發明專利說明書

200745342

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95137997

※ 申請日期：95.9.7　　※IPC 分類：C12P 19/14 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12S 7/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

非揮發性固態微生物代謝物之發酵生產

FERMENTATIVE PRODUCTION OF NONVOLATILE MICROBIAL METABOLITES IN SOLID FORM

二、申 請 人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商巴地斯顏料化工廠

BASF AKTIENGESELLSCHAFT

代表人：(中文/英文)

1. 貝蕾爾
   BIELLER
2. 寇斯特
   KOESTER

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國來恩河勞域沙芬市卡羅玻斯克街

CARL-BOSCH-STRASSE, 67056 LUDWIGSHAFEN, GERMANY

國　籍：(中文/英文)

德國　GERMANY

三、發明人：(共 6 人)

姓　名：(中文/英文)

1. 馬可斯　龐培傑斯
POMPEJUS, MARKUS

2. 史提芬　費瑞爾
FREYER, STEPHAN

3. 馬可斯　羅斯蓋特
LOHSCHEIDT, MARKUS

4. 歐斯卡　塞爾得
ZELDER, OSKAR

5. 馬席斯　波伊
BOY, MATTHIAS

6. 艾茲爾德　史勾登
SCHOLTEN, EDZARD

國　籍：(中文/英文)

1. 德國　GERMANY

2. 德國　GERMANY

3. 德國　GERMANY

4. 德國　GERMANY

5. 德國　GERMANY

6. 德國　GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 德國；2005年09月07日；102005042541.0

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☑ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☑ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於藉由研磨、液化及糖化選自穀粒之澱粉原料並藉由使用用於發酵之所得含糖液體培養基之非揮發性固態微生物代謝物的發酵生產。

【先前技術】

藉由微生物發酵來生產諸如胺基酸、維生素及類胡蘿蔔素之非揮發性微生物代謝物的方法一般已為吾人所知。對於此目的，可取決於各種製程條件而使用不同碳原料。碳原料自純蔗糖經由甜菜及甘蔗糖蜜(所謂高質糖蜜(經轉化之甘蔗糖蜜))擴展至來自澱粉水解產物之葡萄糖。此外，提及乙酸及乙醇作為可以工業規模用於生物技術生產L-離胺酸的輔受質(Pfefferle等人，Biotechnological Manufacture of Lysine, Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology，第79卷(2003), 59-112)。

基於以上提及之碳原料，用於糖基發酵生產非揮發性微生物代謝物之各種方法及程序得以確立。以L-離胺酸為例，例如Pfefferle等人(在上述引文中)就菌株開發、製程開發及工業生產對該等方法及程序已加以描述。

用於微生物介導發酵生產非揮發性微生物代謝物的重要碳原料為澱粉。澱粉在其可用作發酵之碳原料之前必須首先在先前反應步驟中進行液化及糖化。為此，澱粉通常以預純化形式獲自諸如馬鈴薯、木薯、穀物(例如小麥、玉蜀黍(玉米)、大麥、黑麥、黑小麥或稻)之天然澱粉原料，

且隨後經酶促液化且糖化，之後將其用於實際發酵以便生產所需代謝物。

除描述使用該等預純化之澱粉原料外，亦描述使用未預處理之澱粉原料來製備用於非揮發性微生物代謝物之發酵生產的碳原料。一般地，最初藉由研磨將澱粉原料粉碎。接著使研磨基料經受液化及糖化。由於此研磨基料天然地包含除澱粉外之一系列對發酵有不利影響的非澱粉成分，因此通常在發酵前將該等成分移除。移除可在研磨後直接進行(WO 02/277252；JP 2001-072701；JP 56-169594；CN 1218111)，在液化後直接進行(WO 02/277252；CN 1173541)，或隨後直至糖化時進行(CN 1266102；Beukema等人：Production of fermentation syrups by enzymatic hydrolysis of potatoes; potato saccharification to give culture medium (Conference Abstract), Symp. Biotechnol. Res. Neth. (1983), 6; NL8302229)。然而，所有變體均涉及在發酵中使用大體上純的澱粉水解產物。

最新技術特別研究經改良之方法，該等方法意欲使經液化且糖化之澱粉溶液(JP 57159500)及獲自可再生資源之發酵培養基(EP 1205557)之純化在發酵前進行成為可能。

相比而言，已知未處理之澱粉原料可大規模應用於生物乙醇之發酵生產。乾研磨、液化且糖化澱粉原料之方法(稱為乾式研磨)已大規模地在工業上確立。適當方法之描述可發現於例如"The Alcohol Textbook-A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries", Jaques等

人(編)，Nottingham Univ. Press 1995, ISBN 1-8977676-735及McAloon等人，"Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks", NREL/TP-580-28893, National Renewable Energy Laboratory，2000年10月。

在乾式研磨方法中，在第一步驟中使完整穀粒(較佳玉蜀黍、小麥、大麥、高粱及粟、及黑麥)成細粉狀。與稱為"濕式研磨"之方法相比，乾式研磨方法不添加其他液體。研磨成精細組分之目的為使穀粒內存在之澱粉在隨後的液化及糖化中易於受水及酶作用。

由於在生物乙醇之發酵生產中，重要產物藉由蒸餾獲得，因此使用呈未預純化形式之來自乾式研磨方法之澱粉原料並不存在特別的問題。然而，當使用乾式研磨方法來生產非揮發性微生物代謝物時，經由糖溶液引入發酵中之固體流為有問題的，因為其不僅可對發酵產生不良影響，而且亦會使後續處理相當複雜。

因此，在很多發酵中對所用微生物供給氧係限制性因素，尤其當發酵具有需氧要求時。總之，關於高固體濃度對氧自氣相轉移至液相且從而對氧轉移速率的影響，知之甚少。另一方面，吾人已知，黏度隨著固體濃度增大而增加，導致氧轉移速率減小。此外，若將表面活性物質連同固體一起引入發酵培養基中，則其影響氣泡凝聚之趨勢。所得氣泡大小又對氧轉移具有顯著的影響(Mersmann, A.等人：Selection and Design of Aerobic Bioreactors, Chem.

Eng. Technol. 13 (1990), 357-370)。

因為引入固體，所以所用培養基之臨界黏度值可早在製備含澱粉懸浮液期間已達到，因此具有30%重量比以上之研磨玉米於水中的懸浮液不再能均勻混合(Industrial Enzymology，第二版，T. Godfrey, S. West, 1996)。在習知程序中，此限制葡萄糖濃度。通常，由於此導致發酵液之非比例稀釋，因此對於製程經濟原因，使用具有較低濃度之溶液為不利的。此造成目標產物之最後可達成濃度降低，當將該等產物自發酵培養基分離時，其導致額外成本；且空時產率降低，在給定同等生產量的情況下，其導致容積需求更高，意即投資成本更高。

由於該等困難，乾式研磨方法之先前技術變體不適於提供用於發酵生產非揮發性微生物代謝物的澱粉原料，且因此不具有特別的經濟價值。迄今為止，僅描述對於將乾式研磨概念及優點(原則上其存在與此方法相關)應用至非揮發性微生物代謝物之工業規模生產(使用木薯作為澱粉原料)的嘗試。

