração
Maltose	28,6 g/L
Farinha de soja	19,0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,6 g/L
Glutamato monossódico	4,8 g/L
Citrato de sódio	0,95 g/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	9,5 mg/L
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,9 mg/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1,4 mg/L
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,9 mg/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,2 mg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,7 mg/L
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	15,2 g/L
KH ₂ PO ₄	3,9 g/L
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,9 g/L
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,09 g/L
MOPS	59,8 g/L
pH*	7,2

* a ser ajustado com solução aquosa diluída de KOH

42 mL do meio de cultura principal (veja Tabela 6) em frascos Erlenmeyer de 250 mL equipados com dois defletores foram inoculadas em cada caso com 1 mL de pré-cultura.

3) Preparação do licor de fermentação

a) Para *Corynebacterium glutamicum*

A composição do meio do frasco é listada em Tabela 4. Deve possuir uma concentração inicial de açúcar de 60 g/L. Metade do açúcar originado do hidrolisado (meio de fermentação (1)), enquanto que a outra metade foi adicionada na forma de uma solução de açúcar. Para este fim, uma

mistura de hidrolisado e solução de açúcar foi preparada e adicionada no meio do frasco. Uma quantidade correspondente de solução de glicose foi usada no meio de controle.

- Preparação de hidrolisados de farinha com açúcar adicionado

As seguintes soluções foram preparadas (veja Tabela 3):

Tabela 3: Preparação de hidrolisados de farinha com açúcar adicionado

Hidrolisado de farinha	Concentração de glicose em hidrolisado [g/L]	Hidrolisado por litro de mistura reacional [mL]	Solução de açúcar	Concentração em solução de açúcar [g/L]	Solução de açúcar por litro de mistura reacional [mL]
Milho 30%	250,0	240	Glicose	626	96
Milho 30%	250,0	240	Açúcar bruto	639	94
Trigo 30%	258,9	232	Glicose	626	96
Trigo 30%	258,9	232	Açúcar bruto	639	94
Centeio 30%	217,9	275	Glicose	626	96
Centeio 30%	217,9	275	Açúcar bruto		94

Tabela 4: Meio do frasco

Hidrolisado de farinha com solução de açúcar	500	mL/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	20	g/L
Uréia	5	g/L
KH ₂ PO ₄	0,113	g/L
K ₂ HPO ₄	0,138	g/L
ACES	52	g/L
MOPS	21	g/L
Ácido cítrico x H ₂ O	0,49	g/L
Ácido 3,4-di-hidróxi-benzóico	3,08	mg/L
NaCl	2,5	g/L
KCl	1	g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3	g/L
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	25	mg/L
MnSO ₄ x 4 – 6 H ₂ O	5	mg/L
ZnCl ₂	10	mg/L
CaCl ₂	20	mg/L
H ₃ BO ₃	150	µg/L
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	100	µg/L
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	100	µg/L
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	100	µg/L
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	25	µg/L
Biotina (Vit. H)	1050	µg/L
Tiamina x HCl (Vit B ₁)	2100	µg/L
Nicotinamida	2,5	mg/L
Ácido pantotênico	125	mg/L

Hidrolisado de farinha com solução de açúcar	500	mL/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	

* a ser 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 conteúdo 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-ftaldeído permite a quantificação do aminoácido formado; a mistura de aminoácido é separada usando uma coluna Agilent Hypersil AA. Os resultados são compilados em Tabela 5.

Tabela 5: Meios

Hidrolisado de farinha	Solução de açúcar	Lisina [g/L]	Rendimento*
Milho	Glicose	12,50	0,21
	Açúcar bruto	10,64	0,19
	Melaço	10,06	0,18
Trigo	Glicose	10,82	0,18
	Açúcar bruto	10,14	0,18
	Melaço	9,67	0,17
Centeio	Glicose	10,89	0,18
	Açúcar bruto	9,59	0,16
	Melaço	9,67	0,16
Controle		11,54	0,20

* baseado em equivalentes totais de glicose

b) Para *Bacillus*

A composição do meio do frasco é listada em Tabela 6. Deve possuir uma concentração inicial de glicose de 28,6 g/L. Metade do açúcar originado do hidrolisado, enquanto que a outra metade foi adicionada na forma de uma solução de glicose. Uma quantidade correspondente de solução

de glicose foi usada no meio de controle.

Tabela 6: Meios do frasco

Milho	250 g/L †	57 mL/L ‡		
Trigo	259 g/L †		55 mL/L ‡	
Centeio	218 g/L †			67 mL/L ‡
Solução de glicose (c=626 g/L)			23 mL/L	
Farinha de soja			19,0 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄			7,6 g/L	
Glutamato monossódico			4,8 g/L	
Citrato de sódio			0,95 g/L	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O			9,5 mg/L	
MnCl ₂ x 4 H ₂ O			1,9 mg/L	
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O			1,4 mg/L	
CoCl ₂ x 6 H ₂ O			1,9 mg/L	
CuSO ₄ x 5 H ₂ O			0,2 mg/L	
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O			0,7 mg/L	
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O			15,2 g/L	
KH ₂ PO ₄			3,9 g/L	
MgCl ₂ x 6 H ₂ O			0,9 g/L	
CaCl ₂ x 2 H ₂ O			0,09 g/L	
MOPS			59,8 g/L	
pH*			7,2	

* a ser ajustado com solução aquosa diluída de NaOH

† concentração de glicose no hidrolisado

5 ‡ quantidade requerida de hidrolisado pesado por litro de meio

Após a inoculação, os frascos foram incubados por 24 horas a 43°C e com agitação (250 rpm) em um agitador umidificado. Após o término da fermentação, os conteúdos de glicose e de ácido pantotênico foram determinados por HPLC. A glicose foi determinada com o auxílio de uma
10 coluna Aminex HPX-87H de Bio-Rad. A separação de ácido pantotênico foi determinada via separação em uma coluna Aqua C18 (Phenomenex).

