



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월25일

(11) 등록번호 10-1388733

(24) 등록일자 2014년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 13/02 (2006.01) C12P 13/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7015649

(22) 출원일자(국제) 2006년11월27일

심사청구일자 2011년11월23일

(85) 번역문제출일자 2008년06월27일

(65) 공개번호 10-2008-0073764

(43) 공개일자 2008년08월11일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/068926

(87) 국제공개번호 WO 2007/060233

국제공개일자 2007년05월31일

(30) 우선권주장

10 2005 056 668.5 2005년11월28일 독일(DE)

(56) 선행기술조사문헌

JP2001275693 A\*

KR1019920007402 B1\*

KR1020030016249 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

巴斯프 에스이

독일 데-67056 루드빅샤펜

(72) 발명자

폼페유스, 마르쿠스

서울특별시 용산구 대사관로20길 42, 401호 (한남동, 바우 하우스)

프레이어, 스테판

독일 67434 노이스타트 에르켄브레히스트라쎄 8

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 유기 화합물의 발효 생산

**(57) 요 약**

본 발명은 a1) 전분 공급원료를 분쇄하여, 전분 공급원료의 고체 비전분 구성성분의 일부분 이상을 포함하는 분말기재를 수득하는 단계; a2) 수성 액체에 분말기재를 혼탁시키고, 전분 공급원료의 전분 부분을 효소적 액화에 의해 가수분해하고, 적절한 경우 후속적으로 당화시켜, 단당류 및 올리고당류를 포함하는 제1 액체 (1)을 수득하는 단계; 및 b) 발효 조건 하에서, 단당류 및 올리고당류를 포함하는 액체 (1)을, 단당류, 이당류 및/또는 대사 가능한 올리고당류와 함께 또는 단당류, 이당류 및/또는 대사 가능한 올리고당류를 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 수불용성 고체가 실제로 제거된 조성물과 함께, 유기 화합물을 초과생산할 수 있는 미생물을 포함하는 발효 배지에 첨가하는 단계를 포함하는, 3개 이상의 탄소 원자 또는 2개 이상의 탄소 원자 및 1개 이상의 질소 원자를 갖는 1종 이상의 유기 화합물의 발효 생산 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

로샤이트, 마르쿠스

독일 69121 하이델베르크 부르그스트라쎄 24

젤더, 오스카

독일 67346 스페이어 프란츠-스튜첼-스트라쎄 8

보이, 마티아스

독일 63225 란겐 보름세르 베크 1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

a1) 곡류 날알로부터 선택되는 전분 공급원료를 분쇄하여, 분쇄된 곡류 날알에 존재하는 비전분 고체 구성성분의 50 중량% 이상이 포함되고 분말기재 중 비전분 구성성분의 양이 전분 구성성분의 중량을 기준으로 15 중량% 이상인 분말기재를 수득하는 단계;

a2) 분말기재를 수성 액체에 혼탁시켜서, 혼탁액의 총 중량을 기준으로 200 내지 500 g/kg의 양의 분말기재를 함유하는 혼탁액을 얻고, 효소적 액화에 의해 분말기재 중 전분 부분을 가수분해하고, 후속적으로 당화시켜, 분말기재의 단당류, 이당류 또는 올리고당류 및 비전분 구성성분을 포함하며 전체 단당류, 이당류 및 올리고당류의 농도가 150 내지 350 g/kg의 범위인 제1 액체 (1)을 수득하는 단계; 및

b) 비전분 고체 구성성분의 제거 없이, 단당류, 이당류 또는 올리고당류 및 비전분 구성성분을 포함하는 액체 (1)을 대사가능한 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물과 함께 또는 대사가능한 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물을 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 수불용성인 고체가 없는 조성물과 함께, 발효 조건 하에서 유기 화합물을 생산할 수 있는 미생물을 포함하는 발효 배지에 첨가하고, 여기서 제1 액체 (1) 중 전체 단당류, 이당류 및 올리고당류 농도가 대사가능한 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물의 첨가에 의해 또는 대사가능한 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물을 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 수불용성인 고체가 없는 배지의 첨가에 의해 50 g/kg 이상 증가하는 단계

를 포함하며,

여기서, 발효에 사용된 미생물은 효소, 아미노산, 비타민, 이당류, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 모노- 및 디카르복실산, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 히드록시카르복실산, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 케톤, 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알칸올, 및 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알칸디올 중 하나 이상의 대사물질을 생산하는 천연 또는 재조합 미생물 중에서 선택되는 것으로서, 코리네박테리움, 바실루스, 아쉬비아, 에쉐리키아, 아스페르길루스, 알카리제네스, 약티노바실루스, 아내로비오스파렐룸, 락토바실루스, 프로피오니박테리움, 클로스트리디움 및 리조푸스 속 중에서 선택되는 것인,

효소, 아미노산, 비타민, 이당류, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 모노- 및 디카르복실산, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 히드록시카르복실산, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 케톤, 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알칸올, 및 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알칸디올 중에서 선택되는 3개 이상의 탄소 원자를 갖는 1종 이상의 유기 화합물 또는 2개 이상의 탄소 원자 및 1개 이상의 질소 원자를 갖는 1종 이상의 유기 화합물의 발효 생산 방법.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제1항에 있어서, 액체 (1)의 첨가에 의해 발효에 도입된 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물의 양이 발효에 도입된 단당류, 이당류 및 올리고당류의 총량의 40 내지 95 중량%를 차지하는 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 액체 (1) 중 전체 단당류, 이당류 및 올리고당류 농도가 450 내지 600 g/kg 범위 내의 값으로 증가하는 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 대사가능한 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물을 포함하는 사용된 조성물이 글루코스, 수크로스 또는 이들의 혼합물 및 텍스트린을 포함하는 당 생산의 부산물인 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 대사가능한 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물을 포함하는 사용된 조성물이 글루

코스, 수크로스 또는 이들의 혼합물을 포함하는 당 생산의 부산물인 방법.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 대사가능한 단당류, 이당류, 올리고당류 또는 이들의 혼합물을 포함하는 사용된 조성물이 사탕 무 당 생산에서 나온 당밀인 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 단계 a2)에서, 단계 a1)에서 수득된 분말기재의 일부분 이상이 가수분해 조건 하에서 수성 액체에 연속식 또는 배치식으로 첨가됨으로써 가수분해되는 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 단계 a2)에서, 스텀을 혼탁액에 도입하여 분말기재에 존재하는 전분의 호화 (gelatinization) 온도를 초과하는 온도로 분말기재의 혼탁액을 가열하는 방법.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 발효에 사용된 미생물이 아미노산을 생산하는 천연 또는 재조합 미생물 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 미생물이 코리네박테리움 속의 균주인 방법.

#### 청구항 15

제1항에 있어서, 발효에 사용된 미생물이 효소를 생산하는 천연 또는 재조합 미생물 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 미생물이 피타제를 생산하는 미생물 중에서 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 유기 화합물이 발효액으로부터 소모 또는 단리되고, 이후 발효액의 휘발성 구성성분이 제거되어, 고체 또는 반고체 단백질 조성물이 수득되는 것인 방법.

#### 청구항 18

제1항에 있어서, 비휘발성 미생물 대사물질의 사전 단리 또는 소모 없이, 고체 구성성분의 사전 제거 없이, 발효액의 휘발성 구성성분의 일부 이상이 제거되어, 비휘발성 미생물 대사물질의 고체 제제가 수득되는 것인 방법.

#### 청구항 19

제1항에 있어서, 비휘발성 미생물 대사물질의 사전 단리 또는 소모 없이, 발효액의 휘발성 구성성분의 일부 이상이 제거되어, 비휘발성 미생물 대사물질의 고체 제제가 수득되는 것인 방법.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 미생물을 배양하기 위해 전분 공급원료의 비전분 고체 구성성분의 일부분 이상을 포함한 당-함유 배지를 사용하여 3개 이상의 탄소 원자 또는 2개 이상의 탄소 원자 및 1개 이상의 질소 원자를 갖는 유기 화합물을 발효 생산하는 것에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 당-함유 액체 배지는 여러 발효 공정에 대한 기초 영양 공급원이며, 배지에 존재하는 당 성분은 사용된 미생물에 의해 대사되어 중요한 유기 생성물을 생성한다. 이렇게 제조된 미생물 대사물질, 즉 유기 화합물의 범위는 예를 들어 에탄올과 같은 저분자량 휘발성 화합물, 아미노산, 비타민 및 카로테노이드와 같은 비휘발성 대사물질, 및 여러 추가 물질을 포함한다.

### 발명의 상세한 설명

[0003] 다양한 공정 조건에 따라, 상이한 탄소 공급원료가 상기 일반적으로 공지된 미생물 발효 공정에 이용된다. 이들은 순수한 수크로스에서부터 사탕무 및 사탕수수 당밀을 거쳐 고도 당밀(전환 사탕수수 당밀)로 알려진 것에 까지 확장되고, 전분 가수분해물질에서부터 글루코스까지 확장된다. 게다가, 아세트산 및 에탄올은 L-리신의 생물공학적 생산을 위해 공업적 규모로 사용될 수 있는 보조기질로서 언급되어 있다 (문헌 [Pfefferle et al., Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 79 (2003), 59-112] 참조).

[0004] 상기 언급된 탄소 공급원료를 바탕으로, 미생물 대사물질의 당-기재 발효 생산을 위한 다양한 방법 및 절차가 확립되어 있다. L-리신을 예로 들어, 균주 개발, 공정 개발 및 공업적 생산에 관해 상기 문헌 [Pfefferle et al.]에 기재되어 있다.

[0005] 미생물 대사물질의 미생물-매개 발효 생산을 위한 중요한 탄소 공급원료는 전분이다. 전분은 발효에서 탄소 공급원료로서 이용될 수 있기 전에 먼저 선행 반응 단계에서 액화 및 당화되어야 한다. 이를 위해, 전분은 통상 천연 전분 공급원료, 예컨대 감자, 카사바(cassava), 곡류, 예를 들어 밀, 옥수수, 보리, 호밀, 라이밀 또는 쌀로부터 예비정제된 형태로 수득되고, 이어서 효소에 의해 액화 및 당화된 후, 목적하는 대사물질을 생성하기 위한 실제 발효에 사용된다.

[0006] 상기 예비정제된 전분 공급원료의 사용 이외에도, 미생물 대사물질의 발효 생산을 위한 탄소 공급원료의 제조용으로, 사전처리되지 않은 전분 공급원료의 사용이 또한 기재되어 있다. 전형적으로, 전분 공급원료는 초기에 분쇄에 의해 세분된다. 이어서 분말기재가 액화 및 당화된다. 이러한 분말기재는 본래 전분 이외에도 발효에 불리한 영향을 미칠 수 있는 일련의 비전분 구성성분을 포함하기 때문에, 이들 구성성분이 통상 발효 전에 제거된다. 제거는 분쇄 직후 (WO 02/077252; JP 2001-072701; JP 56-169594; CN 1218111 참조), 액화 후 (WO 02/077252; CN 1173541 참조), 또는 당화 후 (CN 1266102; 문헌 [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]; NL 8302229 참조)에 수행될 수 있다. 그러나, 모든 변법은 발효에서 실질적으로 순수한 전분 가수분해물질의 사용을 포함한다.

[0007] 유기 화합물의 발효 생산을 위한 신규 방법은 특히 발효 전 전분 공급원료의 정제, 예를 들어 액화 및 당화된 전분 용액의 정제를 포함하거나 (JP 57159500 참조), 또는 재생가능한 공급원으로부터 발효 배지의 제조를 가능하게 하는 방법을 제공한다 (EP 1205557 참조).

[0008] 이와 반대로, 가공되지 않은 전분 공급원료가 바이오에탄올의 발효 생산에서 대규모로 적용된다는 것이 공지되어 있다. 여기서, 전분 공급원료, 통상 전체 곡류 알곡이 먼저 건식 분쇄되고, 전분 공급원료의 전분 구성성분이 이후 효소를 사용하여 가수분해된다. 여기서, 가수분해는 배치식으로, 예를 들어 교반 용기에서 또는 연속식으로, 예를 들어 제트 쿡커(jet cooker)에서 수행될 수 있다. 적합한 공정의 기재를 예를 들어 문헌 [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. 7-23] 및 [McAloon et al., "Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks", NREL/TP-

580-28893, National Renewable Energy Laboratory, October 2000]에서 발견할 수 있다.

[0009] 바이오에탄올의 발효 생산에서 중요 생성물은 종류에 의해 수득되기 때문에, 건식 분쇄 공정으로부터의 전분 공급원료를 예비정제되지 않은 형태로 사용하는 것은 심각한 문제를 유발하지 않는다. 그러나, 다른 미생물 대사 물질의 생산을 위해 건식 분쇄 방법을 사용하는 경우, 당 용액을 통해 발효에 도입된 고체 스트림은 문제가 되는데, 이는 상기 스트림이 예를 들어 사용된 미생물의 산소 전달율 또는 산소 요건과 관련하여 발효에 불리한 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라 (이와 관련하여, [Mersmann, A. et al.: Selection and Design of Aerobic Bioreactors, Chem. Eng. Technol. 13 (1990), 357-370] 참조) 이후의 후처리를 상당히 복잡하게 할 수 있기 때문이다.

[0010] 또한, 고체의 도입 결과, 혼탁액의 점도는 전분-함유 혼탁액이 제조되는 동안에 임계치에 도달할 수 있는데, 이는 예를 들어 30 중량% 초과의 옥수수 가루를 함유하는 혼탁액은 물에 더이상 균질하게 혼합될 수 없기 때문이다 (문헌 [Industrial Enzymology, 2nd Ed., T. Godfrey, S. West, 1996] 참조). 이는 통상적인 절차에서 글루코스 농도를 제한한다. 바이오에탄올의 발효 생산과 관련하여, 이는 발효에 사용되는 이스트에 대한 생성물의 독성 때문에 보다 높은 농도가 의미있는 방식으로 전환될 수 없는 한 더이상 적절하지 않다.

[0011] 발효 당-함유 배지에 저농도 당을 공급하는 것은 원칙적으로 에탄올 이외의 유기 대사물질의 발효 생산에 불리한데, 이는 이러한 절차가 발효액의 불균형 희석을 초래하고, 그 결과 관심있는 생성물의 달성가능한 최종 농도가 감소되어, 첫째 이들 생성물이 발효 배지로부터 수득되는 경우 비용이 증가하고, 둘째 시공간 수율이 감소하기 때문이다. 이들 고려사항은, 대량 바이오에탄올 생산을 위해 제조되며 통상적으로 대략 30 또는 33 중량% 이하의 낮은 당 또는 글루코스 농도를 갖는 전분 가수분해물질이 다른 화학물질의 생산을 위한 소량의 부수적 발효에 일부 제공되는 경우 특히 중요하다.

[0012] 이러한 곤란 및 제한 때문에, 바이오에탄올의 생산에 널리 사용되어 왔던 건식 분쇄 방법이 에탄올 이외의 미생물 대사물질의 발효 생산에서 특정 경제적 중요성 없이 아직까지 유지되었다.

[0013] 현재까지, 건식 분쇄 개념 및 원칙적으로 이러한 방법과 관련되어 존재하는 이점을 미생물 대사물질의 공업적 규모 생산에 적용하려는 시도는 단지 전분 공급원료로서 카사바를 사용하는 것 뿐이었다. 따라서, 건조 상태로 분쇄된 박리된 카사바 괴경이 전분 공급원료로서 사용되는 아미노산의 발효 생산 방법이 JP 2001/275693에 기재되어 있다. 상기 방법을 수행하기 위해서는 분말기재의 입도를 150  $\mu\text{m}$  이하로 조정하는 것이 필수적이다. 상기 목적을 위해 사용되는 여과 단계에서, 비전분-함유 구성성분을 비롯한 분말기재의 일부는 존재하는 전분이 액화/당화되기 전에 제거되고, 그 후 발효된다. 이 방법에서, 중간 농도의 당이 수득된다. JP 2001/309751에는 아미노산-함유 식품 첨가제의 생산을 위한 유사한 방법이 기재되어 있다.

[0014] 발효에 사용된 액체 배지에서 당 농도 증가는 본 출원인 회사의 WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728)에 기재된 방법에 의해, 대부분 전분 공급원료의 고체 비전분 구성성분을 포함하는 분말기재를 당화에 사용하여 달성될 수 있다. 놀랍게도, 전분 공급원료에 존재하는 고체 비전분 구성성분은 발효 전에 제거될 필요가 없다고 밝혀졌다. 곡류 알곡 중에서 선택된 전분 공급원료를 사용하는 유사한 방법이 본 출원인 회사의 PCT/EP2006/066057 (선행 특허출원 DE 10 2005 042 541.0)에 기재되어 있다. 일부 경우에서, 억제 또는 지연된 미생물 증식이 관찰되었다.

[0015] 본 발명의 목적은 전분 공급원료에 존재하는 비전분 고체 구성성분의 완전한 사전 제거를 필요로 하지 않는, 거의 필요로 하지 않는 유기 화합물의 발효 생산을 위한 또다른 방법을 제공하는 것이다. 또한, 발효 공정에 사용되는 배지의 용이한 취급 및 문제없는 사용에 의해 차별화되어야 한다. 특히, 상기 방법은 전분 공급원료로서 곡류의 사용을 허용하여야 한다.

[0016] 놀랍게도, 상기 종래 기술의 문제점은, 먼저 전분 공급원료의 비전분 고체 구성성분의 사전 제거 없이 전분 공급원료를 분쇄, 액화 및 당화시켜 제1 당-함유 액체 배지 (1)을 제조하고, 상기 배지를 대사가능한 단당류, 이 당류 또는 올리고당류와 함께 또는 대사가능한 단당류 또는 올리고당류를 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 수불용성인 고체가 본질적으로 제거된 조성물과 함께 발효에 공급함으로써 극복될 수 있다고 밝혀졌다.