因此，儘管JP 2001/275693描述一種發酵生產胺基酸的方法，其中將已在乾燥狀態下研磨之去皮木薯塊莖用作澱粉原料，但仍需要執行將研磨基料之粒度調節至小於等於150 μm的製程。在用於此目的之過濾步驟中，將所使用之10%重量比以上之研磨基料(包括含有非澱粉之成分)移除後，再將所包含之澱粉液化/糖化且隨後發酵。JP 2001/309751中描述生產含胺基酸之飼料添加劑的類似方

法。

然而，就乾式研磨方法而言，與其他澱粉原料、尤其穀物或穀粒相比，木薯應該相對而言為沒有問題的。儘管澱粉一般佔乾木薯根之至少80%重量比(Menezes等人，Fungal celluloses as an aid for the saccharification of Cassava, Biotechnology and Bioengineering，第20卷(4), 1978, John Wiley and Sons, Inc.，表1，第558頁)，但在穀物中澱粉含量(乾物質)相對低得多，通常小於70%重量比；例如在玉米之狀況中澱粉含量等於約68%重量比，且在小麥之狀況中澱粉含量等於約65%重量比(Jaques等人，The Alcohol Textbook，如上)。因此，當使用乾研磨之木薯時，液化且糖化後所獲得之葡萄糖溶液包含的污染物更少，尤其固體更少。當使用穀粒作為澱粉原料時，由於該等污染物及尤其非澱粉固體在該等澱粉原料中比在木薯中佔顯著更大的部分，因此其證明是有問題的。此係因為量增大之污染物顯著增加反應混合物之黏度。

然而，木薯澱粉相對而言易於處理。儘管在膨脹溫度下其與玉米澱粉相比具有更高的黏度，但在溫度增大時相反，例如黏度在木薯之狀況下比在玉米澱粉之狀況下降低更快(Menezes, T.J.B. de, Saccharification of Cassava for ethyl alcohol production, Process Biochemistry, 1978，第24頁，右行)。此外，木薯澱粉之膨脹及糊化溫度比來自諸如玉米之穀物之澱粉的彼等溫度更低，此為木薯澱粉比穀物澱粉更易接近細菌α-澱粉酶的緣由(Menezes, T.J.B.

de，在上述引文中)。

木薯勝過穀物澱粉原料之其他優點為其低的纖維素含量及其低的植酸鹽含量。纖維素及半纖維素尤其在酸性糖化條件下可轉化為糠醛(Jaques等人，The Alcohol Textbook，如上；Menezes, T.J.B. de，如上)，糠醛又對發酵中所使用之微生物具有抑制效應。植酸鹽同樣抑制發酵所使用之微生物。

儘管從技術方面而言，從而可能在與乾式研磨方法對應之製程中將木薯作為澱粉原料處理，但是該基於木薯之製程仍為複雜的，並非最優化的且因此並未廣泛使用。迄今為止，並未報導關於在對應於乾式研磨製程之方法中將穀物作為澱粉原料用於生產諸如非揮發性微生物代謝物之精細化學品的用途。

WO 2005/116228首先係關於用於微生物生產精細化學品之糖基發酵方法，其中所用澱粉原料為在發酵前未移除非澱粉成分之穀粒或其他乾穀粒或種子的研磨基料。未描述自發酵液大體移除揮發性成分、產生包含發酵產物之固體。

【發明內容】

本發明之一目標為提供一種糖基發酵生產非揮發性微生物代謝物的有效方法，該方法允許使用包括玉米之穀物作為澱粉原料。該方法使簡單處理發酵混合物、尤其藉助於乾燥過程簡單處理發酵混合物成為可能。此外，該方法特徵在於易於處理所用培養基且尤其避免發酵前之例如移除

固體非澱粉成分之複雜預純化或主要純化步驟。

根據申請者公司所執行的工作，已驚人發現，藉由在至少一種澱粉液化酶存在下、在水性液體中液化自穀粒所獲得之研磨基料以便製備含糖液體培養基，且隨後使用至少一種糖化酶糖化該混合物而使該方法以有效方式進行(儘管固有地增加固體含量)，在該方法中，對於液化目的，在液化期間將研磨基料之至少一部分連續或分批地添加至水性液體中。

因此，本發明係關於一種藉由基於糖之微生物發酵生產至少一種非揮發性固態微生物代謝物的方法，該方法中使用具有以液體培養基總重量計之20%重量比以上的單醣含量的含糖液體培養基培育生產所需代謝物之微生物菌株，且隨後大量移除發酵液之揮發性成分，該含糖液體培養基藉由如下製備：

a1) 藉由研磨選自穀粒之澱粉原料製備研磨基料；及

a2) 在至少一種澱粉液化酶存在下在水性液體中液化該研磨基料，繼之使用至少一種糖化酶糖化；

其中，對於液化目的，在液化期間將該研磨基料之至少一部分連續或分批地添加至水性液體中。

適用作澱粉原料的主要為乾穀粒或種子，其中澱粉量等於至少40%重量比且較佳至少50%重量比(以乾態計)。該等澱粉原料可見於目前大規模種植之很多穀類植物中，諸如玉米(玉蜀黍)、小麥、燕麥、大麥、黑麥、黑小麥、稻及各種蜀黍及粟種，例如甜高粱及高粱。澱粉原料較佳選

自玉米、黑麥、黑小麥及小麥仁。原則上，本發明之方法亦可使用類似澱粉原料(諸如各種含澱粉類似穀粒或種子之混合物)進行。

存在於根據本發明所製備之含糖液體培養基中的糖大體上為單醣，諸如己醣及戊醣，例如葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、山梨糖、木糖、阿拉伯糖及核糖，尤其葡萄糖。除葡萄糖外之單醣之量可視所用澱粉原料及其中所存在之非澱粉成分而變，且可受所執行之反應(例如藉由添加纖維素酶分解纖維素成分)之影響。含糖液體培養基之單醣有利地包含以含糖液體培養基中所存在糖之總重量計至少60%重量比、較佳至少70%重量比且特別較佳至少80%重量比之量的葡萄糖。一般而言，葡萄糖量為以含糖液體培養基中所存在糖之總重量計75%重量比至99%重量比、尤其80%重量比至97%重量比且特定85%重量比至95%重量比範圍內。

根據本發明所製備之液體培養基中之單醣的濃度、尤其葡萄糖的濃度通常為以液體培養基之總重量計至少25%重量比，較佳至少30%重量比，更佳至少35%重量比，尤其至少40%重量比，例如25%重量比至55%重量比，尤其30%重量比至52%重量比，特別較佳35%重量比至50%重量比且特定40%重量比至48%重量比。

根據本發明，用以培養生產所需代謝物之微生物菌株的含糖液體培養基包含存在於經研磨之穀粒中之非澱粉固體組分的至少一部分，較佳為至少20%重量比，尤其至少

50%重量比，特別至少90%重量比且更特別至少99%重量比(相當於萃取率)。基於研磨基料之澱粉成分(且從而基於含糖液體培養基中之單醣之量)，含糖液體培養基中之非澱粉固體成分的量較佳等於至少10%重量比且尤其至少25%重量比，例如25%重量比至75%重量比且特定30%重量比至60%重量比。

為製備含糖液體培養基，在添加或不添加液體(例如水)、較佳不添加液體的情況下，將所述澱粉原料在步驟a1)中研磨。亦可將乾式研磨與隨後的濕式研磨步驟組合。一般用於乾式研磨的裝置為錘磨機、旋轉研磨機或輥研磨機；適合於濕式研磨的彼等裝置為槳式混合機、攪拌式球磨機、循環研磨機、圓盤研磨機、環狀腔研磨機、振動研磨機或行星式研磨機。原則上，其他研磨機亦為適當的。濕式研磨所需液體量可由熟習該項技術者在常規實驗中確定。一般以使乾物質含量在10%重量比至20%重量比範圍內之方式調節。