Os resultados são compilados em Tabela 7.

Tabela 7: Meios após 24 h

	Ácido pantotênico, t=24h [g/L]	Rendimento [g ácido pantotênico/g glicose]
Milho	2,7	0,09
Trigo	2,4	0,08
Centeio	2,7	0,09
Controle	2,7	0,09

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção fermentativa de pelo menos um composto orgânico possuindo pelo menos 3 átomos de C ou possuindo pelo menos 2 átomos de C e pelo menos um 1 átomo de N, 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 hidrolisar a porção amilácea da massa moída base por liquefação enzimática e, se apropriada, subsequente sacarificação, por meio do qual um primeiro líquido (1) que compreende mono- ou oligossacarídeos é obtido; e

b) adicionar o líquido (1) que compreende mono- ou oligossacarídeos junto com mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis ou junto com uma composição que compreende mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que está essencialmente livre de sólidos que são insolúveis em água em um meio de fermentação compreendendo um microorganismo que é capaz de sobreproduzir o composto orgânico sob condições de fermentação.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração total de mono-, di- e oligossacarídeo do líquido (1) obtido em etapa a2) está dentro da faixa de 100 a 400 g/kg.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a quantidade de mono-, di- e/ou oligossacarídeos introduzida na fermentação pela adição do líquido (1) totaliza 40 a 95% em peso da quantidade total de mono-, di- e oligossacarídeos introduzida na fermentação.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a concentração total de mono-, di-

5 e oligossacarídeo no primeiro líquido (1) é aumentada em pelo menos 50 g/kg pela adição de mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis ou pela adição de um meio que compreende mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso e que está essencialmente livre de sólidos que são insolúveis em água.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a concentração total de mono-, di- e oligossacarídeo no líquido (1) é aumentada para um valor dentro da faixa de 450 a 600 g/kg.

10 6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a composição empregada que compreende mono-, di- ou oligossacarídeos metabolizáveis é um subproduto da produção de açúcar compreendendo glicose e/ou sacarose e, se apropriado, dextrinas.

15 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a composição empregada compreendendo mono-, di- e/ou oligossacarídeos metabolizáveis é melaço da produção de açúcar de beterraba.

8. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a carga de alimentação de amido em etapa a1) é grãos de cereais.

20 9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que, em etapa a2), pelo menos uma porção da massa moída base obtida em etapa a1) é hidrolisada pela adição dela, continuamente ou em batelada, no líquido aquoso sob condições de hidrólise.

25 10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que, em etapa a2), a suspensão da massa moída base é aquecida acima da temperatura de geleificação do amido presente na massa moída base pela introdução de amido na suspensão.

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações

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

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

13. 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*.

14. Processo de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o microorganismo empregado para a fermentação é selecionado dentre microorganismos naturais ou recombinantes que sobreproduzem aminoácidos.

15. Processo de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é uma cepa do gênero *Corynebacterium*.

5 caracterizado pelo fato de que o microorganismo empregado para a fermentação é selecionado dentre microorganismos naturais ou recombinantes que sobreproduzem uma enzima.

10 17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é selecionado dentre microorganismos sobreprodutores de fitase.

15 18. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o composto orgânico é exaurido ou isolado do licor de fermentação e os constituintes voláteis do licor de fermentação são subsequenteiramente substancialmente removidos, sendo obtida uma composição de proteína sólida ou semi-sólida.

20 19. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que pelo menos alguns dos constituintes voláteis do licor de fermentação são removidos sem prévio isolamento ou depleção de um metabólito microbiano não-volátil e, se apropriado, sem prévia remoção de constituintes sólidos, sendo obtida uma formulação sólida de um metabólito microbiano não-volátil.

RESUMO

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

A invenção refere-se a um método para produzir por fermentação pelo menos um tipo de composto orgânico contendo pelo menos 3 átomos de C ou pelo menos dois átomos de C e pelo menos um átomo de N consistindo de a1) na moagem de uma carga de alimentação de amido para obter um produto moído contendo pelo menos uma parte de componentes sólidos destituídos de amido da carga de alimentação de amido, 2a) na moagem de material moído em um fluido aquoso e na hidrólise por liquefação enzimática da parte de amido da carga de alimentação de amido e eventualmente subsequente sacarificação, obtendo deste modo um primeiro líquido contendo mono- e oligossacarídeo (1), b) na adição, sob condições de fermentação, do líquido contendo mono- e oligossacarídeo (1) junto com monossacarídeos, dissacarídeos e/ou oligossacarídeos metabolizáveis ou com composição contendo monossacarídeos, dissacarídeos e/ou oligossacarídeos metabolizáveis em uma concentração de pelo menos 50% em peso que está praticamente destituída de sólidos insolúveis em água, em um meio de fermentação contendo um microorganismo que permite que um composto orgânico seja sobreproduzido.