[0017] 따라서, 본 발명은

[0018] a1) 전분 공급원료를 분쇄하여, 전분 공급원료의 비전분 고체 구성성분의 일부분 이상을 포함하는 분말기재를 수득하는 단계;

[0019] a2) 수성 액체에 분말기재를 혼탁시키고, 효소적 액화에 의해 분말기재 중 전분 부분을 가수분해하고, 적절한

경우 후속적으로 당화시켜, 단당류 또는 올리고당류를 포함하는 제1 액체 (1)을 수득하는 단계; 및

[0020] b) 단당류 또는 올리고당류를 포함하는 액체 (1)을, 대사가능한 단당류, 이당류 또는 올리고당류와 함께 또는 대사가능한 단당류 또는 올리고당류를 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 수불용성인 고체가 본질적으로 제거된 조성물과 함께, 발효 조건 하에서 유기 화합물을 초과생산할 수 있는 미생물을 포함하는 발효 배지에 첨가하는 단계

[0021] 를 포함하는, 3개 이상의 탄소 원자 또는 2개 이상의 탄소 원자 및 1개 이상의 질소 원자를 갖는 1종 이상의 유기 화합물의 발효 생산 방법에 관한 것이다.

[0022] 효소적 가수분해에 의해 수득된, 단당류 또는 올리고당류를 포함하는 액체 (1)의 사용은 유기 화합물의 발효 생산시 비용을 현저하게 감소시킨다. 농축 형태의 대사가능한 당 (즉 대사가능한 단당류, 이당류 또는 올리고당류)의 병행 첨가는 또한 발효액의 임의의 목적하지 않는 희석을 방지한다. 또한, 보다 높은 분말기재 농도에서 전분 공급원료의 액화시에 일어날 수 있는 점도 문제가 본 발명에 따른 방법의 결과 방지될 수 있다. 또한, 미생물의 증식으로 인한 문제가 이러한 방식으로 방지될 수 있다.

[0023] 단당류 또는 올리고당류를 포함하는 액체 (1)을 언급하는 경우, 용어 "액체 (1)" 및 "액체 배지 (1)"은 본원 및 이하에서 동의어로 사용될 것이다.

[0024] 본 발명에 따른 방법을 위한 전분 공급원료로 적합한 것은 주로 전분이 건조 상태로 40 중량% 이상, 바람직하게는 50 중량% 이상의 양에 달하는 건조 곡류 또는 종자이다. 이는 현재 대규모로 재배되는 곡류 식물, 예컨대 옥수수, 밀, 귀리, 보리, 호밀, 라이밀, 쌀, 사탕무, 감자, 및 각종 수수 및 기장 종, 예를 들어 소르고(sorgo) 및 마일로(milo) 등 다수에서 발견된다. 전분 공급원료는 바람직하게는 곡류 중, 특히 바람직하게는 옥수수, 호밀, 라이밀 및 밀 날알 중에서 선택된다. 원칙적으로, 본 발명에 따른 방법은 또한 유사한 전분 공급원료, 예를 들어 각종 전분-함유 곡류 또는 종자의 혼합물로도 수행될 수 있다.

[0025] 액체 배지 (1)을 제조하기 위해, 해당 전분 공급원료는 단계 a1)에서 액체, 예를 들어 물을 첨가하거나 또는 첨가하지 않고, 바람직하게는 액체를 첨가하지 않고 분쇄된다. 또한, 건식 분쇄와 후속 습식 분쇄 단계를 조합하는 것도 가능하다.

[0026] 건식 분쇄에 전형적으로 사용되는 기구는 해미 밀, 로터 밀 또는 롤러 밀이며, 습식 분쇄에 적합한 것은 패들 혼합기, 교반 볼 밀, 순환 밀, 디스크 밀, 환상 챔버 밀, 진동 밀 또는 유성 밀이다. 원칙적으로, 다른 밀도 적합하다. 습식 분쇄에 요구되는 액체의 양은 당업자가 일상적인 실험으로 결정할 수 있다. 이는 통상 건조 물질 함량이 10 내지 20 중량% 범위이도록 조정된다.

[0027] 분쇄는 후속 공정 단계에 적합한 입도를 야기한다. 이와 관련하여, 분쇄 단계, 특히 건식 분쇄 단계인 단계 i)에서 수득된 분말기재가 100 내지 630  $\mu\text{m}$ 의 입도를 갖는 4개의 입자, 즉 미립자 구성성분을 30 내지 100 중량%, 바람직하게는 40 내지 95 중량%, 특히 바람직하게는 50 내지 90 중량%의 양으로 갖는 경우 유리하다고 입증되었다. 바람직하게, 수득된 분말기재는 100  $\mu\text{m}$  초과의 입도를 갖는 가루 입자 50 중량%를 포함한다. 일반적으로, 분쇄된 가루 입자의 95 중량% 이상이 2  $\text{mm}$  미만의 입도를 갖는다. 이와 관련하여, 입도는 진동 분석기를 사용하여 스크린 분석에 의해 측정된다. 원칙적으로, 작은 입도가 높은 생성물 수율을 얻는데 유리하다. 그러나, 지나치게 작은 입도는 액화 또는 가공 동안, 예를 들어 발효 단계 후 고체의 건조 동안 분말기재가 슬러리화되는 경우 문제, 특히 덩어리 형성/응집으로 인한 문제를 초래할 수 있다.

[0028] 통상적으로, 가루는 추출률 또는 가루 등급으로 특성화되며, 이를 서로의 상관관계는 추출률 증가에 따라 가루 등급의 특성이 증가한다는 것이다. 추출률은 적용된 분말기재 100 중량부를 기준으로 수득된 가루의 중량에 상응한다. 분쇄 공정 동안, 예를 들어 곡류 날알의 내부로부터 나온 순수한 초미세 가루가 처음에 수득되지만, 추가 분쇄, 즉 추출률이 증가함에 따라 가루 중 조섬유 및 외피(husk)의 양이 증가하고 전분 함량이 감소한다. 따라서, 추출률은 또한 가루 등급으로 알려진 것에 반영되며, 상기 가루 등급은 가루, 특히 곡류 가루를 분류하기 위한 기준으로서 사용되고, 가루의 재 함량 (재 스케일(ash scale)로 알려짐)을 기준으로 한다. 가루 등급 또는 유형 번호는 가루 고체 100 g이 소각되는 경우 남아있는 재 (무기물)의 양 (mg)을 나타낸다. 곡류 가루의 경우, 곡류 날알의 코어는 대략 0.4 중량%의 재를 포함하는 반면, 외피는 대략 5 중량%의 재를 함유하기 때문에, 높은 유형 번호는 높은 추출률을 의미한다. 따라서, 낮은 추출률의 경우 곡류 가루는 세분된 배젖, 즉 곡류 날알의 전분 성분으로 주로 이루어지고, 높은 추출률의 경우 곡류 가루는 또한 알곡의 세분된 단백질-함유 호분층을 포함하며, 조대 가루의 경우 이들은 단백질-함유 및 지방-함유 배아 및 원섬유와 재를 포함하는 종자 외피의 구성성분을 포함한다. 본 발명의 목적상, 추출률이 높거나 유형 번호가 높은 가루가 원칙적으로 바람직

하다. 곡류가 전분 공급원료로서 사용되는 경우, 원형 인을 그의 외피와 함께 분쇄하고, 적절한 경우 배아 및 외피를 미리 기계적으로 제거한 후에 가공하는 것이 바람직하다.

[0029] 본 발명에 따르면, 액체 배지 (1)의 제조에 사용된 분말기재는 추출률에 상응하게, 분쇄된 곡류 날알에 존재하는 비전분 고체 구성성분 일부 이상, 바람직하게는 20 중량% 이상, 특히 50 중량% 이상, 구체적으로는 90 중량% 이상, 매우 구체적으로는 99 중량% 이상을 포함한다. 분말기재의 전분 구성성분 (및 그에 따른 액체 배지 (1) 중 단당류, 이당류 또는 올리고당류의 양)을 기준으로, 분말기재 중 비전분 고체 구성성분은 바람직하게는 10 중량% 이상, 특히 15 중량% 이상, 예를 들어 15 내지 75 중량%, 특히 20 내지 60 중량%의 양에 달한다.

[0030] 단계 a2)에 따른 분말기재의 효소적 가수분해는 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해, 예를 들어 도입부에서 인용된 문헌 [ "The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Chapter 2, p. 7-23]에 기재된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0031] 이를 위해, 분말기재는 수성 액체, 예를 들어 담수, 예를 들어 후속 발효로부터 재순환된 처리수, 또는 이들 액체의 혼합물과 혼합되어, 수성 혼탁액을 제공할 것이다. 이러한 절차는 종종 슬러리화로도 지칭된다.

[0032] 일반적으로, 분말기재 및 수성 액체의 양은, 가수분해에 의해 전체 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류 농도가 100 내지 750 g/kg, 바람직하게는 150 내지 700 g/kg, 특히 200 내지 650 g/kg인 수성 액체 배지 (1)을 제공하는 방식으로 선택된다. 따라서, 분말기재는 전형적으로 혼탁액 (슬러리)의 총 중량을 기준으로 150 내지 800 g/kg, 종종 200 내지 750 g/kg, 특히 250 내지 700 g/kg의 양으로 사용된다.

[0033] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 분말기재 및 수성 액체의 양은, 가수분해에 의해 전체 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류 농도가 100 내지 400 g/kg, 바람직하게는 150 내지 350 g/kg, 특히 200 내지 300 g/kg인 수성 액체 배지 (1)을 제공하는 방식으로 선택된다. 따라서, 분말기재는 전형적으로 혼탁액 (슬러리)의 총 중량을 기준으로 150 내지 550 g/kg, 종종 200 내지 500 g/kg, 특히 250 내지 450 g/kg의 양으로 사용된다. 원칙적으로, 보다 높은 전체 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류 농도, 예를 들어 400 g/kg 초과 내지 700 g/kg, 특히 450 내지 650 g/kg, 또는 500 g/kg 내지 650 g/kg의 농도를 달성하기 위해 보다 많은 양의 분말기재를 사용하는 것도 가능하다.

[0034] 분말기재의 전분 부분의 효소적 가수분해를 위해, 분말기재는 일반적으로 먼저 전분-액화 효소, 통상  $\alpha$ -아밀라제의 존재 하에서 액화될 것이다. 반응 조건 하에서 활성인 다른 효소 및 액화된 안정한 전분이 또한 사용될 수 있다.

[0035] 분말기재에 존재하는 전분을 액화시키기 위해, 원칙적으로 모든 전분-액화 효소, 특히  $\alpha$ -아밀라제 (효소 분류 EC 3.2.1.1), 예를 들어 바실루스 리첸포르미스 또는 바실루스 스태로써모필루스로부터 수득된  $\alpha$ -아밀라제, 구체적으로는 바이오에탄올을 생산할 목적으로 건식 분쇄 방법에 의해 수득된 물질을 액화시키는데 사용되는  $\alpha$ -아밀라제를 사용하는 것이 가능하다. 또한, 액화에 적합한  $\alpha$ -아밀라제가 예를 들어 노보자임즈(Novozymes)에서 명칭 테르마밀 120L, L형(Termamyl 120 L, type L)으로, 또는 제넨코르(Genencor)에서 명칭 스페자임 (Spezyme)으로 시판된다. 여러  $\alpha$ -아밀라제의 조합을 액화에 사용할 수도 있다.

[0036] 이는 분말기재로부터 액화된 전분 부분, 전형적으로는 통상 3 내지 18개, 특히 6 내지 12개의 단당류 단위, 특히 글루코스 단위 및 사용된 분말기재의 비전분 구성성분, 특히 액화에 사용된 분말기재의 고체 비전분 구성성분을 포함하는 액체 배지를 제공한다.

[0037] 전분-액화 효소 및 분말기재의 양은 유리하게는, 겔화 공정 동안 점도가 충분히 감소하여 예를 들어 교반에 의해 혼탁액의 효율적인 혼합을 가능하게 하도록 선택될 것이다. 겔화 공정 동안 반응 혼합물의 점도는 바람직하게는 20 Pas 이하, 더욱 바람직하게는 15 Pas 이하, 가장 바람직하게는 8 Pas 이하이다. 일반적으로, 점도는 M5 측정 시스템 및 MVDIN 기구가 장착된 하케(Haake) 점도계형 로토 비스코(Roto Visko) RV20을 사용하여 50°C의 온도 및 200 s<sup>-1</sup>의 전단 속도에서 측정된다.

[0038]  $\alpha$ -아밀라제 (또는 사용된 전분-액화 효소)는 초기에 반응 용기로 도입되거나 단계 a2) 동안에 첨가될 수 있다. 바람직하게는, 단계 a2)에서 요구되는  $\alpha$ -아밀라제의 일부가 단계 a2)의 시작시 첨가되거나 초기에 반응기로 도입된다.  $\alpha$ -아밀라제의 총량은 사용된 전분 공급원료의 총량을 기준으로 통상 0.002 내지 3.0 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 1.5 중량%, 특히 바람직하게는 0.02 내지 0.5 중량%의 범위이다.

[0039] 액화는 겔화 온도 초과 또는 미만에서 수행될 수 있다. 바람직하게는, 단계 a2)에서의 액화는 사용된 전분의

겔화 온도 초과 또는 젤화 온도에서 적어도 일부 수행한다 (쿠킹 공정으로 알려져 있음). 해당 전분에 요구되는 온도는 당업자에게 공지되어 있거나 (도입부에서 인용된 문헌 ["The Alcohol Textbook - A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Chapter 2, p. 11] 참조) 당업자가 일상적인 실험으로 결정할 수 있다. 일반적으로, 80 내지 165°C, 바람직하게는 90 내지 150°C, 특히 바람직하게는 100 내지 140°C의 온도가 선택되며, 통상 젤화 온도 초과로 5 K 이상, 바람직하게는 10 K 이상, 특히 바람직하게는 20 K 이상, 예를 들어 10 내지 100 K, 특히 20 내지 80 K이다. 상기 온도에서, 전분의 과립 구조가 파괴되어 (겔화되어) 전분의 효소적 분해를 가능하게 한다.

[0040]  $\alpha$ -아밀라제 (또는 사용된 전분-액화 효소)가 최적으로 유효하기 위해서, 단계 a2)는 바람직하게는 액화 효소의 최적 pH, 종종 약산 범위의 pH, 바람직하게는 4.0 내지 7.0, 더욱 바람직하게는 5.0 내지 6.5에서 적어도 일정 시간 동안 수행되며, 상기 pH 조정은 통상 단계 a2) 시작시 또는 그 전에 수행되고, 점검되며, 적절한 경우 액화 공정 동안 상기 pH를 재조정한다. pH는 바람직하게는 희석 무기산, 예컨대  $H_2SO_4$  또는  $H_3PO_4$  또는 희석 알칼리 히드록시드 수용액, 예컨대 NaOH 또는 KOH를 사용하여 조정된다.

[0041] 단계 a2)에서 분말기재 중 전분 부분을 액화시키는 바람직한 실시양태에서, 일부 이상의 분말기재가 수성 액체에 연속식 또는 배치식으로 첨가된다. 바람직하게는, 40 중량% 이상, 특히 50 중량% 이상, 매우 특히 바람직하게는 55 중량% 이상이 액화 공정 동안, 그러나 임의의 당화가 일어나기 전에 반응기에 첨가된다. 종종, 첨가된 양은 90 중량%, 특히 85 중량%, 특히 바람직하게는 80 중량%를 초과하지 않을 것이다. 바람직하게는, 상기 공정 동안 첨가되는 분말기재 부분은 액화 단계 동안 우세한 조건 하에서 반응기에 공급된다. 첨가는 배치식으로, 즉 바람직하게는 각 경우에서 액화될 분말기재의 총량의 30 중량% 이하, 특히 바람직하게는 20 중량% 이하, 예를 들어 1 내지 30 중량%, 특히 2 내지 20 중량%의 양에 달하는 부분으로 여러번에 걸쳐 또는 연속식으로 수행될 수 있다. 이러한 실시양태의 본질적인 측면은, 분말기재의 단지 일부, 바람직하게는 분말기재의 60 중량% 이하, 특히 50 중량% 이하, 특히 바람직하게는 45 중량% 이하가 액화 시작시 반응기에 존재하며, 분말기재의 나머지는 액화 단계 동안 첨가된다는 것이다.

[0042] 액화는 또한 연속식으로, 예를 들어 다단계 반응 캐스케이드로 수행될 수 있다.

[0043] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법의 단계 a2)는, 먼저 분말기재의 총량을 기준으로 60 중량% 이하, 바람직하게는 50 중량% 이하, 특히 바람직하게는 45 중량% 이하, 예를 들어 10 내지 60 중량%, 특히 15 내지 50 중량%, 특히 바람직하게는 20 내지 45 중량%의 양에 달하는 부분을 수성 액체에 혼탁시키고, 이후 액화를 수행하는 방식으로 수행된다.

[0044] 바람직한 실시양태에서, 단계 a2)에서 분말기재의 일부를 불연속 또는 연속 첨가, 특히 여러번 나누어 첨가하는 것은, 액체 배지의 점도가 20 Pas 이하, 바람직하게는 15 Pas 이하, 특히 바람직하게는 8 Pas 이하인 방식으로 수행된다. 점도의 조절을 돋기 위해, 분말기재에 존재하는 전분의 호화 (gelatinization) 온도 초과의 온도에서 첨가된 분말기재의 총량의 25 중량% 이상, 바람직하게는 35 중량% 이상, 특히 바람직하게는 50 중량% 이상을 첨가하는 것이 유리하다고 입증되었다. 또한, 점도 조절은 1종 이상의 전분-액화 효소, 바람직하게는  $\alpha$ -아밀라제 및/또는 1종 이상의 당화 효소, 바람직하게는 글루코아밀라제를 여러번 나누어 첨가함으로써 영향받을 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위해, 적당히 증가된 온도, 예를 들어 40 내지 60°C에서 고체 분말기재를 혼탁시키는데 사용되는 수성 액체를 예비가온시키는 것이 가능하다. 그러나, 실온에서 액체를 사용하는 것이 바람직하다.