研磨產生適於隨後製程步驟的粒度。在本上下文中，當在步驟a1)之研磨步驟、尤其乾式研磨步驟中所獲得之研磨基料具有30%重量比至100%重量比、較佳40%重量比至95%重量比且特別較佳50%重量比至90%重量比之量之100 μm至630 μm範圍內粒度之粉粒(意即微粒成分)時，經證明其為有利的。較佳地，所獲得之研磨基料包含50%重量比、100 μm以上粒度之粉粒。通常，所得至少95%重量比之粉粒具有2 mm以下之粒度。在本上下文中，使用振動分

析器藉助於篩析來量測粒度。原則上，小粒度有利於獲得高產物產率。然而，粒度過小會在在液化或處理期間(例如在發酵步驟後之固體乾燥期間)使研磨基料漿化時產生問題，尤其因凝塊形成/凝聚所產生之問題。

一般而言，細粉可藉由萃取率或藉由細粉等級加以表徵，其彼此間的關係特點為細粉等級隨萃取率增大而增加。萃取率相當於以100重量份所用研磨基料計所獲得之細粉的以重量計之量。儘管在研磨製程期間最初例如自穀仁內部獲得超細純粉，但細粉中之粗纖維之量及穀殼含量增加，而在進一步研磨期間意即增加萃取率，澱粉比例降低。因此，萃取率亦表現所謂之細粉等級，其用作細粉(尤其穀類細粉)分級之圖式，且其基於細粉之灰分含量(稱為灰分比率)。細粉等級或類型數目表示當焚燒100 g細粉固體時留下的灰分(礦物)的量(mg)。在穀類細粉之狀況中，較高類型數目意謂較高萃取率，因為穀仁之核心包含約0.4%重量比之灰分，而穀殼包含約5%重量比之灰分。在較低萃取率之狀況中，穀類細粉從而主要由經粉碎之胚乳(意即穀仁之澱粉成分)組成；在較高萃取率之狀況中，穀類細粉亦包含穀粒之經粉碎之含蛋白糊粉層；在粗糙研磨之狀況中，穀類細粉亦包含含蛋白且含脂肪胚之成分以及種子殼之成分(其包含粗纖維及灰分)。對於本發明之目的而言，具有高萃取率或高類型數目之細粉原則上較佳。若使用穀類作為澱粉原料，則較佳(若適當在先期將胚芽及穀殼機械移除之後)將完整穀仁連同其穀殼一起研磨且

處理。

為液化存在於研磨基料中的澱粉，在步驟a2)中，在液化步驟過程中將研磨基料之至少一部分、較佳至少40%重量比、尤其至少50%重量比且特別較佳至少55%重量比引入反應器中，但較佳在糖化步驟之前進行。通常，研磨基料之添加量不超過以所用研磨基料之總重量計之90%重量比，尤其為85%重量比且特別較佳為80%重量比。一般地，在液化過程中所添加之研磨基料的部分在液化步驟期間之主導條件下提供至反應器中。添加可以若干部分分批(意即逐份)實施，在每種狀況中添加量較佳不超過待液化之研磨基料之總重量的20%重量比，特別較佳不超過10%重量比，例如1%重量比至20%重量比，尤其2%重量比至10%重量比；或者添加可另外連續實施。對於本發明必不可少的為，在液化製程開始時反應器中僅存在研磨基料之一部分，較佳不超過研磨基料之60%重量比、尤其不超過50%重量比且特別較佳不超過45%重量比，且在液化步驟期間添加研磨基料之剩餘物。

研磨基料可作為粉末(意即不與水混合)或作為於水性液體(例如淡水、再循環處理用水(例如來自發酵或處理))中之懸浮液而添加。

液化亦可例如以多步反應串級連續進行。

根據本發明，步驟a2)中之液化在至少一種較佳選自α-澱粉酶之澱粉液化酶的存在下進行。同樣可使用在反應條件下有活性且穩定且液化穩定澱粉的其他酶。

參考α-澱粉酶之使用進行以下說明；然而該等說明一般適用於所有澱粉液化酶。

α-澱粉酶(或所用澱粉液化酶)首先可引入反應容器重或在步驟a2)過程中添加。較佳地，步驟a2)中所需α-澱粉酶之一部分在步驟a2)開始時添加或首先放置於反應器內。澱粉酶之總量一般在以所用澱粉原料之總重量計之0.002%重量比至3.0%重量比、較佳0.01%重量比至1.5%重量比且特別較佳0.02%重量比至0.5%重量比範圍內。

液化可在高於或低於膠凝溫度下進行。較佳地，步驟a2)中之液化在至少部分高於所用澱粉之膠凝溫度下進行(稱為蒸煮法)。通常，選擇70℃至165℃、較佳80℃至125℃且特別較佳85℃至115℃範圍內之溫度，該溫度較佳高於膠凝溫度至少5℃且特別較佳高於膠凝溫度至少10℃。

為達成最佳的α-澱粉酶活性，步驟a2)較佳地至少部分地在弱酸性範圍內之pH下、較佳在4.0與7.0之間、特別較佳在5.0至6.5之pH下進行，該pH一般在步驟a2)之前或步驟a2)開始時進行調節；較佳地，在液化期間檢查該pH，且若適當則對其進行再調節。pH較佳使用諸如H_2SO_4或H_3PO_4之稀無機酸或諸如氫氧化鈉水溶液(NaOH)或氫氧化鉀水溶液(KOH)之鹼金屬氫氧化物稀溶液或諸如氫氧化鈣水溶液之鹼土稀溶液來調節。

在一較佳實施例中，本發明之方法之步驟a2)以如下方式進行：首先將以研磨基料之總重量計不超過60%重量

比、較佳不超過50%重量比且特別較佳不超過45%重量比、例如10%重量比至60%重量比、尤其15%重量比至50%重量比且特別較佳20%重量比至45%重量比之量的一部分懸於水性液體(例如淡水、再循環處理用水(例如來自發酵或處理階段))中或該等液體之混合物中；且隨後進行液化。

用於製備研磨基料之懸浮液的液體可預熱至適度升高之溫度，例如40℃至60℃範圍內之溫度。較佳地，用於製備研磨基料之懸浮液的液體不超過30℃且尤其處於室溫，意即15℃至28℃。

接著，將至少一種澱粉液化酶、較佳α-澱粉酶添加至該懸浮液中。若使用α-澱粉酶，則僅添加α-澱粉酶之一部分(例如以步驟a2)中所用全部α-澱粉酶計之10%重量比至70%重量比、尤其20%重量比至65%重量比)為有利的。此時及時添加之α-澱粉酶的量視所述α-澱粉酶在與所用澱粉原料相關之反應條件下的活性而定，且一般在以所用澱粉原料之總重量計之0.0004%重量比至2.0%重量比、較佳0.001%重量比至1.0%重量比且特別較佳0.02%重量比至0.3%重量比範圍內。或者，可在製備懸浮液之前使α-澱粉酶部分與所用液體混合。