[0046] 이어서, 1종 이상의 전분-액화 효소, 바람직하게는  $\alpha$ -아밀라제를 상기 분말기재의 혼탁액에 첨가한다. 분말기재의 일부를 액화 단계 동안만 첨가하는 경우, 시작시 단지  $\alpha$ -아밀라제의 일부, 예를 들어 단계 a2)에서 사용된 전체  $\alpha$ -아밀라제를 기준으로 10 내지 70 중량%, 특히 20 내지 65 중량%을 첨가하는 것이 유리하다. 이 시점에서 제때에 첨가된  $\alpha$ -아밀라제의 양은 사용된 전분 공급원료에 관한 반응 조건 하에서 해당  $\alpha$ -아밀라제의 활성에 좌우되며, 일반적으로 사용된 전분 공급원료의 총량을 기준으로 0.0004 내지 2.0 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 1.0 중량%, 특히 바람직하게는 0.02 내지 0.3 중량%의 범위이다. 별법으로,  $\alpha$ -아밀라제 부분은 혼탁이 수행되기 전에 사용된 액체와 혼합될 수 있다.

[0047] 사용된  $\alpha$ -아밀라제의 양 또는 부분은 바람직하게는, 액화에 사용된 온도, 특히 실온 또는 적당히 증가된 온도, 예를 들어 20 내지 30°C로의 가열을 시작하기 전에 혼탁액에 첨가된다.

[0048] 이렇게 제조된 혼탁액은 이후, 바람직하게는 사용된 전분의 젤화 온도 초과의 온도로 가열된다. 일반적으로,

80 내지 165°C, 바람직하게는 90 내지 150°C, 특히 바람직하게는 100 내지 140°C의 온도가 선택되며, 온도는 바람직하게는 겔화 온도 초과로 5 K 이상, 바람직하게는 10 K 이상, 특히 바람직하게는 20 K 이상, 예를 들어 10 내지 100 K, 특히 20 내지 80 K이다. 점도를 모니터링하면서, 전분 공급원료의 추가 부분, 예를 들어 각 경우에서 사용된 전체 분말기재를 기준으로 1 내지 30 중량%, 특히 2 내지 20 중량%가 점차적으로 전분-함유 혼탁액에 첨가된다. 액화 단계 동안 첨가될 분말기재의 부분을 2개 이상, 바람직하게는 4개 이상, 특히 바람직하게는 6개 이상의 분획으로 반응 혼합물에 첨가하는 것이 바람직하다. 별법으로, 혼탁액을 제조하는데 사용되지 않은 분말기재의 부분은 이 실시양태에서 액화 단계 동안 연속적으로 첨가될 수 있다. 첨가 동안, 온도는 유리하게 전분의 겔화 온도 초과로 유지되어야 한다.

[0049] 목적하는 온도에 도달한 후, 또는 적절한 경우 모든 분말이 첨가된 후, 반응 혼합물은 통상 일정 시간 동안, 예를 들어 10 내지 60분 또는 그 이상 동안, 적절한 경우 전분의 겔화 온도 초과로 설정된, 즉 쿡킹된 온도에서 유지된다. 이어서, 일반적으로, 반응 혼합물은 다소 낮은 온도, 그러나 바람직하게는 겔화 온도 초과, 예를 들어 70 내지 90°C로 냉각된다. 이후, 적절한 경우, α-아밀라제의 추가 부분, 바람직하게는 대부분이 첨가된다. 이 경우, 이 시점에서 제때에 첨가된 α-아밀라제의 양은 사용된 α-아밀라제의 반응 조건 하에서의 활성에 좌우되며, 사용된 전분 공급원료의 총량을 기준으로 바람직하게는 0.002 내지 2.0 중량%, 특히 바람직하게는 0.01 내지 1.0 중량%, 매우 특히 바람직하게는 0.02 내지 0.4 중량%이다.

[0050] 전분을 텍스트린으로 완전히 분해하기 위해, 요오드 또는 적절한 경우 전분 검출을 위한 다른 시험에 의해 전분의 검출이 음성 또는 적어도 본질적으로 음성일 때까지 반응 혼합물을 설정 온도에서 유지하거나 또는 적절한 경우 더 가열한다. 적절한 경우, 예를 들어 사용된 전분 공급원료의 총량을 기준으로 0.001 내지 0.5 중량%, 바람직하게는 0.002 내지 0.2 중량%의 1종 이상의 추가 α-아밀라제 부분이 반응 혼합물에 첨가될 수 있다.

[0051] 별법으로, 전분 부분을 액화시키기 위해, 먼저 스팀을 도입하여 분말기재를 포함하는 수성 혼탁액을 전분 공급원료 또는 분말기재에 존재하는 전분의 호화 온도 초과의 온도로 가열하는 것이 가능하다. 전형적으로, 혼탁액은 해당 호화 온도 초과로 10 K 이상, 특히 20 K 이상, 예를 들어 10 내지 100 K, 특히 20 내지 80 K인 온도에서 가열될 것이다. 특히, 혼탁액은 90 내지 150°C, 특히 100 내지 140°C의 온도로 가열된다.

[0052] 혼탁액을 가열하는데 사용되는 스팀은 전형적으로 온도가 105°C 이상, 특히 110°C 이상, 예를 들어 110 내지 210°C인 과열된 스팀이다. 스팀은 바람직하게는 초과대기압에서 혼탁액에 도입된다. 따라서, 스팀은 바람직하게는 압력이 1.5 bar 이상, 예를 들어 1.5 내지 16 bar, 특히 2 내지 12 bar이다.

[0053] 일반적으로, 스팀은 초과대기압, 바람직하게는 1 내지 10 또는 11 bar, 특히 1.5 내지 5 bar의 초과대기압에서, 바람직하게는 고속으로 혼탁액에 도입된다. 스팀 도입의 결과는 혼탁액이 즉시 90°C 초과의 온도, 즉 호화 온도 초과의 온도로 가열된다는 것이다.

[0054] 스팀으로의 가열은 바람직하게는, 혼탁액의 점도, 공급률 및 장치의 기하구조의 결과인 특정 공급 압력에서 연속적으로 혼탁액으로 충전되고, 혼탁액 충전 구역에서 공급 압력을 기준으로 승압에서 조정가능한 노즐을 통해 고온 스팀으로 충전되는, 연속적 작동 장치에서 수행된다. 승압에서의 스팀 공급은 혼탁액이 가열되는 것뿐만 아니라, 기계적 에너지가 시스템에 도입되며 이 기계적 에너지가 분말기재 입자의 추가 세분을 촉진하고 특히 균일한 에너지 공급을 야기하여 분말기재 중 과립 전분 입자의 특히 균일한 호화를 초래한다는 것을 의미한다. 이러한 장치는 전형적으로 관형 기하구조를 갖는다. 스팀은 바람직하게는 관형 장치의 세로축을 따라 공급된다. 일반적으로, 혼탁액은 45° 이상의 각 또는 직각으로 공급된다. 조정가능한 노즐은 전형적으로 스팀의 유동 방향으로 점점 가늘어지는 원뿔형 기하구조를 갖는다. 세로로 대체가능한 막대 상에 배열된 바늘 또는 원뿔은 상기 노즐 내에 배열된다. 바늘 또는 원뿔은 노즐의 원뿔과 함께 천공을 형성한다. 바늘 또는 막대를 세로로 대체함으로써, 천공의 크기 및 그에 따른 노즐 단부의 횡단면적을 간단한 방식으로 조정할 수 있어, 스팀이 공급되는 속도를 간단한 방식으로 조절할 수 있다.

[0055] 또한 이러한 장치에는 전형적으로 혼합 투브가 장착되어 있으며, 스팀이 공급된 후 상기 혼합 투브로 혼탁액이 전달되고 상기 혼합 투브에서 혼탁액이 장치를 통과한다. 이러한 혼합 투브는 통상 스팀 공급을 따라 공급에 수직으로 배열된다. 전형적으로 혼합 투브 및 노즐은 함께 혼탁액을 전달시키는 천공을 형성한다. 이러한 천공 때문에, 전달 공정 동안 혼탁액에 추가 전단력이 작용하여, 혼탁액에 기계적 에너지의 공급을 증가시킨다. 혼합 투브는 세로로 대체가능한 방식으로 배열될 수 있다. 혼합 투브의 대체는 천공 크기를 조정하여 장치의 압력을 강하시키는 간단한 방법이다.

[0056] 상기 장치는 명칭 제트 쿡커로, 예를 들어 상기 문헌 [ "The Alcohol Textbook", Chapter 2, Figure 13]에 도시

된 장치로 종래 기술로부터 공지되어 있으며, 예를 들어 미국 위스콘신주 워키쇼 소재 히드로 씨멀 코포레이션 (Hydro Thermal Corp.)의 상표명 히드로히터(HYDROHEATER, 등록상표)로 시판된다.

[0057] 반응이 연속적으로 수행되는 경우, 스텀으로 처리된 혼탁액은 통상 후속적으로 후-반응 구역으로 전달되어 전분 구성성분을 계속 결화시킨다. 전형적으로, 초과대기압, 전형적으로 2 내지 8 bar의 절대압이 후-반응 구역에서 우세하다. 후-반응 구역에서의 온도는 전형적으로 90 내지 150°C이다. 이러한 후-반응 구역에서의 체류 시간은 혼탁액의 온도에 따라 1분 내지 4시간일 수 있다. 후-반응 구역은 전형적으로 관형 또는 컬럼 기하구조를 갖는다. 한 실시양태에서, 후-반응 구역은 수직으로 배열된 컬럼의 기하구조를 갖는다. 여기서, 혼탁액은 스텀 처리 장치를 통과한 경우 컬럼의 상부 구역에서 적용되고 하부 구역에서 배출된다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 후-반응 구역은 관형 기하구조를 갖는다.

[0058] 혼탁액이 후-반응 구역을 통과한 후, 통상 압력이 해제된 다음 액화가 수행된다. 압력 해제는 바람직하게는 순간 증발(flash evaporation)의 형태로 수행되어 혼탁액을 바람직하게는 100°C 미만, 특히 85°C 미만의 온도로 냉각시킨다. 일반적으로, 이에 따라 분해된 전분은 이후 별개 반응 용기에서 액화된다. 액화는 상기한 바와 같이 수행될 수 있다.

[0059] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 전분-액화 효소의 일부 이상 또는 모두, 일반적으로 50% 이상, 특히 80% 이상 또는 모두가 스텀 가열 공정 전에 수성 액체 중 분말기재의 혼탁액에 첨가된다. 이러한 방식으로, 혼합물이 호화 온도 초과의 온도로 가열되는 동안 액화 공정은 이미 일어난다. 스텀으로의 가열은 반응 단계 후 적절하게 수행된다. 별개 반응 용기에서의 후속 액화 단계는 필요없을 수 있다. 그러나, 상기 액화 단계는 바람직하게는 전분에서 텍스트린으로의 분해를 완료하기 위해 수행될 것이다.

[0060] 사용된 효소를 안정화시키기 위해,  $\text{Ca}^{2+}$  이온의 농도는 적절한 경우 예를 들어  $\text{CaCl}_2$ 를 사용하여 효소-특이적 최적값으로 조정될 수 있다. 적합한 농도값은 당업자가 일상적인 실험으로 결정할 수 있다. 예를 들어  $\alpha$ -아밀라제로서 테르마밀이 사용되는 경우, 액체 배지 중  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 예를 들어 10 내지 100 ppm, 바람직하게는 20 내지 80 ppm, 특히 바람직하게는 대략 30 내지 70 ppm으로 조정하는 것이 유리하다 (상기 단위 ppm은 중량기준이고 g/1000 kg을 의미함).

[0061] 전분을 텍스트린으로 완전히 분해하기 위해, 요오드 또는 적절한 경우 전분 검출을 위한 다른 시험에 의해 전분의 검출이 음성 또는 적어도 본질적으로 음성일 때까지 반응 혼합물을 설정 온도에서 유지한다. 적절한 경우, 예를 들어 사용된 전분 공급원료의 총량을 기준으로 0.001 내지 0.5 중량%, 바람직하게는 0.002 내지 0.2 중량%의 1종 이상의 추가  $\alpha$ -아밀라제 부분이 반응 혼합물에 첨가될 수 있다.

[0062] 이는 분말기재로부터 액화된 전분 부분, 전형적으로는 텍스트린 및 적절한 경우 추가 올리고당류 및 단당류 또는 이당류, 및 분말기재의 비전분 구성성분, 특히 액화에 사용된 분말기재의 고체 비전분 성분을 포함하는 수성 전분 가수분해물질을 제공한다.

[0063] 전분 액화가 종료된 후, 액체 배지에 존재하는 텍스트린은 공지된 방식 그 자체로 연속식 또는 배치식으로 당화, 즉 글루코스로 분해될 수 있다. 액화된 배지는 특정 당화 탱크에서 완전히 당화된 후 예를 들어 후속 발효 단계에 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 제1 실시양태에서, 후속 발효 전에 단지 부분적 당화만이 수행된다. 예를 들어, 액체 배지에 존재하는 텍스트린의 일부, 예를 들어 텍스트린 (또는 본래 전분)의 총 중량을 기준으로 10 내지 90 중량%, 특히 20 내지 80 중량%가 당화되며 생성된 당-함유 배지가 발효에 사용되는 절차를 따를 수 있다. 이어서, 발효 배지 중 동일 계내에서 추가 당화가 수행될 수 있다. 또한, 별도의 당화 탱크 없이 발효기 (동일 계내)에서 직접 당화가 수행될 수 있다.

[0065] 동일 계내 당화, 즉, 발효기에서 부분적으로 또는 전부 수행되는 당화의 이점은 첫째로 투자 지출 감소, 둘째로 글루코스의 지연 방출이 적절한 경우 사용된 미생물의 억제 또는 대사 변화의 발생 없이 배지에 보다 높은 글루코스 농도를 초기 도입할 수 있다는 것이다. 예를 들어, 이. 콜라이에서 과도하게 높은 글루코스 농도는 유기 산 (아세테이트)의 형성을 초래하지만, 예를 들어, 사카로마이세스 세레비시에는 이러한 경우 공기포화된 발효기에 충분한 산소가 존재하더라도 발효로 전환된다 (크랩트리 효과(crabtree effect)). 글루코스의 지연 방출은 글루코아밀라제 농도를 조절함으로써 조정될 수 있다. 이렇게 함으로써 상기 언급된 효과를 억제하는 것이 가능하고, 더 많은 기질이 초기에 공급될 수 있어 공급된 공급 스트림으로 인한 회색이 감소할 수 있다.

[0066] 액화된 전분 용액에서 텍스트린 (즉 올리고당류)의 당화는 효소에 의해, 즉 1종 이상의 텍스트린-당화 효소의

보조로 수행된다. 이러한 목적에 사용될 수 있는 효소는 원칙적으로 모든 글루코아밀라제 (효소 분류 EC 3.2.1.3), 특히 아스페르길루스로부터 수득된 글루코아밀라제, 구체적으로는 바이오에탄올의 생산과 관련하여 건식 분쇄 방법에 의해 수득된 물질을 당화시키는데 사용되는 글루코아밀라제이다. 당화에 적합한 글루코아밀라제는 또한 예를 들어 노보자임에서 명칭 텍스트로자임 GA(Dextrozyme GA)로, 또는 제넨코르에서 명칭 옵티덱스(Optidex)로 시판된다. 여러 글루코아밀라제의 조합이 사용될 수도 있다.

[0067] 1종 이상의 당화 효소, 특히 1종 이상의 글루코아밀라제는 사용된 전분 공급원료의 총량을 기준으로 통상 0.001 내지 5.0 중량%, 바람직하게는 0.005 내지 3.0 중량%, 특히 바람직하게는 0.01 내지 1.0 중량%의 양으로 액화 후 수득된 텍스트린-함유 액체 배지에 첨가된다.

[0068] 당화가 발효기에서 수행되는 경우, 액화된 전분 용액은 통상 발효 온도, 즉 32 내지 37°C로 냉각된 후 발효기에 공급될 것이다. 이 경우, 당화를 위한 글루코아밀라제 (또는 1종 이상의 당화 효소)는 발효액에 직접 첨가된다. 단계 a2)에 따른 액화된 전분의 당화는 미생물에 의한 당의 대사와 병행하여 일어난다.

[0069] 당화가 당화 탱크에서 일어나는 경우, 액화된 전분 용액은 통상 당화 효소의 최적 온도 또는 약간 미만, 예를 들어 50 내지 70°C, 바람직하게는 60 내지 65°C로 냉각 또는 가온되고, 이후 글루코아밀라제로 처리된다.

[0070] 당화 효소, 특히 글루코아밀라제를 첨가하기 전에 액체 배지의 pH를 사용된 글루코아밀라제의 최적 활성 범위 내의 값, 바람직하게는 3.5 내지 6.0, 특히 바람직하게는 4.0 내지 5.5, 매우 특히 바람직하게는 4.0 내지 5.0 범위 내의 값으로 조정하는 것이 유리하다. 그러나, 특히 발효기에서 직접 당화를 수행하는 경우, pH를 상기 언급된 범위 밖의 값, 예를 들어 6.0 초과 내지 8.0 범위 내의 값으로 조정하는 것도 가능하다. 이는 전반적으로 예를 들어 상기 pH 범위에서 표준 글루코아밀라제의 제한된 활성에도 불구하고 리신, 판토텐에이트 및 비타민 B<sub>2</sub>의 발효 생산에 유리하거나 또는 설정된 발효 조건의 결과로서 필요할 수 있다.

[0071] 바람직한 실시양태에서, 당화는 특정 당화 탱크에서 수행된다. 이를 위해, 액화된 전분 용액은 효소에 최적인 온도 또는 약간 미만으로 가온되고, pH는 상기 방식으로 효소에 최적인 값으로 조정된다.

[0072] 당화 효소의 첨가 후, 텍스트린-함유 혼탁액은 바람직하게는 예를 들어 2 내지 72시간 이상, 필요한 경우 특히 5 내지 48시간의 기간 동안 설정된 온도에서 유지되며, 상기 시간 동안 텍스트린은 당화되어 단당류를 제공한다. 당화 공정의 진행은 당업자가 공지된 방법, 예를 들어 HPLC, 효소 분석 또는 글루코스 시험대를 사용하여 모니터링할 수 있다. 단당류 농도가 더이상 실질적으로 증가하지 않거나 또는 다시 감소하지 않는 경우 당화는 종료되었다.

[0073] 일반적으로 전분 공급원료의 구성성분의 일부 이상 또는 모두를 포함하는 분말기재가 당-함유 액체 배지 (1)의 제조에 사용되기 때문에 (즉 전분 공급원료의 비전분 고체 구성성분이 제거되지 않거나 또는 완전히 제거되지 않음), 수득된 액체 배지 (1)은 또한 전분 공급원료의 비전분 고체 구성성분의 일부 또는 모두를 포함한다. 이는 종종 예를 들어 곡류로부터 일정량의 피테이트의 도입을 야기하며, 이 양을 간과해서는 안된다. 이에 따라 발생되는 억제 효과를 방지하기 위해, 단계 a2)에서 1종 이상의 피타제를 액체 배지에 첨가한 후 당-함유 액체 배지를 발효 단계에 제공하는 것이 유리하다.

[0074] 피타제는, 각각 고온에 충분히 안정하다면 액화 또는 당화 전, 동안 또는 후에 첨가될 수 있다.

[0075] 각 경우에 그의 활성이 반응 조건 하에서 매우 약간 영향받는 한 임의의 피타제가 사용될 수 있다. 사용된 피타제는 바람직하게는 열 안정성 (T50)이 50°C 초과, 특히 바람직하게는 60°C 초과이다.

[0076] 피타제의 양은 통상 전분 공급원료 1 kg 당 1 내지 10000 단위, 특히 전분 공급원료 1 kg 당 10 내지 4000 단위이다.

[0077] 전체 당 수율을 증가시키기 위해 또는 유리 아미노산을 수득하기 위해, 추가 효소, 예를 들어 풀룰라나제, 셀룰라제, 해미셀룰라제, 글루카나제, 크실라나제, 글루코시다제 또는 프로테아제가 당-함유 액체 배지의 생산 동안 반응 혼합물에 추가로 첨가될 수 있다. 이들 효소의 첨가는 점도에 긍정적인 효과를 미칠 수 있으며, 즉 점도가 감소할 수 있으며 (예를 들어 장쇄 글루칸 및/또는 (아라비노-)크실란의 절단에 의함), 대사가능한 글루코시드의 유리 및 (잔류) 전분의 유리를 야기할 수 있다. 프로테아제의 사용은 유사한 긍정적 효과를 가지며, 추가로 발효에 대한 성장 인자로서 작용하는 아미노산을 유리시킬 수 있다.

[0078] 당화가 수행되는지 또는 수행되지 않는지 여부에 좌우되면서, 본원에 기재된 단계 a1) 및 a2)의 적용이 텍스트린 또는 단당류 또는 이당류를 포함하며 상기 언급된 범위의 전체 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류 농도를

갖는 액체 배지를 생성한다.

[0079] 당화 후 액체 배지 (1)에 존재하는 당은 특히 글루코스이며, 글루코스 이외의 추가 단당류, 예컨대 헥소즈 및 펜토즈, 예를 들어 프룩토스, 만노스, 갈락토스, 소르보스, 크실로스, 아라비노스 및 리보스가 존재할 수 있다. 글루코스 이외의 단당류의 양은 사용된 전분 공급원료 및 그 내에 존재하는 비전분 구성성분에 좌우될 수 있으며, 공정 조절, 예를 들어 세룰라제의 첨가에 의한 세룰로즈 구성성분의 분해에 의해 영향받을 수 있다. 당-함유 액체 배지의 단당류는 바람직하게는 당-함유 액체 배지에 존재하는 당의 총량을 기준으로 60 중량% 이상, 종종 70 중량% 이상, 특히 80 중량% 이상, 구체적으로는 85 중량% 이상의 글루코스 함량을 포함한다. 글루코스 함량은 통상 당-함유 액체 배지에 존재하는 당의 총량을 기준으로 75 내지 99.9 중량%, 특히 80 내지 99 중량%, 구체적으로는 85 내지 97 중량%이다. 당화가 수행되지 않는 경우, 배지 (1)에 존재하는 단당류, 이당류 및 올리고당류 중 텍스트린의 양은 본질적으로 글루코스의 양에 상응한다.

[0080] 당화가 수행되지 않는 경우, 대사가능한 글루코스 동등물은 본질적으로 올리고당류, 특히 텍스트린의 형태로 존재한다. 이를 올리고당류 또는 텍스트린의 주요 구성성분은 전형적으로 글루코스이며, 또한 배지는 소량의 단당류 및/또는 이당류 및 다른 단당류 단위로 이루어진 올리고당류를 포함할 수 있다. 이러한 경우, 액체 배지 (1) 중 당-함유 구성성분, 즉 단당류, 이당류 및 올리고당류는 전형적으로 60 중량% 이상, 종종 70 중량% 이상, 특히 80 중량% 이상, 구체적으로는 90 중량% 이상의 올리고당류, 특히 텍스트린을 포함하며, 즉 단당류 및 이당류는 40 중량% 미만, 종종 30 중량% 미만, 특히 20 중량% 미만, 구체적으로는 10 중량% 미만의 양이다. 유리 또는 결합 형태로 존재하는 글루코스는 통상 글루코스 동등물의 총량을 기준으로 배지 (1)의 글루코스 동등물의 50 내지 99 중량%, 특히 75 내지 97 중량%, 구체적으로는 80 내지 95 중량%의 양에 달한다.

[0081] 본 발명에 따라, 후속 발효는 액체 배지 (1) 및 액체 배지 이외에 대사가능한 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류의 공급원료 (이하에서 당 공급원료로도 지칭됨) 둘 다를 사용하여 수행된다. 이러한 목적에 사용되는 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류는 그 자체로 또는 대사가능한 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류를 배지의 총 중량을 기준으로 50 중량% 이상, 바람직하게는 60 중량% 이상의 농도로 포함하며 수성 액체 배지 (1)과 반대로 수불용성인 고체가 본질적으로 제거된 조성물의 형태로 사용될 수 있다.

[0082] 당 공급원료에 존재하는 단당류, 이당류 또는 올리고당류는 바람직하게는 단당류, 통상 헥소즈 및/또는 펜토즈, 예를 들어 글루코스, 프룩토스, 만노스, 갈락토스, 소르보스, 크실로스, 아라비노스 및 리보스, 구체적으로는 글루코스, 프룩토스 및 갈락토스, 및 이당류, 예컨대 수크로스, 말토스, 락토스, 구체적으로는 수크로스 중에서 선택된다. 또한, 단당류와 이당류의 혼합물, 및 높은 비율의 혼입 글루코스 성분을 갖는 올리고당류, 및 이들과 단당류 및/또는 이당류의 혼합물도 적합하다.

[0083] 대사가능한 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류를 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 수불용성인 고체가 본질적으로 제거된 조성물의 예에는 글루코스 시럽, 수크로스 시럽, 진한 쥬스, 말토스 시럽, 텍스트린 시럽뿐만 아니라 당 생산으로부터의 폐기물 (당밀), 특히 사탕무 당 생산으로부터의 당밀 및 사탕수수 당 생산으로부터의 당밀이 포함된다.

[0084] 주로 단당류 및/또는 이당류, 특히 글루코스 및/또는 수크로스를 포함하는 물질, 및 글루코스 및/또는 수크로스 및 높은 비율의 혼입 글루코스 성분을 갖는 올리고당류, 예를 들어 글루코스, 수크로스, 글루코스 시럽, 수크로스 시럽, 진한 쥬스 및 당밀을 포함하는 혼합물이 특히 바람직하다.

[0085] 액체 배지 (1)처럼, 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류, 및 이들을 포함하는 조성물은 초기에 발효 배지 (배치 단계)를 제조하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 유가식 (fed-batch) 또는 반연속식으로 수행되는 경우 발효 동안 공급에 사용될 수 있다.

[0086] 액체 배지 (1)의 첨가에 의해 발효에 도입된 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류의 총량은 바람직하게는 발효에 도입된 단당류, 이당류 및 올리고당류의 총량의 40 중량% 이상, 특히 50 중량% 이상, 특히 바람직하게는 60 중량% 이상, 예를 들어 40 내지 95 중량%, 특히 50 내지 90 중량%, 구체적으로는 60 내지 90 중량%를 차지한다.

[0087] 액체 배지 (1) 및 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류, 또는 이들을 포함하는 조성물은 서로 별도로 또는 함께 발효에 공급될 수 있다.

[0088] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 액체 배지 (1) 및 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류, 또는 이들을 포함하는 조성물은 서로 혼합된 후 발효에 공급된다. 따라서, 일반적으로 100 내지 400 g/kg의 낮은 전체 단당류, 이당류 및 올리고당류 농도를 갖는 액체 배지를 사용하는 경우, 단계 a1) 및 a2) 후에 수득된 당-함유 액체 배지

(1)의 전체 당 함량은 바람직하게는 50 g/kg 이상, 특히 100 g/kg 이상, 구체적으로는 150 g/kg 이상, 예를 들어 50 내지 300 g/kg, 특히 100 내지 250 g/kg, 구체적으로는 120 내지 200 g/kg 증가하여 총 중량을 기준으로 40 중량% 이상, 바람직하게는 45 중량% 이상, 특히 50 중량% 이상, 특히 바람직하게는 55 중량% 이상을 차지한다.

[0089] 이들 당 공급원료를 액체 배지 (1)에 첨가한 후, 생성된 액체 배지는 바람직하게는 건조 물질 함량이 총 중량을 기준으로 45 내지 80 중량%, 특히 바람직하게는 50 내지 75 중량%, 또는 55 내지 75 중량%이다. 이와 반대로, 예를 들어 온도 조정에 의해 액체 배지 (1)의 점도를 조절하여 최대값 20 Pas, 특히 바람직하게는 15 Pas, 매우 특히 바람직하게는 8 Pas를 초과하지 않도록 하는 것이 유리하다.

[0090] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 단당류 및/또는 이당류는 당 생산으로부터 글루코스- 또는 수크로스-포함 부산물의 형태로 제1 액체 배지 (1)에 첨가된다. 그 예는 사탕수수 당 또는 특히 사탕무 당으로부터 당 생산시 생성된 당밀이다.

[0091] 본 발명에 따르면, 단계 a1) 및 a2)에서 제조된 액체 배지 (1) 및 이들과 상이한 당 공급원료는 발효에 공급되어 미생물의 배양에 사용된다. 발효에서, 미생물 다새물질은 미생물에 의해 생산된다.

[0092] 발효는 당업자에게 공지된 통상적인 방식으로 수행될 수 있다. 이를 위해, 목적하는 미생물이 통상 본원에 기재된 방법에 의해 수득된 액체 배지에서 배양될 것이다.

[0093] 발효 방법은 배치식 또는 유가식 (중간 수득물을 갖는 유가식 포함)으로 수행될 수 있으며, 유가식 방법이 바람직하다.

[0094] 예를 들어, 본 발명에 따른 방법에 의해 수득된 액체 배지 (1) 또는 통상적인 당 공급원료, 즉 대사가능한 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류, 또는 대사가능한 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류를 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 전형적으로는 수불용성인 고체가 본질적으로 제거된 조성물, 또는 이들의 혼합물은, 적절한 경우 물로 희석되고 통상적인 배지 구성성분, 예컨대 완충액, 영양분 염, 황산암모늄 및 우레아 등과 같은 질소 공급원, 이스트 추출물, 펩톤 및 CSL 등과 같은 아미노산을 포함하는 복합 영양 배지 구성성분이 첨가된 후 목적하는 미생물로 접종될 수 있으며, 상기 미생물은 미생물 농도가 발효에 필요한 정상 상태에 이를 때까지 발효 조건 하에서 증식할 수 있다. 여기서, 액체 배지 (1)에 존재하는 당은 대사되며, 목적하는 대사물질이 형성된다 (배치 공정 또는 배치 단계로도 알려짐).

[0095] 유가 공정을 수행하는 경우, 발효 공정은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득가능한 추가 액체 배지 (1) 및 액체 배지 (1) 이외의 당 공급원을 공급하여, 특히 액체 배지 (1)을 액체 배지 (1) 이외의 당 공급원료와 혼합하여 수득된 액체 배지를 공급하여 계속될 것이고, 미생물에 의해 초과생산된 대사물질은 발효액에 축적되며, 대사물질은 미생물의 세포내 및 발효 배지의 수성상 둘 다에 존재할 수 있다.

[0096] 발효는 바람직하게는 유가 공정으로 수행될 것이다. 이를 위해, 먼저 당-함유 액체 배지, 예를 들어 액체 배지 (1) 또는 다른 당 공급원료를 사용하여 발효기에 목적하는 미생물 농도가 도달될 때까지 미생물을 증식시키는 절차를 따를 것이다. 이후, 액체 배지 (1)을 추가 당 공급원료, 즉 대사가능한 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류 또는 대사가능한 단당류, 이당류 및/또는 올리고당류를 50 중량% 이상의 농도로 포함하며 수불용성인 고체가 본질적으로 제거된 배지와 함께 발효기에 공급한다. 이는 발효 공정을 유지시키며, 미생물에 의해 초과생산된 대사물질은 발효액에 축적된다 (상기 참조). 공급된 당-함유 액체 배지 (1) 및 추가 당 공급원료 대 초기 에 도입되며 미생물을 포함하는 배치 배지의 부피비는 일반적으로 대략 1:10 대 10:1, 바람직하게는 대략 1:5 대 5:1, 특히 1:1 대 5:1이다. 발효액 중 당 함량은 특히 당-함유 액체 배지의 공급률을 통해 조절될 수 있다. 일반적으로, 공급률은 발효액 중 단당류 함량이 0 중량% 초과 내지 대략 5 중량%의 범위 내, 특히 3 중량%의 값을 초과하지 않도록 조정될 것이다.

[0097] 단계 a2)에서 수득된 당-함유 액체 배지 또는 이들과 추가 당 공급원료의 혼합물은 적절한 경우 발효 전에 멸균될 수 있으며, 미생물은 통상 열 또는 화학 방법에 의해 파괴된다. 이를 위해, 당-함유 액체 배지는 통상 80°C 초과의 온도로 가열된다. 세포의 파괴 또는 용균은 발효 직전에 일어날 수 있다. 이를 위해, 모든 당-함유 액체 배지가 용균 또는 파괴에 제공된다. 이는 열적, 기계적 또는 화학적 수단에 의해 수행될 수 있다.

[0098] 본 발명은 특히 3개 이상의 탄소 원자 또는 2개 이상의 탄소 원자 및 1개 이상의 질소 원자를 갖는 유기 비휘발성 화합물의 생산 방법에 관한 것이다. 이와 관련하여, 비휘발성 유기 화합물은 분해되지 않고서는 발효액으로부터 증류에 의해 회수될 수 없는 화합물을 의미하는 것으로 이해된다. 일반적으로, 이러한 화합물의 비점은 대기압 하에서 물의 비점 초과, 종종 150°C 초과, 특히 200°C 초과이다. 일반적으로, 이들은 표준 조건 (298

K, 101.3 kPa) 하에서 고체 상태로 존재하는 화합물이다.

[0099] 그러나, 또한 대기압 하에서 물의 비점 미만의 용점 및/또는 유성 컨시스턴시(consistency)를 갖는 비휘발성 미생물 대사물질의 생산을 위한 발효에 본 발명에 따른 당-함유 액체 배지를 사용하는 것도 가능하다.

[0100] 용어 비휘발성 미생물 대사물질은 특히, 바람직하게는 3 내지 10개의 탄소 원자를 가지며 적절한 경우 이들에 부착된 1개 이상, 예를 들어 1, 2, 3 또는 4개의 히드록실기를 갖는 유기 모노-, 디- 및 트리카르복실산, 예를 들어 타르타르산, 이타콘산, 숙신산, 프로페온산, 락트산, 3-히드록시프로페온산, 푸마르산, 말레산, 2,5-푸란디카르복실산, 글루타르산, 레불산, 글루콘산, 아코니트산 및 디아미노페넬산, 시트르산; 단백질생성(proteinogenic) 및 비단백질생성 아미노산, 예를 들어 리신, 글루타메이트, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파르트산, 트립토판 및 트레오닌; 퓨린 및 피리미딘 염기; 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드, 예를 들어 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD) 및 아데노신-5'-모노포스페이트 (AMP); 리피드; 바람직하게는 10 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 포화 및 불포화 지방산, 예를 들어  $\gamma$ -리놀렌산, 디호모- $\gamma$ -리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타eno산 및 도코사헥사에노산; 바람직하게는 3 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 디올, 예를 들어 프로판디올 및 부탄디올; 3개 이상, 예를 들어 3, 4, 5 또는 6개의 OH기를 갖는 다가 알콜 (또한 보다 높은 관능기를 갖는 알콜로도 지칭됨), 예를 들어 글리세롤, 소르비톨, 만니톨, 크실리톨 및 아라비니톨; 4개 이상의 탄소 원자, 예를 들어 4 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 장쇄 알콜, 예를 들어 부탄올; 탄수화물, 예를 들어 히알루론산 및 트레할로스; 방향족 화합물, 예를 들어 방향족 아민, 바닐린 및 인디고; 비타민 및 프로비타민, 예를 들어 아스코르브산, 비타민 B<sub>6</sub>, 비타민 B<sub>12</sub> 및 리보플라빈, 보조인자 및 영양보조물로서 알려진 것; 단백질, 예를 들어 효소, 예컨대 아밀라제, 펙티나제, 산, 혼성 또는 중성 셀룰라제, 에스테라제, 예컨대 리파제, 판크레아제, 프로테아제, 크실라나제 및 옥시도리덕타제, 예컨대 락카제, 카탈라제 및 퍼옥시다제, 글루카나제, 페타제; 카로테노이드, 예를 들어 라이코펜,  $\beta$ -카로텐, 아스탁산틴, 제악산틴 및 칸탁산틴; 바람직하게는 3 내지 10개의 탄소 원자 및 적절한 경우 1개 이상의 히드록실기를 갖는 케톤, 예를 들어 아세톤 및 아세토인; 락톤, 예를 들어  $\gamma$ -부티로락톤, 시클로덱스트린, 생중합체, 예를 들어 폴리히드록시아세테이트, 폴리에스테르, 예를 들어 폴리락터id, 폴리사카라이드, 폴리이소프레노이드, 폴리아미드; 및 상기 언급된 화합물의 전구체 및 유도체를 포함한다. 비휘발성 미생물 대사물질로서 적합한 다른 화합물은 문헌 [Gutcho in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086]에 기재되어 있다.