在本上下文中，較佳地將α-澱粉酶部分在加熱至用於開始液化之溫度之前(詳言之，在室溫或經僅適度升高之溫度下，例如20℃至30℃範圍內之溫度下)添加至懸浮液中。

有利地，α-澱粉酶及研磨基料之量以糖化製程、尤其膠

凝製程期間黏度充分減小以便例如藉助於攪拌使懸浮液的有效混合成為可能之方式進行選擇。膠凝期間反應混合物之黏度較佳不超過20 Pas、特別較佳不超過10 Pas且特別更佳不超過5 Pas。通常，在50℃溫度及200 s^{-1}之剪切速率下使用配有M5量測系統及MVDIN儀錶之Haake黏度計型Roto Visko RV20來量測黏度。

接著將如此所製得之懸浮液較佳在高於所用澱粉之膠凝溫度之溫度下加熱。通常，選擇70℃至165℃、較佳80℃至125℃且特別較佳85℃至115℃範圍內之溫度，該溫度較佳為高於膠凝溫度至少5℃且尤特別較佳高於膠凝溫度至少10℃。監測黏度的同時，將研磨基料之其他部分例如逐份地(在每種狀況下以所用全部研磨基料計之2%重量比至20%重量比且尤其5%重量比至10%重量比之份額)逐步添加至研磨基料之懸浮液中。較佳地，在液化步驟過程中以至少2、較佳至少4且特別較佳至少6份將各份研磨基料添加至反應混合物中。或者，可在液化步驟期間連續添加未用於製備懸浮液的研磨基料的部分。在添加期間，應使溫度有利地保持在澱粉之膠凝溫度以上。較佳地，以分別在添加及液化步驟期間使反應混合物之黏度為至多20 Pas、尤其較佳至多10 Pas且尤其更佳至多5 Pas之方式添加研磨基料。

所有研磨基料均添加完後，一般使反應混合物保持在設定高於澱粉膠凝溫度(在此溫度下研磨基料之澱粉成分得以蒸煮)之溫度下保持一段時間，例如30至60分鐘或更

久。接著，通常在添加另一α-澱粉酶部分(較佳為主要部分)之前將反應混合物冷卻至稍高於膠凝溫度之溫度，例如75℃至90℃。視所用α-澱粉酶在反應條件下的活性而定，此時及時所添加之α-澱粉酶的量較佳為以所用澱粉原料之總重量計之0.002%重量比至2.0%重量比、特別較佳為0.01%重量比至1.0%重量比且特別更佳為0.02%重量比至0.4%重量比。

在該等溫度下，澱粉之粒狀結構被損壞(膠凝)，使澱粉之酶促降解(液化)成為可能。為使澱粉完全降解為糊精，將反應混合物保持在設定溫度，或若適當則進一步加熱直至澱粉藉助於碘偵測為止，或若適當則進一步加熱直至用於偵測澱粉之另一測試為陰性或至少大體上為陰性為止。若適當，則此刻可將一或多個其他α-澱粉酶部分(例如以所用澱粉原料之總重量計之0.001%重量比至0.5%重量比且較佳0.002%重量比至0.2%重量比範圍內之α-澱粉酶部分)添加至反應混合物中。

澱粉液化結束後，將存在於液體培養基中的糊精連續或分批(較佳連續地)糖化，意即分解為葡萄糖。液化培養基在提供至發酵步驟b)之前可在特殊糖化貯槽中全部糖化。然而，證明在發酵前僅進行部分糖化為有利的。舉例而言，可遵循以下程序，其中將存在於液體培養基中之例如以糊精(或原澱粉)之總重量計之10%重量比至90%重量比且尤其20%重量比至80%重量比範圍內之糊精的一部分糖化，且將所製得之含糖液體培養基用於發酵。接著在發酵

培養基中就地進行進一步糖化。此外，糖化可直接在發酵槽中(就地)進行，而無需單獨的糖化貯槽。

就地糖化(意即部分或完全發生在發酵槽中的糖化)的優點為：首先，支出減少；其次，葡萄糖之延時釋放容許(若適當)分批提供更高濃度的葡萄糖，而不抑制正觀察之所用微生物中的代謝變化。舉例而言，在大腸桿菌(E. coli)之狀況中，過高的葡萄糖濃度導致形成有機酸(乙酸酯)，而在該狀況中，儘管充氣發酵槽中存在足量的氧，但釀酒酵母(Saccharomyces cerevisae)例如會轉向發酵(Crabtree效應)。葡萄糖之延遲釋放可藉由控制葡糖澱粉酶濃度來調節。此容許抑制上述效應，且最初可引入更多的受質以使添加之進料液流所導致的稀釋得以減少。

在單獨糖化之狀況中，例如在糖化貯槽中之糖化，一般使經液化之澱粉溶液冷卻或溫至糖化酶之最適宜溫度或稍低，例如50℃至70℃、較佳60℃至65℃，且隨後以葡糖澱粉酶處理。

若糖化在發酵槽中進行，則通常將經液化之澱粉溶液在饋入發酵槽之前冷卻至發酵溫度，意即32℃至37℃。在該狀況下，將用於糖化之葡糖澱粉酶(或至少一種糖化酶)直接添加至發酵液中。根據步驟a2)之液化澱粉之糖化此刻與糖藉由微生物之代謝平行進行。

在添加葡糖澱粉酶之前，將液體培養基之pH有利地調節至所用葡糖澱粉酶之最適宜的活性範圍內之值，較佳3.5至6.0、特別較佳4.0至5.5且特別更佳4.0至5.0範圍內之

值。然而，尤其在直接在發酵槽中進行糖化時，亦可將pH調節至超出上述範圍之值，例如6.0至8.0範圍內之值。儘管標準葡糖澱粉酶之活性在此pH範圍內受到限制，但例如在離胺酸、泛酸鹽及維生素B_2之生產中此可為最大優點；或因為調節發酵條件而需要如此。

在一較佳實施例中，糖化在特殊糖化貯槽中進行。為此，將經液化之澱粉溶液調節至酶之最適宜的溫度或稍低，且以上述方式將pH調節至酶之最適宜值。

通常，將葡糖澱粉酶以用所用澱粉原料之總重量計之0.001%重量比至5.0%重量比、較佳0.005%重量比至3.0%重量比且特別較佳0.01%重量比至1.0%重量比之量添加至含糊精液體培養基中。葡糖澱粉酶添加完後，將含糊精之懸浮液較佳保持在設定溫度下歷時例如2至72小時或更久(若需要)尤其5至48小時之時間，糊精被糖化以形成單醣。使用熟習該項技術者已知之方法(例如HPLC、酶檢定或葡萄糖測試條)監測糖化製程之進行。當單醣濃度大體上不再升高或甚至下降時，糖化完成。

在一較佳實施例中，在步驟a2)中，在至少一種α-澱粉酶及至少一種葡糖澱粉酶存在下以使液體培養基之黏度不超過20 Pas、較佳不超過10 Pas且特別較佳不超過5 Pas之方式進行研磨基料之添加。為有助於控制黏度，證明在高於存在於研磨基料中之澱粉之糊化溫度的溫度下添加以所添加之研磨基料之總重量計至少25%重量比、較佳至少35%重量比且特別較佳至少50%重量比的研磨基料為有利的。