[0101] 용어 "보조인자"는 정상적인 효소 활성의 발생에 필요한 비단백질성 화합물을 포함한다. 이들 화합물은 유기 또는 무기일 수 있으며, 바람직하게 본 발명의 보조인자 분자는 유기이다. 이러한 분자의 예로는 NAD 및 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP)가 있으며, 이들 보조인자의 전구체는 니아신이다.

[0102] 용어 "영양보조물"은 식물 및 동물, 특히 인간의 건강을 촉진하는 식품 첨가제를 포함한다. 이러한 분자의 예로는 비타민, 항산화제 및 특정 리피드, 예를 들어 다불포화 지방산이 있다.

[0103] 생산된 대사물질은 특히 효소, 아미노산, 비타민, 이당류, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 모노- 및 디카르복실산, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 히드록시카르복실산, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 케톤, 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알칸올 및 3 내지 10개, 특히 3 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 알칸디올 중에서 선택된다.

[0104] 이와 같이 발효에 의해 생산된 화합물이 각 경우에서 사용된 미생물에 의해 생산된 거울상이성질체 형태로 수득된다는 것 (상이한 거울상이성질체가 존재하는 경우)은 당업자에게 명백하다. 따라서, 아미노산의 경우 일반적으로 각각의 L-거울상이성질체가 수득된다.

[0105] 발효에 사용되는 미생물은 하기에서 상세하게 명시된 바와 같이 공지된 방식 그 자체로 해당 미생물 대사물질에 의존한다. 이들은 자연 발생되거나 유전적으로 변형될 수 있다. 적합한 미생물 및 발효 방법의 예는 하기 표 A에 제시한 것이다.

표 A

물질	미생물	참고문헌
타르타르산	락토바실루스 (예를 들어 락토바실루스 멜브뢰키)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
이타콘산	아스페르길루스 테레우스, 아스페르길루스 이타코니쿠스	Jakubowska, in Smith and Pateman (Eds.), Genetics and Physiology of Aspergillus, London: Academic Press 1977; Miali, in Rose (Ed.), Economic Microbiology, Vol. 2, pp. 47 –119, London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962).
숙신산	악티노바실루스 종 130Z, 아내로비오스퍼릴룸, 숙시니프로두센스, 악티노바실루스 숙시노제네스, o. 콜라이	Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498 –504 (1976); EP 249773 (1987), Inventors: Lemme and Datta; US 5504004 (1996), Inventors: Guettler, Jain and Soni; Arch. Microbiol. 167, 332 –342 (1997); Guettler MV, Rumler D, Jain MK., <i>Actinobacillus succinogenes</i> sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan; 49 Pt 1:207-16; US 5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO 99/06532, US 5,869,301, US 5,770,435.
히드록시프로피온산	락토바실루스 멜브뢰키, 엘 레이크만니 또는 스포로락토바실루스 이눌리누스	RÖMPP Online Version 2.2.
프로피온산	프로피오나박테리움, 예를 들어 피. 아라비노슘, 피. 셰르마니, 피. 프레우텐레이키, 클로스트리디움 프로피오나쿰	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
디아미노피엘산	코리네박테리움 글루타미쿰	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
시트르산	아스페르길루스 나거, 아스페르길루스 웬티	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221–234 (1993); 10, 13–27 (1996).

[0106]

물질	미생물	참고문헌
아코니트산	아스페르길루스 니거, 아스페르길루스 웬티	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331 –373 (1986); Food Biotechnol. 7, 221–234 (1993); 10, 13–27 (1996).; Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995.
말산	아스페르길루스, 예를 들어 아스페르길루스 플라부스, 에이. 니거, 에이. 오리제, 코리네박테리움	US 3,063,910.
글루콘산	아스페르길루스, 예를 들어 에이. 니거	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
부티르산	클로스트리디움 (예를 들어 클로스트리디움 아세토부티리움, 씨. 부티리움)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995.
락트산	락토바실루스, 예를 들어 엘. 멜브록키, 엘. 레이크만니	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995.
리신	코리네박테리움 글루타미움	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
글루타메이트	코리네박테리움 글루타미움	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
메티오틴	코리네박테리움 글루타미움	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
페닐알라닌	코리네박테리움 글루타미움, 이. 콜라이	Trends Biotechnol. 3, 64 –68 (1985); J. Ferment. Biolog. 70, 253–260 (1990).
트레오닌	이. 콜라이	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35.
아스파르트산	이. 콜라이	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35 및 여기에서 인용된 참고문헌; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).

[0107]

물질	미생물	참고문헌
퓨린 및 파리미딘 염기	바실루스 서브틸리스	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD)	바실루스 서브틸리스	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
아데노신-5'- 모노포스페이트 (AMP)	바실루스 서브틸리스	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
$\gamma$ -리놀렌산	뮤코, 모르티엘라, 아스페르길루스 종	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregularare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
디호모- $\gamma$ -리놀렌산	모르티엘라, 코니디오볼루스, 사프로레그니아 종	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregularare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
아라키돈산	모르티엘라, 파티움 종	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregularare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
에이코사펜타에 노산	모르티엘라, 파티움 종, 로도슈도모나스, 체와렐라 종	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregularare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
도코사헥사에노 산	트라우스토키트리움, 헵토모포토라 종, 로도슈도모나스,	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409; Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregularare for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).

[0108]

물질	미생물	참고문헌
	세와넬라 종	for Lipid Production. Master Thesis Louisiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855).
프로판디올	이. 콜라이	DE 3924423, US 440379, WO 9635799, US 5164309.
부탄디올	엔테로박터 에로제네스, 바실루스 서브틸리스, 클레브시엘라 옥시토카	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 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-butane diol. CIT 64 (6), 2004, 570-571.
부탄올	클로스트리디움 (예를 들어, 클로스트리디움 아세토부티리쿰, 씨. 프로파오니쿰)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
글리세롤	이스트, 사카로마이세스 로우시	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
만니톨	아스페르길루스 칸디다, 토풀로프시스 만니토파시엔스	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
아라비톨	사카로마이세스 로우시, 에스. 멜리스, 스클레로티움 글루카니쿰, 피카야 오메리	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
크실리톨	사카로마이세스 세레비시에	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
히알루론산	스트렙토코쿠스 종	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995;

[0109]

물질	미생물	참고문헌
트레할로스	브레비박테리움, 코리네박테리움, 마이크로박테리움, 아르트로박터 종, 플라우로토스 재누스, 펠로바시디움 플로리포르메	JP 05099974, JP 06311891, FR 2671099, EP 0555540, JP 3053791, Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: Trehalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, <i>Filobasidium floriforme</i> . Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319.
아스코르브산	글루코노박터 멜라노제네스	RÖMPP Online Version 2.2.
비타민 B <sub>12</sub>	프로피오니박테리움 종, 슈도모나스 데니트리피카스	Chem. Ber. 1994, 923 –927; RÖMPP Online Version 2.2.
리보플라빈	바실루스 서브틸리스, 아첨비아 고시페	WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664; Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48.
비타민 B <sub>6</sub>	리조비움 트로피시, 알. 멜리로티	EP0765939.
효소	아스페르길루스 (예를 들어 아스페르길루스 니거, 예이. 오리제), 트리코테르마, 이. 콜라이, 한세놀라 또는 피키아 (예를 들어 피키아 파스토리우스), 바실루스 (예를 들어 바실루스 리케니포르미스 비. 서브틸리스), 및 그외 다수	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
제악산틴	두나리엘라 사리나	Jin et al (2003) Biotech.Bioeng. 81:115–124.
칸탁산틴	브레비박테리움	Nelis et al (1991) J Appl Bacteriol 70:181–191.

물질	미생물	참고문헌
라이코펜	블라케슬레아 트리스포라, 칸디다 유밀리스	WO 03/056028, EP 01/201762, WO 01/12832, WO 00/77234, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229.
β-카로텐	블라케슬레아 트리스포라, 칸디다 유밀리스	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene from Blakeslea trispora with Span 20, Biotechnology Letters, Vol 19, No 6, 1997, 561-562; Mantouridou F., Roukas T.: Effect of the aeration rate and agitation speed on beta-carotene production and morphology of Blakeslea trispora in a stirred tank reactor: mathematical modelling, Biochemical Engineering Journal 10 (2002), 123-135; WO 93/20183; WO 98/03480, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229.
아스탁산틴	파파야 로도자마, 칸디다 유밀리스	US 5,599,711; WO 91/02060, Miura et al (1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229.
폴리히드록시알 카노에이트, 폴리에스테르	에체르카야 콜리, 알카리제네스 라투스, 및 그외 다수	S. Y. Lee, Plastic Bacteria Progress and Prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, Vol. 14, (1996), pp. 431-438., Steinbüchel, 2003; Steinbüchel (Ed.), Biopolymers, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim 및 여기에서 인용된 참고문헌.
폴리사카라이드	류코노스톨 메센테로이데스, 엘. 텍스트라니콤, 크산토모나스 캄페스트리스, 및 그외 다수	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).
폴리이소프레노 이트	락타리우스 종, 히그로포루스 종, 루술라 종	Steinbüchel (Ed.), Biopolymers, 1st ed., 2003, Wiley-VCH, Weinheim 및 여기에서 인용된 참고문헌.
아세톤	클로스트리디움 (예를 들어 클로스트리디움 아세토부티리쿰, 씨. 프로파오나殂)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980 and 1993-1995; Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973).

[0111]

물질	미생물	참고문헌
아세토인	엔테로박터 에로제네스, 클로스트리디움 아세토부티리쿰, 락토코쿠스 락티스	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G.: Eds., <i>Biology of the Prokaryotes</i> , Thieme, Stuttgart (1999), p. 307; RÖMPP Online-Edition.
바닐린	슈도모나스 푸티다, 아미코라톱시스 종	Priefert, H., Rabenhorst, J., Seinbüchel, A. <i>Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 56, 296-314 (2001).
투린겐신	바실루스 투린기엔시스	Jian-Zhong Jong et al.: Fed-batch culture of <i>Bacillus thuringiensis</i> for thuringensin production in a tower type bioreactor. <i>Biotechnology and Bioengineering</i> 48 (3) (2004), 207-213.
폴리케티드	스트렙토마이세스 프라디에, 소란지음 셀룰로솔	Kirst: Fermentation-derived compounds as a source for new products. <i>Pure &amp; Appl. Chem.</i> 70 (2), (1998), 335-338; Zirkle et al.: Heterologous production of the antifungal polyketide antibiotic soraphen A of <i>Sorangium cellulosum</i> So ce26 in <i>Streptomyces lividans</i> . <i>Microbiology</i> 150 (8), (2004), 2761-74.
지베렐산	지베렐라 푸자쿠로이	Hollmann et al.: Extractive fermentation of Gibberellic acid using <i>Gibberella fujikuroi</i> . <i>CIT</i> 7 (1995), 892-895.
인디고	에체리키아 콜리 JB 102	Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler, W.: Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. <i>Journal of Industrial Microbiology &amp; Biotechnology</i> 28 (2002), 127-133.

[0112]

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 생산된 유기 화합물은 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖고 임의로 부착된 히드록실기를 갖는 모노-, 디- 및 트리카르복실산, 단백질생성 및 비단백질생성 아미노산, 퓨린 염기, 피리미딘 염기; 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 리피드; 포화 및 불포화 지방산; 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 디올, 3개 이상의 히드록실기를 갖는 다가 알콜, 4개 이상의 탄소 원자를 갖는 장쇄 알콜, 탄수화물, 방향족 화합물, 비타민, 프로비타민, 보조인자, 영양보조물, 단백질, 카로테노이드, 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 케톤, 락тон, 생중합체 및 시클로텍스트란 중에서 선택된다.

[0114]

본 발명의 제1 바람직한 실시양태는 피타제, 크실라나제 또는 글루카나제와 같은 효소의 발효 생산에서 본 발명에 따라 수득될 수 있는 당-함유 액체 배지의 용도에 관한 것이다.

[0115]

본 발명의 제2 바람직한 실시양태는 리신, 메티오닌 및 트레오닌과 같은 아미노산의 발효 생산에서 본 발명에 따라 수득될 수 있는 당-함유 액체 배지의 용도에 관한 것이다.

[0116]

본 발명의 추가 바람직한 실시양태는 판토텐산 및 리보플라민과 같은 비타민, 및 그 전구체 및 유도체의 발효 생산에서 본 발명에 따라 수득될 수 있는 당-함유 액체 배지의 용도에 관한 것이다.

[0117]

본 발명의 추가 바람직한 실시양태는

[0118]

- 모노-, 디- 및 트리카르복실산, 특히 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 모노- 및 디카르복실산, 예컨대 프로피온산, 푸마르산 및 숙신산;

[0119]

- 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 히드록시카르복실산, 예컨대 락트산;

[0120]

- 상기 언급된 장쇄 알칸올, 특히 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알칸올, 예컨대 부탄올;

[0121]

- 상기 언급된 디올, 특히 3 내지 10개, 특히 3 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 알칸디올, 예컨대 프로판디올;

[0122]

- 상기 언급된 케톤, 특히 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 케톤, 예컨대 아세톤; 및

[0123]

- 상기 언급된 탄수화물, 특히 이당류, 예컨대 트레할로스

[0124]

의 발효 생산에서 본 발명에 따라 수득될 수 있는 당-함유 액체 배지의 용도에 관한 것이다.

[0125]

추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 폴리히드록시알카노에이트, 예컨대 폴리-3-히드록시부티레이트 및 다른 유기 히드록시카르복실산, 예컨대 3-히드록시발레르산, 4-히드록시부티

르산 및 상기 문헌 [Steinbuechel]에 기재된 것 (예를 들어 장쇄 히드록시카르복실산, 예컨대 3-히드록시옥탄산, 3-히드록시데칸산 및 3-히드록시테트라데칸산을 포함함)과의 코폴리에스테르, 및 이들의 혼합물이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 문헌 [S.Y. Lee, Plastic Bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech, Vol. 14, (1996), pp. 431-438]에서 다른 탄소 공급 원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0126] 따라서, 바람직한 실시양태에서, 발효에 사용된 미생물은 하나 이상의 하기 대사물질을 초과생산하는 천연 또는 재조합 미생물 중에서 선택된다:

[0127] - 효소, 예컨대 피타제, 크실라나제 또는 글루카나제;

[0128] - 아미노산, 예컨대 리신, 트레오닌 또는 메티오닌;

[0129] - 비타민, 예컨대 판토텐산 및 리보플라민, 및 이들의 전구체 및/또는 유도체;

[0130] - 이당류, 예컨대 트레할로스;

[0131] - 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 모노- 및 디카르복실산, 예컨대 프로피온산, 푸마르산 및 숙신산;

[0132] - 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 지방족 히드록시카르복실산, 예컨대 락트산;

[0133] - 폴리히드록시알카노에이트, 예컨대 폴리-3-히드록시부티레이트 및 3-히드록시부티르산의 코폴리에스테르;

[0134] - 3 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 케톤, 예컨대 아세톤;

[0135] - 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 알칸올, 예컨대 부탄올; 및 3 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 알칸디올, 예컨대 프로판디올.

[0136] 적합한 미생물은 통상 코리네박테리움, 바실루스, 아쉬비아, 에쉐리키아, 아스페르길루스, 악티노바실루스, 아내로비오스파릴룸, 락토바실루스, 프로피오니박테리움, 리조푸스 및 클로스트리디움 속 중에서, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰, 바실루스 서브틸리스, 아쉬비아 고시피, 에쉐리키아 콜리, 아스페르길루스 니거 또는 알카리제네스 라투스, 아내로비오스파릴룸 숙신프로두센스, 악티노바실루스 숙시노제네스, 락토바실루스 뎁브뤼키, 락토바실루스 레이크만니, 프로피오니박테리움 아라비노슘, 프로피오니박테리움 쉐르마니, 프로피오니박테리움 프레우덴레이키, 클로스트리디움 프로피오니쿰, 클로스트리디움 포르미코아세티쿰, 클로스트리디움 아세토부티리쿰, 리조푸스 아리주스 및 리조푸스 오리제 균주 중에서 선택된다.

[0137] 바람직한 실시양태에서, 발효에 사용된 미생물은 코리네박테리움 속 균주, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 균주이다. 특히, 아미노산, 구체적으로 리신, 메티오닌 또는 글루타메이트를 초과생산하는 코리네박테리움 속, 구체적으로 코리네박테리움 글루타미쿰 균주이다.

[0138] 추가 바람직한 실시양태에서, 발효에 사용된 미생물은 에쉐리키아 속 균주, 특히 에쉐리키아 콜리 균주이다. 특히, 아미노산, 구체적으로 리신, 메티오닌 또는 트레오닌을 초과생산하는 에쉐리키아 속, 구체적으로 에쉐리키아 콜리 균주이다.

[0139] 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 리신이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 상기 문헌 [Pfefferle et al.] 및 US 3,708,395에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다. 원칙적으로, 연속식 및 비연속식 (배치식 또는 유가식) 작업이 적합하며, 유가식이 바람직하다.

[0140] 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 메티오닌이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 WO 03/087386 및 WO 03/100072에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0141] 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 판토텐산이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 WO 01/021772에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0142] 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 리보플라빈이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1 186 664 및 문헌 [Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003),

31(3), 44-48]에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0143] 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 푸마르산이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 문헌 [Rhodes et al, Production of Fumaric Acid in 20-L Fermentors, Applied Microbiology, 1962, 10 (1), 9-15]에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0144] 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 숙신산이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 문헌 [Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498-504 (1976)]; EP 249773 (1987) (Lemme 및 Datta); US 5504004 (1996) (Guettler, Jain 및 Soni); [Arch. Microbiol. 167, 332-342 (1997)]; [Guettler MV, Rumler D, Jain MK., *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol. 1999 Jan;49 Pt 1:207-16]; US 5,723,322, US 5,573,931, US 5,521,075, WO 99/06532, US 5,869,301 또는 US 5,770,435에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0145] 추가의 특히 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질은 피타제이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 WO 98/55599에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0146] 발효는 목적하는 미생물 대사물질 이외에, 본질적으로 발효 동안 생산된 생물량, 액화된 전분 용액의 대사되지 않은 구성성분 및 특히 전분 공급원료의 비전분 고체 구성성분, 예를 들어 섬유 및 이용되지 않은 당, 및 또한 이용되지 않은 완충액 및 영양분 염을 포함하는 발효액을 생성한다. 본 출원에서, 이러한 액체 배지는 또한 발효액으로서 지칭되며, 용어 발효액은 또한 존재하는 당이 단지 부분적 또는 불완전 발효 전환에 제공되는, 즉 이용가능한 당 (예를 들어 단당류 및 이당류)의 부분적 또는 불완전 미생물 대사가 일어나는 (당-함유) 액체 배지를 포함한다.

[0147] 미생물 대사물질의 단리 또는 소모 전 또는 발효액의 휘발성 구성성분의 제거 전에, 멸균 단계가 상기 기재된 방식으로 수행된다.

[0148] 본 발명의 특정 실시양태는 하나 이상의 미생물 대사물질이 발효액으로부터 소모 또는 단리되는 방법에 관한 것이다. 발효액의 휘발성 구성성분 대부분은 후속적으로 제거되어, 고체 또는 반고체 단백질 조성물을 생성한다. 이러한 방법의 수행 및 수득된 단백질 조성물에 대한 보다 상세한 설명은 추가 상세설명과 관련하여 언급된 본 출원인 회사의 WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728)의 주제이다.

[0149] 발효액, 즉 3개 이상의 탄소 원자 또는 2개 이상의 탄소 원자 및 1개 이상의 질소 원자를 갖는 유기 화합물 (이하에서 또한 중요 생성물로서 언급됨)로부터 대사물질의 단리 또는 소모는, 통상 하나 이상의 대사물질이 발효액으로부터 소모 또는 단리되어, 남아있는 발효액 중 상기 대사물질의 함량이 각 경우에서 남아있는 발효액 총 중량을 기준으로 20 중량% 이하, 특히 10 중량% 이하, 구체적으로는 5 중량% 이하, 매우 구체적으로는 2.5 중량% 이하의 양에 달하도록 수행된다.

[0150] 미생물 대사물질은 1개 이상의 단계에서 발효액으로부터 단리 또는 소모될 수 있다. 이와 관련하여 필수 단계는 발효액으로부터 고체 구성성분을 제거하는 것이다. 이는 중요 생성물의 단리 전 또는 후에 수행될 수 있다. 중요 생성물의 대략적 세척 및 정교한 정제 단계 및 제제화 단계를 또한 포함하는, 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법이 중요 생성물의 단리 및 고체의 제거, 즉 고체-액체 상 분리에 대해 공지되어 있다 (예를 들어 문헌 [Belter, P.A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988)] 및 [Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th ed. on CD-ROM, Wiley-VCH]에 기재됨).

[0151] 중요 생성물의 단리를 위해, 유리하게는 먼저 고체 구성성분을 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 발효액으로부터 제거하고, 이후 중요 생성물을 예를 들어 결정화, 침전, 흡착 또는 증류에 의해 액체상으로부터 단리하는 절차를 따를 수 있다. 별법으로서, 중요 생성물을 또한 예를 들어 크로마토그래피 방법 또는 추출 방법에 의해 발효액으로부터 직접 단리할 수 있다. 특히 언급되어야 하는 크로마토그래피 방법은 이온-교환 크로마토그래피로, 중요 생성물을 크로마토그래피 컬럼 상에서 선택적으로 단리할 수 있다. 이 경우, 남아있는 발효액으로부터 고체를 제거하는 것은 유리하게는 예를 들어 디캔팅, 증발 및/또는 건조에 의해 수행된다.

[0152] 휘발성 또는 유성 화합물의 경우, 처리 동안, 특히 건조 동안 최대 온도를 모니터링하는 것이 일반적으로 필요하다. 이들 화합물은 또한 유리하게는 흡착제 상에서 가(pseudo)-고체 형태로 제제화함으로써 제조될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 흡착제는 예를 들어 본 출원인 회사의 WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728)에 상세설명되

어 있다. 유리하게 이러한 방식으로 제조될 수 있는 화합물의 예로는  $\gamma$ -리놀렌산, 디호모- $\gamma$ -리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타에노산 및 도코사헥사에노산, 또한 프로피온산, 락트산, 프로판디올, 부탄올 및 아세톤이 있다. 가-고체 제형의 상기 화합물은 또한 본 발명의 목적상 고체 형태의 비휘발성 미생물 대사물질인 것으로 이해된다.

[0153] 추가의 특정 실시양태는 사전에 비휘발성 미생물 대사물질을 단리 또는 소모시키지 않으면서, 적절한 경우 사전에 적어도 일부 고체 구성성분을 제거하지 않으면서, 발효액의 휘발성 구성성분을 실질적으로 제거하여, 비휘발성 미생물 대사물질의 고체 제형을 생성한다. 이러한 방법을 수행하기 위한 보다 상세한 설명은 본 출원인 회사의 PCT/EP2006/066057 (선행 특허 출원 DE 10 2005 042 541.0)에서 찾을 수 있다.

[0154] "대부분"은, 휘발성 구성성분이 제거된 경우 고체 또는 적어도 반고체 잔류물이 남아 적절한 경우 고체의 첨가에 의해 고체 생성물로 전환될 수 있음을 의미한다. 일반적으로, 이는 잔류 습기 함량이 30 중량% 이하, 종종 20 중량% 이하, 특히 15 중량% 이하로 감소하는 휘발성 구성성분의 제거를 의미한다. 일반적으로, 발효액의 휘발성 구성성분은 유리하게는 잔류 습기 함량이 건조 후 측정된 고체 구성성분의 총 중량을 기준으로 0.2 내지 30 중량%, 바람직하게는 1 내지 20 중량%, 특히 바람직하게는 2 내지 15 중량%, 매우 특히 바람직하게는 5 내지 15 중량%로 감소하도록 발효액으로부터 제거될 것이다. 잔류 습기 함량은 당업자에게 친숙한 통상적인 방법, 예를 들어 열중량분석법 (문헌 [Hemminger et al., Methoden der thermischen Analyse [Methods of thermal analysis], Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989] 참조)에 의해 측정될 수 있다.

[0155] 발효액으로부터 고체 형태로 비휘발성 대사물질(들)을 수득하는 것은 1개, 2개 또는 그 이상의 단계, 특히 1 또는 2-단계 절차로 수행될 수 있다. 일반적으로, 고체 형태로 대사물질을 수득하기 위한 1개 이상의 단계, 특히 최종 단계는 건조 단계를 포함할 것이다.

[0156] 1-단계 절차에서, 발효액의 휘발성 구성성분은 적절한 경우 상기 언급된 예비 제거 후, 목적하는 잔류 습기 함량에 도달할 때까지 제거될 것이다.

[0157] 2-단계 또는 다단계 절차에서, 발효액은 먼저 예를 들어 여과 (마이크로여과, 초여과)에 의해 또는 열적으로 일부 휘발성 구성성분을 증발시켜 농축될 것이다. 이 단계에서 제거된 휘발성 구성성분의 양은 일반적으로 발효액의 휘발성 구성성분의 건조 물질을 기준으로 10 내지 80 중량%, 특히 20 내지 70 중량%의 양에 이른다. 1 개 이상의 후속 단계에서, 발효액의 남아있는 휘발성 구성성분은 목적하는 잔류 습기 함량에 도달할 때까지 제거된다.

[0158] 상기 실시양태에 따라, 휘발성 구성성분은 중요 생성물의 사전 소모 또는 실제 단리 없이 액체 배지로부터 본질적으로 제거된다. 결과적으로, 발효액의 휘발성 구성성분을 제거하는 경우, 비휘발성 대사물질은 액체 배지의 휘발성 구성성분과 함께 본질적으로 제거되는 것이 아니라, 발효액으로부터 다른 고체 구성성분의 적어도 일부, 통상적으로 대부분, 특히 모두와 함께 생성된 잔류물에 잔존한다. 따라서, 상기 구성성분의 제거시 발효액의 휘발성 구성성분과 함께 바람직하게는 소량, 일반적으로는 대사물질의 총 건조 중량을 기준으로 20 중량% 이하, 예를 들어 0.1 내지 20 중량%, 바람직하게는 10 중량% 이하, 특히 5 중량% 이하, 특히 바람직하게는 2.5 중량% 이하, 매우 특히 바람직하게는 1 중량% 이하의 목적하는 비휘발성 미생물 대사물질을 제거하는 것이 또한 가능하다. 매우 특히 바람직한 실시양태에서, 목적하는 비휘발성 미생물 대사물질은 휘발성 구성성분의 제거 후 수득된 발효 배지의 일부 고체 구성성분 또는 발효 배지의 모든 고체 구성성분과의 혼합물 중 고체로서, 각 경우에서 대사물질의 총 건조 중량을 기준으로 90 중량% 이상, 특히 95 중량% 이상, 구체적으로는 99 중량%, 매우 구체적으로는 대략 100 중량%로 잔존한다.

[0159] 필요한 경우, 일부, 예를 들어 5 내지 80 중량%, 특히 30 내지 70 중량%의 비전분 고체 구성성분은 휘발성 구성성분이 제거되기 전에 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 발효액으로부터 분리될 수 있다. 적절한 경우, 비휘발성 미생물 대사물질을 전혀 포함하지 않거나 또는 소량만 포함하는 고체 조립자를 제거하기 위해 상기 예비 분리가 수행될 것이다. 이러한 예비 여과는 숙련자에게 공지되어 있는 통상적인 방법, 예를 들어 조대 체, 망 또는 천공된 개구 플레이트 등을 사용하여 수행될 수 있다. 적절한 경우, 고체 조립자는 또한 원심력 분리기에서 분리 제거될 수 있다. 여기서 사용된 장치, 예컨대 디캔터, 원심분리기, 세디캔터(sedicanter) 및 분리기가 또한 숙련자에게 공지되어 있다. 이러한 방식으로, 비휘발성 대사물질 및 전분 공급원료의 비휘발성이며 일반적으로 고체인 비전분 구성성분 또는 이의 적어도 대부분, 종종 90 중량% 이상 또는 고체 비전분 구성성분 모두를 포함하는 고체 또는 반고체, 예를 들어 페이스트 잔류물이 수득된다.

[0160] 발효의 고체 구성성분과 함께 존재하는 건조 대사물질의 특성은 제제화 보조제, 예컨대 담체 및 코팅 물질, 결

합체 및 다른 첨가제를 첨가하여, 특히 각종 파라미터, 예컨대 활성 물질 함량, 입자 크기, 입자 형태, 살포 경향, 흡습도, 안정성, 특히 저장 안정성, 색, 냄새, 유동 거동, 응집 경향, 정전기 전하, 광감성 및 온도 민감성, 기계적 안정성 및 재분산성과 관련하여 공지된 방식 그 자체로 제제화될 수 있다.

[0161] 통상적으로 사용되는 제제화 보조제는 예를 들어 결합체, 담체 물질, 분말화/유동 보조제, 추가로 착색 앤료, 살생물체, 분산제, 소포제, 점도 조절제, 산, 알칼리, 항산화제, 효소 안정화제, 효소 억제제, 흡착제, 지방, 지방산, 오일 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 이러한 제제화 보조제는 특히 제제화 및 건조 방법, 예컨대 분무 건조, 유동층 건조 및 동결 건조를 사용하는 경우 건조 산으로서 유리하게 사용된다. 추가 상세설명은 PCT/EP2006/066057 (선행 출원 DE 10 2005 042 541.0)에서 찾을 수 있다.

[0162] 상기 언급된 첨가제 및 적절한 경우 추가 첨가제, 예컨대 코팅 물질의 양은 해당 대사물질의 특정 요건 및 사용된 첨가제의 특성에 따라 크게 변할 수 있으며, 예를 들어 각 경우에서 완성된 제제화 형태의 생성물 또는 물질 혼합물의 총 중량을 기준으로 0.1 내지 80 중량%, 특히 1 내지 30 중량%일 수 있다.

[0163] 제제화 보조제의 첨가는 발효액의 후처리 (또한 생성물 제제화 또는 고체 디자인으로도 지칭됨) 전, 동안 또는 후에, 특히 건조 동안에 수행될 수 있다. 발효액 또는 대사물질의 후처리 전 제제화 보조제의 첨가는 특히 처리될 물질 또는 생성물의 가공성을 개선시키는데 유리할 수 있다. 제제화 보조제는 고체 형태로 수득된 대사물질 또는 대사물질을 포함하는 용액 또는 혼탁액, 예를 들어 발효가 완료된 후의 발효액 또는 후처리 동안 및 최종 건조 단계 전에 수득된 용액 또는 혼탁액에 직접 첨가될 수 있다.

[0164] 따라서, 예를 들어, 보조제는 미생물 대사물질의 혼탁액과 혼합될 수 있으며, 이러한 혼탁액은 또한 예를 들어 분무 또는 혼합에 의해 담체 물질에 적용될 수 있다. 건조 동안 제제화 보조제의 첨가는 예를 들어 대사물질을 포함하는 용액 또는 혼탁액이 분무되는 경우 중요할 수 있다. 제제화 보조제의 첨가는 특히 건조 후, 예를 들어 건조된 입자에 코팅/코팅층을 적용하는 경우 수행된다. 추가 보조제는 건조 후 및 임의적 코팅 단계 후에 생성물에 첨가될 수 있다.

[0165] 발효액으로부터 휘발성 구성성분을 제거하는 것은 여과 방법 및 액체상의 휘발성 구성성분을 증발시키는 방법을 비롯한, 고체상을 액체상으로부터 분리하기 위한 통상적인 방법에 의해 공지된 방식 그 자체로 수행된다. 중요 생성물의 대략적 세척 단계 및 제제화 단계를 또한 포함할 수 있는 상기 방법이 예를 들어 문헌 [Belter, P.A., Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988)] 및 [Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th ed. CD-ROM, Wiley-VCH]에 기재되어 있다. 발효가 종료된 후 생성물 제제화 또는 후처리의 범위 내에서 사용될 수 있는, 숙련자에게 공지된 방법, 장치, 보조제 및 일반 또는 특정 실시양태가 또한 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 및 WO 92/12645에 기재되어 있다.

[0166] 상기 실시양태의 제1 변형에서, 비휘발성 미생물 대사물질은 액체상에 용해된 형태로 존재하는 경우, 예를 들어 결정화 또는 침전에 의해 액체상에서 고체상으로 전환될 것이다. 이후, 대사물질을 비롯한 비휘발성 고체 구성성분은 예를 들어 원심분리, 디캔팅 또는 여과에 의해 분리된다. 유성 대사물질은 또한 유사한 방식으로 분리 제거될 수 있으며, 해당 유성 발효 생성물은 흡착제, 예를 들어 실리카, 실리카겔, 룸(loam), 점토 및 활성탄의 첨가에 의해 고체 형태로 전환된다.

[0167] 상기 실시양태의 제2 변형에서, 휘발성 구성성분은 증발에 의해 제거된다. 증발은 공지된 방식 그 자체로 수행될 수 있다. 휘발성 구성성분을 증발시키는 적합한 방법의 예로는 분무 건조, 유동층 건조 또는 유동층 응집, 동결 건조, 공압식 건조 및 접촉 건조, 및 압출 건조가 있다. 상기 언급된 방법과 형태-부여 방법, 예컨대 압출, 펠렛화 또는 제립의 조합이 또한 수행될 수 있다. 상기 마지막에 언급된 방법에서, 부분적으로 또는 대부분 예비 건조된 대사물질을 포함하는 물질 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0168] 바람직한 실시양태에서, 발효액의 휘발성 구성성분의 제거는 분무 건조 방법 또는 유동층 과립화를 비롯한 유동층 건조 방법을 포함한다. 이를 위해, 적절한 경우 단지 소량의 비휘발성 미생물 대사물질만을 포함하는 고체 조립자 (존재한다면)를 제거하기 위한 예비 분리 후, 발효액이 하나 이상의 분무 건조 또는 유동층 건조 장치에 공급된다. 고체-로딩된 발효액의 전달 또는 공급은 고체-함유 액체를 위한 통상적인 전달 장치, 예를 들어 펌프, 예컨대 편심 단일 회전자 스크류 펌프 (예를 들어 델라스코 피씨엠(Delasco PCM)) 또는 고압 펌프 (예를 들어 레바 헤르베르트 오트 게엠베하(LEWA Herbert Ott GmbH))에 의해 편리하게 수행된다.