此外，黏度之控制可藉由逐份添加至少一種澱粉液化酶(較佳α-澱粉酶)及/或至少一種糖化酶(較佳葡糖澱粉酶)本身而影響。

藉由實施步驟a1)及a2)，可能生產如下含糖液體培養基，其單醣含量、尤其葡萄糖含量較佳為以液體培養基之總重量計之25%重量比以上，例如30%重量比以上或35%重量比以上，且特別較佳為40%重量比以上，例如大於25%重量比至55%重量比，尤其大於30%重量比至52%重量比，特別較佳大於35%重量比至50%重量比且特定大於40%重量比至48%重量比。液體培養基中之總固體含量則一般為30%重量比至70%重量比，經常為35%重量比至65%重量比，尤其為40%重量比至60%重量比。單醣濃度及葡萄糖濃度(分別地)與固體含量以本身已知之方式視液化所用之研磨基料與液體量的比率及研磨基料之澱粉含量的比率而定。

可用於液化研磨基料中之澱粉部分的酶原則上全部為α-澱粉酶(酶類EC 3.2.1.1)，尤其為獲自地衣芽孢桿菌(Bacillus lichenformis)或嗜熱脂肪芽孢桿菌(Bacillus staerothermophilus)之α-澱粉酶，及特定為用於液化藉由與生產生物乙醇相關之乾式研磨方法所獲得之物質的彼等物。適用於液化的α-澱粉酶亦可為市售的，例如自Novozymes以商品名Termamyl 120 L，類型L購得；或自Genencor以商品名Spezyme購得。液化中亦可使用不同α-澱粉酶之組合。

可用於糖化經液化之澱粉溶液中之糊精(意即寡醣)的酶原則上為所有適於糖化的酶，一般為葡糖澱粉酶(酶類EC 3.2.1.3)。詳言之，獲自麴菌(Aspergilus)之葡糖澱粉酶且特定用於糖化藉由與生產生物乙醇相關之乾式研磨方法所獲得之物質的彼等物為適用的。適於糖化的酶亦可為市售的，例如自Novozymes以商品名Dextrozyme GA購得；或自Genencor以商品名Optidex購得。亦可使用不同糖化酶(例如不同葡糖澱粉酶)之組合。

為使所使用之酶穩定，若適當，則例如可使用$CaCl_2$或$Ca(OH)_2$將Ca^{2+}離子之濃度調節至酶特定最適宜的值。適當的濃度值可藉由熟習該項技術者在常規實驗中確定。舉例而言，若使用高溫澱粉酶作為α-澱粉酶，則在液體培養基中將Ca^{2+}濃度調節至例如50 ppm至100 ppm、較佳60 ppm至80 ppm且特別較佳約70 ppm為有利的。

由於為生產a1)之含糖液體培養基研磨全部的澱粉原料，意即全部的穀仁，因此亦存在澱粉原料之非澱粉固體成分。此經常造成自穀粒引入不能忽略之量的植酸鹽。為避免因此造成之抑制效應，在使含糖液體培養基經受發酵步驟之前、在步驟a2)中添加至少一種植酸酶至液體培養基中為有利的。

若植酸酶對各自的高溫足夠穩定，則其可在液化或糖化之前、期間或之後添加。

只要在各種狀況中任何植酸酶的活性受反應條件的影響微乎其微，便可使用。所用植酸酶較佳具有(T50)大於50℃

且特別較佳大於60℃的熱穩定性。

植酸酶之量通常為1至10000單位/公斤澱粉原料且尤其為120至21000單位/公斤澱粉原料。

為增大糖總產率或獲得游離胺基酸，可在生產含糖液體培養基期間另外添加其他酶(例如支鏈澱粉酶、纖維素酶、半纖維素酶、葡聚糖酶、木糖聚糖酶、葡糖苷酶或蛋白酶)至反應混合物。該等酶之添加可對黏度具有正效應，意即降低黏度(例如藉由解離較長鏈葡聚糖及/或(阿糖)木糖膠)，且促使可代謝糖苷的釋放及(殘餘)澱粉之釋放。蛋白酶的使用具有類似的正效應，其此外使釋放充當用於發酵之生長因子的胺基酸成為可能。

根據本發明之方法，含糖液體培養基用於非揮發性微生物代謝物之發酵生產。為此，使步驟a1)及a2)中所產生之含糖液體培養基經受發酵。非揮發性微生物代謝物藉由微生物以發酵來生產。

通常，發酵製程可以熟習該項技術者所熟悉之一般已知之方式進行。所饋入之含糖液體培養基與包含微生物且最初已引入之液體培養基之間的體積比一般在約1:10至10:1、較佳約1:2至2:1範圍內，例如為約1:2或約2:1且尤其約1:1。發酵液之糖含量可尤其經由含糖液體培養基之饋入速率加以控制。通常，饋入速率以使發酵液之單醣含量在大於等於0%重量比至約5%重量比範圍內之方式加以調節；然而，發酵亦可在發酵液之顯著更高之單醣含量(例如約5%重量比至20%重量比且尤其10%重量比至20%重量

比)下進行。

若糖化及發酵獨立進行，則在步驟a)中所獲得之含糖液體培養基(若適當)可在發酵之前得以滅菌，在該製程中視情況存在之藉由研磨所引入之干擾微生物(例如污染物)藉由適當方法(一般藉由熱方法)加以毀壞。在熱方法中，通常將液體加熱至80℃以上之溫度。可在發酵之前立即使細胞毀壞或溶解。為此，使所有含糖液體培養基經受溶解或毀壞。然而，對於本發明之目的而言，證明在發酵之前執行如本文所述之滅菌步驟為並非必需的；更確切而言，證明不執行該滅菌步驟為有利的。因此，本發明之一較佳實施例係關於一種將步驟a)(或分別為步驟a1)及步驟a2))中所獲得之液體培養基直接饋至發酵(意即無先前之滅菌)或進行至少部分就地糖化的方法。

發酵除產生所需非揮發性微生物代謝物及水之外，亦產生大體包含例如發酵期間所產生的生物質、糖化澱粉溶液之非代謝成分的不溶性固體及尤其諸如溶解於發酵溶液中之纖維及成分的澱粉原料之非澱粉固體成分(可溶成分)，例如未利用之緩衝鹽及營養鹽類及未反應之單醣(意即未利用之糖)的液體培養基。在下文中，該液體培養基亦稱為發酵液，術語發酵液亦包含其中所存在糖僅進行部分或不完全之發酵轉化，意即單醣進行部分或不完全之微生物代謝的(含糖)液體培養基。

根據本發明，至少移除發酵液之揮發性成分。此舉獲得固體，該固體包含非揮發性重要產物以及發酵液之不溶成

分及視情況以溶解形式存在於發酵液中的成分。

對於本發明之目的而言，應瞭解非揮發性微生物代謝物意謂在不經歷分解的情況下藉由蒸餾一般無法自發酵液移除的化合物。

通常，在正常壓力下，該等化合物具有高於水沸點、經常在150℃以上且尤其在200℃以上之沸點。通常，其在標準條件下(298 K，101.3 kPa)採取固態化合物之形式。

然而，使用本發明之方法亦可能製備在大氣壓力下具有低於水沸點之熔點及/或油性稠度的非揮發性微生物代謝物。在該狀況中，通常必須控制在處理期間尤其在乾燥期間的最高溫度。該等化合物亦可有利地藉由將其調配為吸附劑上之偽固態而製備。