[0169] 발효는 또한

[0170] (i) 총 중량을 기준으로 50 중량% 이하, 예를 들어 5 내지 45 중량%의 부분을 단계 a2)에서 수득된 액체 배지

(1) 또는 이들과 추가 당 공급원료의 혼합물로부터 제거하고, 나머지를 적절한 경우 상기 정의된 바와 같은 추가 당 공급원료와 함께 제1 대사물질 (A), 예를 들어 고체 형태의 비휘발성 대사물질 (A) 또는 휘발성 대사물질 (A)의 생산을 위한 발효에 공급하는 단계; 및

[0171] (ii) 적절한 경우 전분 공급원료의 비전분 고체 구성성분 모두 또는 일부를 미리 제거한 후, 상기 제거된 부분을 적절한 경우 상기 정의된 바와 같은 추가 당 공급원료와 함께 대사물질 (A)과 동일 또는 상이한 제2 대사물질 (B)의 생산을 위한 발효에 공급하는 단계

[0172] 예 의해 수행될 수 있다.

[0173] (ii)의 비전분 고체 구성성분이 분리되는 경우, 액체 배지의 나머지 부분의 고체 함량은 바람직하게는 50 중량% 이하, 특히 30 중량% 이하, 특히 바람직하게는 10 중량% 이하, 매우 특히 바람직하게는 5 중량% 이하의 양에 달한다. 이러한 경우, 제2 대사물질 (B)의 생산을 위한 발효 전에 고체 모두를 분리하는 것이 특히 바람직하다.

[0174] 상기 절차는 (ii)의 각 발효에서 예를 들어 산소 전달률과 관련하여 특정 최소 요건이 충족되어야 하는 미생물의 사용을 가능하게 한다. (ii)의 각 발효에서 사용되는 적합한 미생물로는 예를 들어 바실루스 종, 바람직하게는 바실루스 서브틸리스가 있다. 각 발효에서 상기 미생물에 의해 생산된 화합물은 특히 비타민, 보조인자 및 영양보조물, 퓨린 및 피리미딘 염기, 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드, 리피드, 포화 및 불포화 지방산, 방향족 화합물, 단백질, 카로테노이드로부터 선택되고, 구체적으로는 비타민, 보조인자 및 영양보조물, 단백질 및 카로테노이드로부터 선택되며, 매우 구체적으로는 리보플라빈 및 칼슘 판토텐에이트로부터 선택된다.

[0175] 상기 절차의 바람직한 실시양태는 2개의 각 발효에서 동일한 대사물질 (A) 및 (B)의 병행 생산에 관한 것이다. 이는 특히 동일한 대사물질의 상이한 적용이 상이한 순도 요건을 갖는 경우에 유리하다. 따라서, 제1 대사물질 (A), 예를 들어 공급 첨가제로서 사용될 아미노산, 예를 들어 리신, 메티오닌, 트레오닌 또는 글루타메이트는 고체-함유 발효액을 사용하여 생산되고, 동일한 제2 대사물질 (B), 예를 들어 공급 첨가제로서 사용될 동일한 아미노산은 (ii)의 고체-소모된 발효액을 사용하여 생산된다. 비전분 고체 구성성분의 완전한 또는 부분적 제거로 인해, 예를 들어 식품 첨가제로서 그의 적용 분야가 보다 높은 순도 요건을 갖는 대사물질의 후처리시 정제의 복잡성이 감소할 수 있다.

[0176] 추가의 바람직한 실시양태에서, 상기 절차는 예를 들어 하기와 같이 수행될 수 있다. 바람직하게는 대사물질 A, 예를 들어 리신, 메티오닌, 글루타메이트 또는 트레오닌과 같은 아미노산, 시트르산 또는 에탄올의 생산을 위한 대량 발효가 예를 들어 WO 2005/116228 (PCT/EP2005/005728) 또는 PCT/EP2006/066057 (선행 출원 DE 10 2005 042 541.0)에 기재된 방법에 따라 또는 공지된 종래 기술의 바이오에탄올 발효 생산 방법에 따라 수행된다 (상기 참조). (i)에 따라, 단계 a2)에서 수득된 액체 배지 (1)의 일부 또는 이들과 추가 당 공급원료의 혼합물이 제거된다. (i)에 따라 제거된 부분은 (ii)에 따라 B의 생산을 위한 발효에서 필요한 것에 좌우되면서 통상적인 방법, 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 고체가 완전히 또는 부분적으로 제거될 수 있다. 이러한 방식으로 수득된, 임의로 고체가 완전히 또는 부분적으로 제거된 액체 배지 (1)은 적절한 경우 상기 정의된 바와 같은 추가 당 공급원료와 함께 (ii)에 따라 대사물질 B의 생산을 위한 발효에 공급된다. (ii)에 따라 분리된 고체 스트립은 유리하게는 대량 발효의 당-함유 액체 배지의 스트립으로 회복된다.

[0177] 대량 발효에서 생산된 미생물 대사물질 (A)가 에탄올인 경우, 이는 액체 배지 (1)로부터 회수된다. 액체 배지 (1)은 당 함량이 에탄올 (바이오에탄올)의 발효 생산에서 통상적인 바와 같이, 예를 들어 20 내지 30 중량%이어야 한다. 통상적으로, 단계 (i)에서 수득된 당-함유 액체 배지 (1)의 나머지는 이 절차에서 A (본 경우 에탄올)의 생산을 위한 발효에 공급된다. 단계 (i)에서 제거된 당-함유 액체 배지 (1)의 부분은 추가 당 공급원료와 함께, 적절한 경우 단계 (ii)에 따라 고체가 제거된 후, B의 발효 생산에 공급된다.

[0178] 상기 절차의 추가 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질 B는 리보플라빈이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 WO 01/011052, DE 19840709, WO 98/29539, EP 1186664 및 문헌 [Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamine B<sub>2</sub>) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48]에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0179] 이러한 변형 방법을 수행하기 위해, 바람직하게는 대량 발효가 상기한 바와 같이 대사물질 A, 예를 들어 리신, 글루타메이트, 트레오닌 또는 메티오닌과 같은 아미노산, 시트르산 또는 에탄올의 생산을 위해 수행된다. (i)에 따라 단계 a2)에서 수득된 당-함유 액체 배지의 일부가 제거되고, (ii)에 따라 통상적인 방법, 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 고체가 완전히 또는 부분적으로 제거된다. 이로부터 수득된, 본질적으로 고체가 완전

히 또는 부분적으로 제거된 당-함유 액체 배지는 (ii)에 따라 대사물질 B, 본 경우 리보플라빈의 생산을 위한 발효에 공급된다. (ii)에 따라 분리된 고체 스트림은 유리하게는 대량 발효의 당-함유 액체 배지의 스트림으로 회복된다.

[0180] 이와 같이 (ii)에 따라 생성된 리보플라빈-함유 발효액은 예를 들어 DE 4037441, EP 464582, EP 438767 및 DE 3819745에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차에 의해 후처리될 수 있다. 세포 물질의 용균 후, 결정 형태로 존재하는 리보플라빈이 바람직하게는 디캔팅에 의해 분리된다. 고체를 분리하는 다른 방법, 예를 들어 여과도 또한 가능하다. 이후, 리보플라빈은 바람직하게는 분무 건조기 및 유동층 건조기에 의해 건조된다. 별법으로, (ii)에 따라 생산된 리보플라빈-함유 발효 혼합물을 예를 들어 EP 1048668 및 EP 730034에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 유사한 조건 하에서 처리될 수 있다. 저온 살균 후, 발효액은 원심분리되고, 남아있는 고체-함유 분획물은 무기산으로 처리된다. 형성된 리보플라빈은 여과에 의해 수성-산성 배지로부터 제거되고, 적절한 경우 세척되고, 이후 건조된다.

[0181] 상기 절차의 추가 바람직한 실시양태에서, 발효시 미생물에 의해 생산된 대사물질 B는 판토텐산이다. 발효를 수행하기 위해, 예를 들어 WO 01/021772에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 조건 및 절차가 사용될 수 있다.

[0182] 이러한 변형 방법을 수행하기 위해, 리보플라빈에 대해 상기 기재된 것과 같은 절차를 따를 수 있다. (ii)에 따라 예비 정제가 수행되며 바람직하게는 본질적으로 고체가 제거된 당-함유 액체 배지 (1) 또는 이들과 추가 당 공급원료의 혼합물은 판토텐산의 생산을 위해 (ii)에 따라 발효에 공급된다. 여기서, 점도가 고체-함유 액체 배지에 비해 감소한다는 사실은 특히 유리하다. 분리된 고체 스트림은 바람직하게는 대량 발효의 당-함유 액체 배지의 스트림으로 회복된다.

[0183] (ii)에 따라 생산된 판토텐산-함유 발효액은 예를 들어 EP 1 050 219 및 WO 01/83799에서 다른 탄소 공급원료에 대해 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 유사한 조건 하에서 후처리될 수 있다. 모든 발효액이 저온 살균된 후, 남아있는 고체는 예를 들어 원심분리 또는 여과에 의해 분리된다. 고체 분리 단계에서 수득된 투명한 유출물은 부분적으로 증발되고, 적절한 경우 염화칼슘으로 처리되고, 건조, 특히 분무 건조된다.

[0184] 분리 제거된 고체는 병행 대량 발효 방법의 범위 내에서 각각의 목적하는 미생물 대사물질 (A)와 함께 수득될 수 있다.

[0185] 건조 및/또는 제제화 단계 후, 전체 또는 분쇄된 곡류 낱알, 바람직하게는 옥수수, 밀, 보리, 기장, 라이밀 및/또는 호밀이 생성물 제제 또는 단백질 조성물에 첨가될 수 있다.

[0186] 하기 실시예는 본 발명의 각 측면을 예시하는 것으로 의도되며, 제한으로서 해석되어서는 안된다.

## 실시예

### I. 전분 공급원료의 분쇄

[0187] 하기 사용되는 분말기재를 다음과 같이 제조하였다. 회전자 분쇄기를 사용하여 전체 옥수수 낱알을 완전히 분쇄하였다. 상이한 회전날, 분쇄 경로 또는 스크린 요소를 사용하여, 3가지 상이한 정도의 분말도(fineness)를 수득하였다. 실험실용 진동 스크린(진동 분석기: 렛슈 바이브로트로닉형(Retsch Vibrotronic type) VE1; 스크리닝 시간 5분, 진폭: 1.5 mm)에 의한 분말기재의 스크린 분석은 하기 표 I에 나열된 결과를 제공하였다.

### 표 I

실험 번호	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
총 분말 기재	20 kg	11.45 kg	13.75 kg

[0189]

### II. 효소적 전분 액화 및 전분 당화

#### II.1. 당화 단계에서의 피타제의 부재

[0192] II.1a) 효소적 전분 액화

[0193] 건식 분쇄된 옥수수 가루 (T71/03) 320 g을 물 480 g에 혼탁시키고, 계속 교반하면서 염화칼슘 310 mg과 혼합하였다. 전체 실험 동안 계속 교반하였다.  $H_2SO_4$ 를 사용하여 pH를 6.5로 맞추고 혼합물을 35°C로 가열한 후에, 테르마일 120L L형 (노보자임스 A/S) 2.4 g을 첨가하였다. 40분의 시간 동안, 필요하다면 NaOH를 사용하여 pH를 상기 값으로 재조정하면서 반응 혼합물을 86.5°C의 온도로 가열하였다. 30분 이내에, 건식 분쇄된 옥수수 가루 (T71/03) 추가 400 g을 첨가하고, 이 공정 동안 온도를 91°C로 상승시켰다. 반응 혼합물을 상기 온도에서 대략 100분 동안 유지하였다. 테르마일 120L 추가 2.4 g을 후속적으로 첨가하고, 상기 온도를 대략 100분 동안 유지하였다. 요오드-전분 반응을 이용하여 실험 동안 액화의 진행을 모니터링하였다. 상기 온도를 최종적으로 100°C로 상승시키고, 반응 혼합물을 추가 20분 동안 비등시켰다. 이 시점에서 전분은 더 이상 검출되지 않았다. 반응기를 35°C로 냉각시켰다.

[0194] II.1b) 당화

[0195] II.1a)에서 수득한 반응 혼합물을 일정하게 교반하면서 61°C로 가열하였다. 전체 실험 동안 계속 교반하였다.  $H_2SO_4$ 를 사용하여 pH를 4.3으로 맞춘 후 텍스트로자임 GA (노보자임스 A/S) 10.8 g (9.15 ml)을 첨가하였다. 온도를 대략 3시간 동안 유지하고, 이 시간 동안 반응의 진행을 글루코스 시험대 (베링거(Boehringer)사의 S-글루코테스트(Glucotest))로 모니터링하였다. 결과를 하기 표 2에 나열하였다. 이후, 반응 혼합물을 80°C로 가열하고, 이어서 냉각시켰다. 이는 대략 1.2 kg/1의 밀도, 및 적외선 건조기에 의해 측정된 바와 같이 대략 53.7 중량%의 건조 물질 함량을 갖는 액체 생성물 대략 1180 g을 제공하였다. 물로 세척한 후에, 대략 14 중량%의 건조 물질 함량 (수용성 구성성분 무함유)을 수득하였다. 반응 혼합물의 글루코스 함량은 HPLC로 측정 시 380 g/1였다 (하기 표 II, 샘플 7번 참조).

## 표 II

샘플 번호	분 (글루코아밀라제의 첨가시점으로부터)	상청액 중의 글루코스 농도 [g/l]
1	5	135
2	45	303
3	115	331
4	135	334
5	165	340
6	195	359
7	225	380

[0196]

[0197] II.2. 당화 단계에서 피타제 함유

[0198] II.2a) 전분 액화

[0199] 건식 분쇄된 옥수수 가루 샘플을 II.1a)에 기재된 바와 같이 액화하였다.

[0200] II.2b) 당화

[0201] II.2a)에서 수득한 반응 혼합물을 일정하게 교반하면서 61°C로 가열하였다. 전체 실험 동안 계속 교반하였다.  $H_2SO_4$ 를 사용하여 pH를 4.3으로 맞춘 후 텍스트로자임 GA (노보자임스 A/S) 10.8 g (9.15 ml) 및 피타제 (피타제 700 유닛, BASF AG사의 나투피트 리퀴드(Natuphyt Liquid) 10000L) 70  $\mu$ l를 첨가하였다. 온도를 대략 3시간 동안 유지하고, 이 시간 동안 반응의 진행을 글루코스 시험대 (베링거사의 S-글루코테스트)로 모니터링하였다. 이후, 반응 혼합물을 80°C로 가열하고, 이어서 냉각시켰다. 수득한 생산물을 적외선 건조기로 건조시키고, 물로 세척하였다. 반응 혼합물 중 글루코스 함량을 HPLC로 측정하였다.

[0202] II.3 전분의 효소적 액화 및 당화를 위한 다른 프로토콜

[0203] II.3a) 옥수수 가루

[0204] 탈이온수 360 g을 반응 용기에 도입하였다.  $CaCl_2$  원액 ( $CaCl_2$  100 g  $\times 2H_2O/1$ ) 1.54 ml를 슬러리에 대략 70 ppm  $Ca^{2+}$ 의 최종 농도로 첨가하였다. 옥수수 가루 240 g을 일정하게 교반하면서 물에 천천히 풀었다. 50 중량% 농도의 전분 NaOH 수용액을 사용하여 pH를 6.5로 맞춘 후, 테르마일 120L L형 (노보자임스 A/S) 4.0 ml (= 효소 2 중량%/건조 물질)를 첨가하였다. 이어서, 슬러리를 급속하게 85°C 이하로 가열하였다. 이 공정 동안,

pH를 계속 모니터링하고, 적절하게는 조정하는 것이 필요하다.

[0205] 최종 온도에 도달한 후, 초기에 가루 50 g으로 시작하여 추가의 가루를 첨가하였다. 또한,  $\text{CaCl}_2$  원액 0.13 ml를 슬러리에 첨가하여  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 70 ppm으로 유지하였다. 첨가하는 동안, 온도를 85°C에서 일정하게 유지하였다. 추가 부분 (가루 50 g 및  $\text{CaCl}_2$  원액 0.13 ml)을 첨가하기 전에 반응을 확실하게 완료시키기 위해 10분 이상이 경과하도록 하였다. 2회 분량을 첨가한 후, 테르마일 1.67 ml를 첨가하고, 이어서 추가 2회 분량 (각 경우에 가루 50 g 및  $\text{CaCl}_2$  원액 0.13 ml)을 첨가하였다. 55 중량%의 건조 물질 함량에 이르렀다. 첨가 후, 온도를 100°C로 올리고, 슬러리를 10분 동안 비등시켰다.

[0206] 샘플을 채취하고, 실온으로 냉각시켰다. 샘플을 탈이온수로 희석 (대략 1:10)시킨 후에, 농축된 루골(Lugol) 용액 (리터 당 요오드 5 g과 요오드화칼륨 10 g의 혼합물) 한 방울을 첨가하였다. 진한 청색은 잔류 전분이 존재함을 나타내며, 전분이 모두 가수분해되었을 때 갈색이 관찰되었다. 시험에서 잔류 전분의 일부가 존재하는 것으로 나타나는 경우, 온도를 다시 85°C로 내리고, 일정하게 유지하였다. 요오드/전분 반응이 음성이 될 때까지 테르마일 추가 1.67 ml를 첨가하였다.