適於此目的之吸附劑為(例如)活性炭；氧化鋁；矽膠；矽石；黏土；煙灰；沸石；無機鹼金屬及鹼土金屬鹽，諸如鈉、鉀、鎂及鈣之氫氧化物、碳酸鹽、矽酸鹽、硫酸鹽及磷酸鹽，尤其為鎂鹽及鈣鹽，例如$Mg(OH)_2$、$MgCO_3$、$MgSiO_4$、$CaSO_4$、$CaCO_3$；鹼土金屬氧化物，例如MgO及CaO；其他無機磷酸鹽及硫酸鹽，例如$ZnSO_4$；有機酸鹽，尤其其鹼金屬鹽及鹼土金屬鹽且特別為其鈉鹽及鉀鹽，例如鈉及鉀之乙酸鹽、甲酸鹽、甲酸氫鹽及檸檬酸鹽)；及高分子量有機載體，諸如碳水化合物，例如糖、視情況經改質之澱粉、纖維素、木質素及一般下文在產物調配之上下文中所提及之載體。通常，上述載體不包含或包含僅少量、尤其包含僅痕量之諸如氯化物離子之鹵素及

硝酸鹽。

可藉由本發明之方法以此方式有利地製備之化合物的實例為γ-次亞麻油酸、二高-γ-次亞麻油酸、花生油酸、二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸，此外為丙酸、乳酸、丙二醇、丁醇及丙酮。此外，應瞭解假固體調配物中之該等化合物意謂為適合本發明之目的之非揮發性固態微生物代謝物。

在下文中，術語非揮發性微生物代謝物尤其包含較佳具有3至10個碳原子且若適當則具有一或多個(例如1、2、3或4個)附著於其之羥基的有機單羧酸、二羧酸及三羧酸，例如酒石酸、衣康酸、琥珀酸、丙酸、乳酸、3-羥基丙酸、反丁烯二酸、順丁烯二酸、2,5-呋喃二羧酸、戊二酸、乙醯丙酸、葡糖酸、烏頭酸及二胺基庚二酸、檸檬酸；蛋白型及非蛋白型胺基酸，例如離胺酸、麩胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、天冬胺酸、色胺酸及蘇胺酸；嘌呤及嘧啶鹼基；核苷及核苷酸，例如菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)及腺苷-5'-單磷酸(AMP)；脂質；較佳具有10至22個碳原子的飽和及不飽和脂肪酸，例如γ-次亞麻油酸、二高-γ-次亞麻油酸、花生油酸、二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸；較佳具有3至8個碳原子的二醇，例如丙二醇及丁二醇；具有3個或3個以上(例如3、4、5或6個)OH基團的較高官能度醇，例如丙三醇、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇及阿拉伯糖醇；具有至少4個碳原子(例如4至22個碳原子)的較長鏈醇，例如丁醇；碳水化合物，例如玻糖醛酸及海藻

糖；芳族化合物，例如芳族胺、香蘭素及靛藍；維生素及原維生素，例如抗壞血酸、維生素B_6、維生素B_{12}及核黃素、輔因子及已知的營養品；蛋白質，例如酶，諸如澱粉酶、果膠酶、酸性混雜型或中性纖維素酶、諸如脂肪酶之酯酶、胰腺酶、蛋白酶、木糖聚糖酶及氧化還原酶(諸如漆酶、觸酶及過氧物酶)、葡聚糖酶、植酸酶；類胡蘿蔔素，例如番茄紅素、β-胡蘿蔔素、還原蝦紅素、玉米黃質及角黃素；較佳具有3至10個碳原子及(若適當)1或多個羥基的酮，例如丙酮及乙偶姻；內酯，例如γ-丁內酯、環糊精、生物聚合物(例如多羥基乙酸酯)、聚酯(例如聚乳酸交酯)、多醣、聚類異戊二烯、聚醯胺；及上述化合物之前驅物及衍生物。Gutcho在Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973), ISBN: 0818805086中描述適用作非揮發性微生物代謝物的其他化合物。

術語"輔因子"包含為存在正常酶活性所需的非蛋白質化合物。該等化合物可為有機物或無機物；較佳地，本發明之輔因子分子為有機物。該等分子之實例為NAD及菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)；該等輔因子之前驅物為菸鹼。

術語"營養品"包含促進植物及動物、尤其人類健康的食品添加劑。該等分子之實例為維生素、抗氧化劑及某些脂質，例如多不飽和脂肪酸。

所製備之代謝物尤其選自酶、胺基酸、維生素、雙醣、具有3至10個碳原子之脂族單羧酸及二羧酸、具有3至10個

碳原子之脂族羥基羧酸、具有3至10個碳原子之酮、具有4至10個碳原子之烷醇及具有3至10個且尤其3至8個碳原子之烷二醇。

熟習該項技術者應瞭解，在每種狀況中，藉由根據本發明之發酵所產生之化合物藉由所用微生物所產生之對映異構體形式獲得(在該狀況中存在不同對映異構體)。因此，例如，在胺基酸之狀況中，一般獲得各自的L對映異構體。

如下文中所詳述，用於發酵中的微生物以本身已知之方式視所述微生物代謝物而定。該等微生物可為天然來源或經遺傳修飾的。適當微生物及發酵方法之實例列舉於下文表A中。

表A：

物質	微生物	參考文獻
酒石酸	乳桿菌屬(Lactobacilli)，例如德爾乳桿菌(Lactobacillus delbrueckii)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
衣康酸	土麴黴(Aspergillus terreus)、衣康酸麴黴(Aspergillus itaconicus)	Jakubowska, Smith及Pateman (編)，Genetics and Physiology of Aspergillus, London: Academic Press 1977；Miall, Rose (編) Economic Microbiology，第2卷，第47-119頁，London: Academic Press 1978; US 3044941 (1962)。

物質	微生物	參考文獻
琥珀酸	放線桿菌屬(Actinobacillus)130Z、產琥珀酸厭氧螺菌(Anaerobiospirillum succiniproducens)、琥珀酸放線桿菌(Actinobacillus succinogenes)、大腸桿菌(E. coli)	Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 498-504 (1976)；EP 249773 (1987)，發明者：Lemme and Datta; US 5504004 (1996)，發明者：Guettler, Jain and 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年1月；49 Pt 1:207-16; US5723322; US5573931; US5521075; WO99/06532; US5869301; US5770435。
反丁烯二酸	Clostridium formicoaceticum、少根根黴(Rhizopus arrhizus)	Rhodes等人，Production of Fumaric Acid in 20-liter Fermentors, Applied Microbiology, 1962, 10(1), 9-15；Dorn等人，Fermentation of Fumarate and L-Malate by Clostridium formicoaceticum, Journal of Bacteriology, 1978, 133(1), 26-32；NG等人，Production of Tetrahydrofuran/1,4-butanediol by a combined biological and chemical process, Biotechnology and Bioengineering Symp. 第17期(1986)，第355-363頁；WO 90/00199。
二胺基庚二酸	麩胺酸棒桿菌(Corynebacterium glutamicum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
檸檬酸	黑麴黴(Aspergillus niger)、文氏麴黴(Aspergillus wentii)	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331-373 (1986)；Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996)。
烏頭酸	黑麴黴、文氏麴黴	Crit. Rev. Biotechnol. 3, 331-373 (1986)；Food Biotechnol. 7, 221-234 (1993); 10, 13-27 (1996).；Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995。
蘋果酸	麴黴屬，例如黃麴黴(Aspergillus flavus)、黑麴黴、米麴黴(Aspergillus oryzae)；棒狀桿菌屬	US 3063910；Battat等人，Optimization of L-Malic Acid Production by Aspergillus flavus in a Stirred Fermentor, Biotechnology and Bioengineering，第37(1991)期，第1108-1116頁。
葡糖酸	麴黴屬，例如黑麴黴	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。