[0207] 후속 당화 반응을 위해, 전분에 대해 음성인 것으로 시험된 혼합물을 61°C가 되게 하였다. 50% 농도의 진한 황산을 첨가하여 pH를 4.3으로 맞추었다. 반응하는 동안 pH를 상기 값에서 유지하였다. 온도를 61°C에서 유지하였다. 엑스트로자임 GA (노보자임스 A/S) 5.74 ml (= 효소 1.5 중량%/건조 물질)를 첨가하여 액화 전분을 글루코스로 전환시켰다. 반응을 1시간 동안 진행하였다. 효소를 불활성화시키기 위해, 혼합물을 85°C로 가열하였다. 멸균 용기를 고온의 혼합물로 충전하고, 냉각시키고, 이어서 4°C에 보관하였다. 420 g/1의 최종 글루코스 농도를 수득하였다.

[0208] II.3b) 호밀 가루 (셀룰라제/헤미셀룰라제를 이용한 예비처리 포함)

[0209] 탈이온수 360 g을 반응 용기에 도입하였다. 호밀 가루 155 g을 일정하게 교반하면서 물에 천천히 풀었다. 온도를 50°C에서 일정하게 유지하였다. 50 중량% 농도의 NaOH 수용액을 사용하여 pH를 5.5로 맞춘 후, 비스코자임(Viscozyme) L (노보자임스 A/S) 3.21 ml (= 효소 2.5 중량%/건조 물질)를 첨가하였다. 30분 후, 추가의 가루를 첨가하였다 (처음에 가루 55 g을 첨가함). 추가 30분 후 또다른 50 g의 가루를 첨가하고, 30분 후 또다른 40 g의 가루를 첨가하였다. 마지막 첨가 30분 후 액화를 시작할 수 있었다.

[0210]  $\text{CaCl}_2$  원액 1.7 ml (100 g  $\text{CaCl}_2$  x 2H<sub>2</sub>O/1)를 첨가하였다. 50 중량% 농도의 NaOH 수용액을 사용하여 pH를 6.5로 조정한 후, 테르마일 120L L형 (노보자임스 A/S) 5.0 ml (= 효소 2 중량%/건조 물질)를 첨가하였다. 이어서, 슬러리를 급속하게 85°C로 가열하였다. 상기 공정 동안, pH를 계속 모니터링하고, 적절하게는 조정하였다.

[0211] 최종 온도에 도달한 후, 처음에 가루 60 g으로 시작하여 추가의 가루를 첨가하였다. 또한,  $\text{CaCl}_2$  원액 0.13 ml를 슬러리에 첨가하여  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 70 ppm으로 유지하였다. 첨가 동안, 온도를 85°C에서 일정하게 유지하였다. 추가 부분 (가루 40 g 및  $\text{CaCl}_2$  원액 0.1 ml)을 첨가하기 전에 반응을 확실하게 완료시키기 위해 10분 이상이 경과하도록 하였다. 테르마일 1.1 ml를 첨가한 후, 추가 부분 (가루 40 g 및  $\text{CaCl}_2$  원액 0.1 ml)을 첨가하였다. 55 중량%의 건조 물질 함량에 도달하였다. 첨가 후, 온도를 100°C로 상승시키고, 슬러리를 10분 동안 비등시켰다.

[0212] 샘플을 채취하고, 실온으로 냉각시켰다. 샘플을 탈이온수로 희석 (대략 1:10)시킨 후에, 농축된 루골 용액 (리터 당 요오드 5 g과 요오드화칼륨 10 g의 혼합물) 한 방울을 첨가하였다. 짙은 청색은 잔류 전분이 존재함을 나타내며, 모든 전분이 가수분해되었을 때 갈색이 관찰되었다. 시험에서 잔류 전분의 일부가 존재하는 것으로 나타나는 경우, 온도를 다시 85°C로 내리고, 일정하게 유지하였다. 요오드-전분 반응이 음성이 될 때까지 테르마일 추가 1.1 ml를 첨가하였다.

[0213] 후속 당화 반응을 위해, 전분에 대해 음성인 것으로 시험된 혼합물을 61°C가 되게 하였다. 50% 농도의 진한 황산을 첨가하여 pH를 4.3으로 맞추었다. 반응하는 동안 pH를 상기 값에서 유지하였다. 온도를 61°C에서 유지하였다. 엑스트로자임 GA (노보자임스 A/S) 5.74 ml (= 효소 1.5 중량%/건조 물질)를 첨가하여 액화 전분을 글루코스로 전환시켰다. 반응을 1시간 동안 진행하였다. 효소를 불활성화시키기 위해, 혼합물을 85°C로 가열하였다. 멸균 용기를 고온의 혼합물로 충전하고, 냉각시키고, 이어서 4°C에 보관하였다. 370 g/1의 최종 글루코스 농도를 수득하였다.

[0214] II.3c) 밀 가루 (크실라나제를 이용한 예비처리 포함)

[0215] 탈이온수 360 g을 반응 용기에 도입하였다. 물을 55°C로 가열하고, 50 중량% 농도의 NaOH 수용액을 사용하여 pH를 6.0으로 조정하였다. 온도 및 pH를 조정한 후, 쉬어자임(Shearzyme) 500L (노보자임스 A/S) 3.21 ml (= 효소 2.5 중량%/건조 물질)를 첨가하였다. 밀 가루 155 g을 일정하게 교반하면서 용액에 천천히 풀었다. 온도 및 pH를 일정하게 유지하였다. 30분 후, 추가의 가루를 첨가하였다 (처음에 가루 55 g을 첨가함). 추가 30분 후 또 다른 50 g의 가루를 첨가하고, 30분 후 또 다른 40 g의 가루를 첨가하였다. 마지막 첨가 30분 후, 액화를 시작할 수 있었다.

[0216] 액화는 II.3b에 기재된 바와 같이 수행하였다. 400 g/1의 최종 글루코스 농도를 수득하였다.

[0217] III. 균주 ATCC13032 lysC<sup>fbr</sup>

[0218] 하기 일부 실시예에서, 명칭 ATCC13032 lysC<sup>fbr</sup>로 WO 05/059144에 기재된 변형된 코리네박테리움 글루타미쿰을 사용하였다.

[0219] 실시예 1

[0220] 각 경우에서, 옥수수, 밀 및 호밀 가루 가수분해물질을 하기 1) 하에 기재된 바와 같이 제조하였다. 각각의 상기 배지에서 전체 당 함량을, 각종 당 용액 (글루코스, 조 당, 당밀 포함)을 첨가하여 증가시켰다. 탄소 공급 원료로서 코리네박테리움 글루타미쿰 (ATCC13032 lysC<sup>fbr</sup>) 및 바실루스 PA824 (WO 02/061108에 상세하게 기재됨)를 사용하여 진탕-플라스크 실험에서 상기 배지를 사용하였다.

[0221] 1) 옥수수 가수분해물질의 제조

[0222] a) 옥수수 가루 가수분해물질

[0223] 탈이온수 360 g을 반응 용기에 도입하였다. 옥수수 가루 155 g을 일정하게 교반하면서 물에 천천히 풀었다.

[0224] - 액화

[0225] 50% 농도의 NaOH 수용액을 이용하여 pH를 5.8에 이르게 한 후, 리큐오자임(Liquozyme) SC (노보자임스 A/S) 2.6 ml (= 효소 2 중량%/건조 물질)를 첨가하였다. 이어서 슬러리를 급속하게 100°C로 가열하고, 10분 동안 비등시켰다. 상기 공정 동안, pH를 계속 모니터링하고, 적절한 경우 조정하였다.

[0226] 샘플을 채취하고, 실온으로 냉각시켰다. 샘플을 탈이온수로 희석 (대략 1:10)시킨 후에, 농축된 루꼴 용액 (리터 당 요오드 5 g과 요오드화칼륨 10 g의 혼합물) 한 방울을 첨가하였다. 짙은 청색은 잔류 전분이 존재함을 나타내며, 모든 전분이 가수분해되었을 때 갈색이 관찰되었다.

[0227] - 당화

[0228] 후속 당화 반응을 위해, 전분에 대해 음성인 것으로 시험된 혼합물을 61°C가 되게 하였다. 50% 농도의 친환경산을 첨가하여 pH를 4.3으로 맞추었다. 반응하는 동안 pH를 상기 값에서 유지하였다. 온도를 61°C에서 유지하였다. 텍스트로자임 GA (노보자임스 A/S) 2.0 ml (= 효소 1.5 중량%/건조 물질)를 첨가하여 액화 전분을 글루코스로 전환시켰다. 반응을 1시간 동안 진행하였다. 효소를 불활성화시키기 위해, 혼합물을 85°C로 가열하였다. 멸균 용기를 고온의 혼합물로 충전하고, 냉각시키고, 이어서 4°C에 보관하였다.

[0229] b) 밀 가루 가수분해물질

[0230] - 크실라나제 예비처리

[0231] 탈이온수 360 g을 반응 용기에 도입하였다. 물을 55°C로 가열하고, 50 중량% 농도의 NaOH 수용액을 사용하여 pH를 6.0으로 조정하였다. 온도 및 pH를 조정한 후, 쉬어자임 500L (노보자임스 A/S) 3.21 ml (= 효소 2.5 중량%/건조 물질)를 첨가하였다. 밀 가루 155 g을 일정하게 교반하면서 용액에 천천히 풀었다. 온도 및 pH를 일정하게 유지하였다. 마지막 첨가 30분 후, 액화를 시작할 수 있었다.

[0232] 액화 및 당화를 상기 1a)에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0233] c) 호밀 가루 가수분해물질

[0234] 셀룰라제/헤미셀룰라제를 이용한 예비처리

[0235] 탈이온수 360 g을 반응 용기에 도입하였다. 호밀 가루 155 g을 일정하게 교반하면서 물에 천천히 풀었다. 온도를 50°C에서 일정하게 유지하였다. 50 중량% 농도의 황산을 사용하여 pH를 5.5로 맞춘 후, 비스코자임 L (노보자임스 A/S) 3.21 ml (= 효소 2.5 중량%/건조 물질)를 첨가하였다. 마지막 첨가 30분 후 액화를 시작할 수 있었다.

[0236] 액화 및 당화를 상기 1a)에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0237] 2) 접종물의 제조

[0238] a) 코리네박테리움 글루타미쿰의 경우

[0239] 세포를 멸균 CM+CaAc 한천 (조성: 하기 표 1 참조; 121°C에서 20분) 상에 스트리킹(streaking)한 후, 30°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 플레이트로부터 스크레이핑(scraping)하고, 염수에 재현탁시켰다. 2개의 배플이 장착된 250 ml 에를렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크 내의 배지 25 ml (하기 표 4 참조)를, 각각의 경우에 상기와 같이 제조된 세포 혼탁액의 양이 광학 밀도가 610 nm에서 OD<sub>610</sub>값 0.5에 도달하도록 접종하였다.

### 표 1

CM+CaAc 한천 플레이트의 조성

농도	구성성분
10.0 g/l	D-글루코스
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	우레아
5.0 g/l	박토 웨튼 (디프코)
5.0 g/l	이스트 추출물 (디프코)
5.0 g/l	소고기 추출물 (디프코)
20.0 g/l	카사미노산
20.0 g/l	한천

[0240]

[0241] b) 바실루스의 경우

[0242] 2개의 배플이 장착된 250 ml 에를렌마이어 플라스크 내의 예비배양 배지 42 ml (하기 표 2 참조)를 각각의 경우에 냉동 배양액 0.4 ml로 접종하고, 가습된 진탕기에서 진탕 (250 rpm)하면서 43°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

### 표 2

예비배양 배지의 조성

구성성분	농도
말토즈	28.6 g/l
대두 가루	19.0 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.6 g/l
글루탐산일나트륨	4.8 g/l
시트르산나트륨	0.95 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	9.5 mg/l
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1.9 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1.4 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1.9 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0.2 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.7 mg/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	15.2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.9 g/l
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.9 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.09 g/l
MOPS	59.8 g/l
pH*	7.2

\* 회석 KOH 수용액으로 조정함

[0243]

[0244] 2개의 배플이 장착된 250 ml 에를렌마이어 플라스크 내의 주 배양 배지 42 ml (하기 표 6 참조)를 각각의 경우

에 예비배양액 1 ml로 접종하였다.

[0245] 3) 발효액의 제조

[0246] a) 코리네박테리움 글루타미쿰의 경우

[0247] 플라스크 배지의 조성을 하기 표 4에 나열하였다. 초기 당 농도는 60 g/l이어야 한다. 당의 절반은 가수분해물질 (발효 배지 (1))로부터 기원하며, 다른 절반은 당 용액의 형태로 첨가되었다. 이를 위해, 가수분해물질과 당 용액의 혼합물을 제조하고, 플라스크 배지에 첨가하였다. 상응하는 양의 글루코스 용액을 대조군 배지에 사용하였다.

[0248] - 당이 첨가된 가루 가수분해물질의 제조

[0249] 하기 용액을 제조하였다 (표 3 참조):

### 표 3

당이 첨가된 가루 가수분해물질의 제조

가루 가수분해물질	가수분해물질 중 글루코스 농도 [g/l]	반응 혼합물 1 리터 당 가수분해물질 [ml]	당 용액	당 용액 중 농도 [g/l]	반응 혼합물 1 리터 당 당 용액 [ml]
옥수수 30%	250.0	240	글루코스	626	96
옥수수 30%	250.0	240	조 당	639	94
밀 30%	258.9	232	글루코스	626	96
밀 30%	258.9	232	조 당	639	94
호밀 30%	217.9	275	글루코스	626	96
호밀 30%	217.9	275	조 당		94

[0250]

**표 4**

플라스크 배지

당 용액을 함유한 가루 가수분해물질	500 ml/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 g/l
우 래아	5 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.113 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.138 g/l
ACES	52 g/l
MOPS	21 g/l
시트르산 x H <sub>2</sub> O	0.49 g/l
3,4-디히드록시벤조산	3.08 mg/l
NaCl	2.5 g/l
KCl	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.3 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	25 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x 4 – 6 H <sub>2</sub> O	5 mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	10 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	20 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	150 µg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 µg/l
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	100 µg/l
NiSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100 µg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	25 µg/l
비오텐 (Vit. H)	1050 µg/l
티아민 x HCl (Vit B <sub>1</sub> )	2100 µg/l
니코틴아미드	2.5 mg/l
판토텐산	125 mg/l
시아노코발아민 (Vit B <sub>12</sub> )	1 µg/l
4-아미노벤조산 (PABA; Vit. H <sub>1</sub> )	600 µg/l
엽산	1.1 µg/l
파리독신 (Vit. B <sub>6</sub> )	30 µg/l
리보플라빈 (Vit. B <sub>2</sub> )	90 µg/l
CSL	40 ml/l
pH*	6.85

\* 회색 NaOH 수용액으로 조정함

[0251]

접종 후, 플라스크를 가습된 진탕기에서 진탕 (200 rpm)하면서 30°C에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 발효가 종료된 후, 리신 함량을 HPLC에 의해 측정하였다. HPLC 분석은 애질런트(Agilent) 1100 시리즈 LC 시스템으로 수행하였다. 아미노산 농도를 애질런트 1100 시리즈 LC 시스템 HPLC 상에서 고압 액체 크로마토그래피로 측정하였다. 오르토-프탈알데히드를 이용한 예비-컬럼 유도체화는 형성된 아미노산의 정량을 가능하게 하며, 아미노산 혼합물을 애질런트 하이퍼실(Agilent Hypersil) AA 컬럼을 사용하여 분리하였다. 결과는 하기 표 5에 따랐다.

**표 5**

평균

가루 가수분해물질	당 용액	리신 [g/l]	수율*
옥수수	글루코스	12.50	0.21
	조 당	10.64	0.19
	당 밀	10.06	0.18
밀	글루코스	10.82	0.18
	조 당	10.14	0.18
	당 밀	9.67	0.17
호밀	글루코스	10.89	0.18
	조 당	9.59	0.16
	당 밀	9.67	0.16
대조군		11.54	0.20

\* 총 글루코스 동등물 기준

[0253]

b) 바실루스의 경우

[0254]

플라스크 배지의 조성을 하기 표 6에 나열하였다. 초기 글루코스 농도가 28.6 g/l이어야 한다. 당의 절반은 가수분해물질로부터 기원하며, 다른 절반은 글루코스 용액의 형태로 첨가되었다. 상응하는 양의 글루코스 용액을 대조군 배지에 사용하였다.

표 6

플라스크 배지

옥수수	250 g/l †	57 ml/l ‡		
밀	259 g/l †		55 ml/l ‡	
호밀	218 g/l †			67 ml/l ‡
글루코스 용액 (c=626 g/l)	23 ml/l			
대두 가루	19.0 g/l			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.6 g/l			
글루탐산일나트륨	4.8 g/l			
시트르산나트륨	0.95 g/l			
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	9.5 mg/l			
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1.9 mg/l			
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1.4 mg/l			
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1.9 mg/l			
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0.2 mg/l			
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.7 mg/l			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	15.2 g/l			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.9 g/l			
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.9 g/l			
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.09 g/l			
MOPS	59.8 g/l			
pH*	7.2			

\* 회색 NaOH 수용액으로 조정함

† 가수분해물질 중 글루코스 농도

‡ 배지 1 리터 당 중량측정된 가수분해물질의 필요량

[0256]

[0257]

접종 후, 플라스크를 가습된 진탕기에서 진탕 (250 rpm)하면서 43°C에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 발효가 종료된 후, 글루코스 및 판토텐산 함량을 HPLC로 측정하였다. 글루코스를 바이오-라드(Bio-Rad)사의 아미넥스(Aminex) HPX-87H 컬럼을 이용하여 측정하였다. 판토텐산 농도를 아쿠아(Aqua) C18 컬럼 (페노메넥스(Phenomenex)) 상에서의 분리를 통해 측정하였다.

[0258]

결과는 하기 표 7에 따랐다.

표 7

24시간 후 평균

	판토텐산, t=24h [g/l]	수율 [g 판토텐산/g 글루코스]
옥수수	2.7	0.09
밀	2.4	0.08
호밀	2.7	0.09
대조군	2.7	0.09

[0259]