物質	微生物	參考文獻
丁酸	梭菌屬(例如丙酮丁醇梭桿菌(Clostridium acetobutlicum)、丁酸梭菌(C. butyricum))	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995。
離胺酸	麩胺酸棒桿菌	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35。
麩胺酸	麩胺酸棒桿菌	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35。
甲硫胺酸	麩胺酸棒桿菌	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35。
苯丙胺酸	麩胺酸棒桿菌、大腸桿菌	Trends Biotechnol. 3, 64-68 (1985)；J. Ferment. Bioeng. 70, 253-260 (1990)。
蘇胺酸	大腸桿菌	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35。
天冬胺酸	大腸桿菌	Ikeda, M.: Amino Acid Production Process (2003), Adv. Biochem. Engin/Biotechnol 79, 1-35及其中所引用之參考文獻；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
嘌呤及嘧啶鹼基	枯草芽孢桿菌(Bacillus subtilis)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)	枯草芽孢桿菌	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
腺苷-5'-單磷酸鹽(AMP)	枯草芽孢桿菌	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。

物質	微生物	參考文獻
γ-次亞麻油酸	毛黴屬(Mucor)、白被孢黴屬(Mortiella)、麴黴屬(Aspergillus)	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids，第1部分：occurence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409；Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)。
二高-γ-次亞麻油酸	白被孢黴屬、耳黴屬(Conidiobolus)、水黴屬(Saprolegnia spp.)	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids,第1部分: occurence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409；Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)。
花生油酸	白被孢黴屬、腐黴菌屬(Phytium spp.)	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids，第1部分：occurence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409；Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)。
二十碳五烯酸	白被孢黴屬、腐黴菌屬、紅假單胞菌屬(Rhodopseudomonas)、施萬氏菌屬(Shewanella spp)	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids,第1部分: occurence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409；Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)。
二十二碳六烯酸	破囊壺菌(thraustochytrium)、蟲黴屬(Entomophthora spp.)、紅假單胞菌屬、施萬氏菌屬	Gill, I., Rao, V.: Polyunsaturated fatty acids，第1部分：occurence, biological activities and applications (1997). Trends in Biotechnology 15 (10), 401-409；Zhu, H.: Utilization of Rice Brain by Pythium irregulare for Lipid Production. Master Thesis Lousiana State University, 31.10.2002 (URN etd-1111102-205855)。

物質	微生物	參考文獻
丁二醇	產氣腸桿菌(Enterobacter aerogenes)、枯草芽孢桿菌、產酸克雷伯氏菌(Klebsiella oxytoca)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)；H.G. Schlegel, H.W. Sannasch, 1981；Afschar等人：Mikrobielle Produktion von 2,3-Butandiol, CIT 64 (6), 2004, 570-571。
甘油	酵母、魯氏酵母(Saccharomyces rouxii)	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
甘露醇	Aspergillus candidu、Torulopsis mannitofaciens	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
阿糖醇	魯氏酵母、蜂蜜酵母(S. mellis)、菌核菌多糖(Sclerotium glucanicum)	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
木糖醇	釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)	Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
玻璃糖醛酸	鏈球菌屬(Streptococcus spp.)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995。
海藻糖	短桿菌屬(Brevibacterium)、棒狀桿菌屬(Corynebacterium)、微桿菌屬(Microbacterium)、節桿菌屬(Arthrobacter spp.)、側耳屬(Pleurotus genus)、Filobasidium floriforme	JP 05099974；JP 06311891；FR 2671099；EP 0555540；JP 3053791；Miyazaki, J.-I., Miyagawa, K.-I., Sugiyama, Y.: Trehalose Accumulation by Basidiomycotinous Yeast, Filobasidium floriforme. Journal of Fermentation and Bioengineering 81, (1996) 4, 315-319。
抗壞血酸	黑素原葡糖桿菌(Gluconobacter melanogenes)	RÖMPP Online，2.6版，Georg Thieme Verlag KG。
維生素B_{12}	丙酸桿菌屬(Propionibacterium spp.)、脫氮假單胞菌(Pseudomonas denitrificans)	Chem. Ber. 1994, 923-927；RÖMPP Online，2.6版，Georg Thieme Verlag KG。
核黃素	枯草芽孢桿菌、棉阿舒囊黴(Ashbya Gossypii)	WO 01/011052；DE 19840709；WO 98/29539；EP 1186664；Fujioka, K.: New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48。

物質	微生物	參考文獻
維生素B_6	熱帶根瘤菌(Rhizobium tropici)、苜蓿根瘤菌(R. meliloti)	EP0765939
酶	麴黴屬(例如黑麴黴、米麴黴)、木黴屬(Trichoderma)、大腸桿菌Hanseluna或畢赤氏酵母屬(Pichia)(例如甲醇酵母(Pichia pastorius))、桿菌屬(例如地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)、枯草芽孢桿菌(B. subtilis))及許多其他菌	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
玉米黃質	杜氏鹽藻(Dunaliella salina)	Jin等人(2003) Biotech.Bioeng. 81:115-124。
角黃素	短桿菌屬	Nelis等人(1991) J Appl Bacteriol 70:181-191。
番茄紅素	三孢布拉氏黴菌(Blakeslea trispora)、產朊假絲酵母(Candida utilis)	WO 03/056028；EP 01/201762；WO 01/12832；WO 00/77234；Miura等人(1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229。
β-胡蘿蔔素	三孢布拉氏黴菌、產朊假絲酵母	Kim S., Seo W., Park Y., Enhanced production of beta-carotene from Blakeslea trispora with Span 20, Biotechnology Letters，第19卷，第6期，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等人(1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229。
還原蝦紅素	法夫紅酵母(Phaffia Rhodozyma)、產朊假絲酵母	US 00/5599711；US 90/00558；WO 91/02060；Miura等人(1998) Appl Environ Microbiol 64:1226-1229。

物質	微生物	參考文獻
聚酯	大腸桿菌、側產鹼桿菌(Alcaligenes latus)及許多其他菌	S. Y. Lee, Plastic Bacteria? Progress and Prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Tibtech，第14卷，(1996), 第431-438頁，Steinbüchel, 2003；Steinbüchel (編)，Biopolymers，第1版，2003, Wiley-VCH, Weinheim及其中所引用之參考文獻。
多醣	腸膜明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides)、葡聚糖明串珠菌(L. dextranicum)、黃單胞菌(Xanthomonas campestris)及許多其他菌	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
聚類異戊二烯	乳菇屬(Lactarius sp.)、蠟傘屬(Hygrophorus sp.)、紅菇屬(Russula sp.)	Steinbüchel (編)，Biopolymers，第1版，2003, Wiley-VCH, Weinheim及其中所引用之參考文獻。
聚醯胺	放線桿菌屬(Actinobacillus sp.)130Z、產琥珀酸厭氧螺菌、琥珀酸放線桿菌、大腸桿菌	Steinbüchel (編)，Biopolymers，第1版，2003, Wiley-VCH, Weinheim及其中所引用之文獻。
香蘭素	惡臭極毛桿菌(Pseudomonas putida)、土壤絲菌屬(Amycolatopsis sp.)	Priefert, H., Rabenhorst, J., Seinbüchel, A. Biotechnological production of vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 296-314 (2001)。
靛藍	大腸桿菌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. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28 (2002), 127-133。
羥基丙酸	德氏乳酸桿菌(Lactobacillus delbrückii)、萊希曼氏乳桿菌(Lactobacillus leichmannii)或Sporolactobacillus inulinus	RÖMPP Online, 2.6版, Georg Thieme Verlag KG。

物質	微生物	參考文獻
丙酸	丙酸桿菌屬，例如阿拉伯糖丙酸桿菌(P. arabinosum)、P. schermanii、費氏丙酸桿菌(P. freudenreichii)，丙酸梭桿菌(Clostridium propionicum)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
乳酸	乳桿菌屬，例如德氏乳桿菌、萊希曼氏乳桿菌(L. leichmannii)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995。
丁醇	梭菌屬(例如丙酮丁醇梭桿菌、丙酸梭桿菌)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
丙二醇	大腸桿菌	DE 3924423；US 440379；WO 9635799；US 5164309
丙酮	梭菌屬(例如丙酮丁醇梭桿菌、丙酸梭桿菌)	Rehm, H.-J.: Biotechnology, Weinheim, VCH, 1980及1993-1995；Gutcho, Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation (1973)。
乙偶姻	產氣腸桿菌、丙酮丁醇棱桿菌、乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)	Lengeler, J.W., Drews, G., Schlegel, H.G. 編，Biology of the Procaryotes, Thieme, Stuttgart (1999)，第307頁；RÖMPP Online，2.6版，Georg Thieme Verlag KG。

本發明之方法之較佳實施例係關於以下各物之生產：酶，諸如植酸酶、木糖聚糖酶、葡聚糖酶；胺基酸，諸如離胺酸、甲硫胺酸、蘇胺酸；維生素，諸如泛酸及核黃素，其前驅物及衍生物及以下各物之生產：上述單羧酸、二羧酸及三羧酸，尤其具有3至10個碳原子之脂族單羧酸及二羧酸(諸如丙酸、反丁烯二酸及琥珀酸)、具有3至10個碳原子之脂族羥基羧酸(諸如乳酸)；上述較長鏈烷醇，尤其具有4至10個碳原子的烷醇，諸如丁醇；上述二醇，尤其具有3至10個且尤其3至8個碳原子的烷二醇，諸如丙二

醇；上述酮，尤其具有3至10個碳原子的酮，諸如丙酮；上述碳水化合物及尤其雙醣類，諸如海藻糖。

在一較佳實施例中，因此用於發酵之微生物係選自產生至少一種以下代謝物的天然或重組微生物：酶，諸如植酸酶、木糖聚糖酶、葡聚糖酶；胺基酸，諸如離胺酸、蘇胺酸及甲硫胺酸；維生素，諸如泛酸及核黃素；其前驅物及/或衍生物；雙醣類，諸如海藻糖；具有3至10個碳原子之脂族單羧酸及二羧酸，諸如丙酸、反丁烯二酸及琥珀酸；具有3至10個碳原子的脂族羥基羧酸，諸如乳酸；具有3至10個碳原子的酮，諸如丙酮；具有4至10個碳原子的烷醇，諸如丁醇；及具有3至8個碳原子的烷二醇，諸如丙二醇。

詳言之，該等微生物係選自棒狀桿菌屬、桿菌屬(Bacillus)、棉阿舒囊黴屬(Ashbya)、埃希氏菌屬(Escherichia)、麴黴屬、產鹼桿菌屬(Alcaligenes)、放線桿菌屬、厭氧螺菌屬、乳桿菌屬(Lactobacillus)、丙酸桿菌屬、酒麴菌屬(Rhizopus)及梭菌屬(Clostridium)，尤其以下之菌株：麩胺酸棒桿菌、枯草芽孢桿菌、棉阿舒囊黴、大腸桿菌、黑麴黴或側產鹼桿菌、產琥珀酸厭氧螺菌、琥珀酸放線桿菌、德氏乳酸桿菌、萊希曼氏乳桿菌、阿拉伯糖丙酸桿菌、Propionibacterium schermanii、費氏丙酸桿菌、丙酸梭狀芽孢桿菌、Clostridium formicoaceticum、丙酮丁醇梭桿菌、少根根黴及米根黴。

在一特定較佳實施例中，藉由微生物在發酵中所產生之

代謝物為離胺酸。為執行發酵，可使用例如Pfefferle等人在上述引文中及US 3,708,395中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。原則上，連續操作方式與分批操作方式(分批或分批饋入)皆為適宜的，其中分批饋入方式較佳。

在另一特別較佳實施例中，藉由微生物在發酵中所產生之代謝物為甲硫胺酸。為執行發酵，可使用例如在WO 03/087386及WO 03/100072中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。

在另一特別較佳實施例中，藉由微生物在發酵中所產生之代謝物為泛酸。為執行發酵，可使用例如在WO 01/021772中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。

在另一特別較佳實施例中，藉由微生物在發酵中所產生之代謝物為核黃素。為執行發酵，可使用例如在WO 01/011052、DE 19840709、WO 98/29539、EP 1186664及Fujioka, K : New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。

在另一特別較佳實施例中，藉由微生物在發酵中所產生之代謝物為反丁烯二酸。為執行發酵，可使用例如在Rhodes等人，Production of Fumaric Acid in 20-L Fermentors, Applied Microbiology, 1962, 10 (1), 9-15中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。

在另一特別較佳實施例中，藉由微生物在發酵中所產生之代謝物為植酸酶。為執行發酵，可使用例如在WO

98/55599中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。

在使發酵液經受進一步處理之前，較佳執行滅菌步驟。滅菌步驟可根據熱、化學或機械方法或藉由該等方法之組合來執行。可以如上所述之方式進行熱滅菌。對於化學滅菌而言，通常係以酸或鹼性溶液導致微生物毀壞之方式處理發酵液。機械滅菌通常係藉由使用剪切力進行。該等方法係熟習該項技術者已知。

本發明方法有利地包含以下三個連續的處理步驟a)、b)及c)：

a) 如步驟a1)及a2)中所述，製備具有20%重量比以上之單醣含量之含糖液體培養基，其中該含糖液體培養基亦包含澱粉原料之非澱粉固體成分；

b) 在發酵中使用該含糖液體培養基以生產非揮發性代謝物，及

c) 藉由移除發酵液之揮發性成分的至少一部分，自發酵液獲得非揮發性固態代謝物以及澱粉原料之至少部分的非澱粉固體成分。

視萃取率而定，在步驟a)中所獲得之含糖液體培養基(其中將產生所需代謝物之微生物菌株在步驟b)中培養)包含至少部分或全部、但通常至少90%重量比且特定約100%重量比之存在於經研磨之穀仁中之非澱粉固體成分。以研磨基料之澱粉成分計，含糖液體培養基中之非澱粉固體成分之量較佳為至少10%重量比且尤其為至少25%重量比，例如25%重量比至75%重量比且特定30%重量比至60%重量比。

該等非澱粉固體成分與含糖液體培養基一起提供至如步驟b)所述之發酵中且從而存在於所製得之包含代謝物之發酵液中。

若需要，可在根據步驟c)移除揮發性成分之前將非澱粉固體(意即不溶性成分)之一部分(例如5%重量比至80%重量比且尤其30%重量比至70%重量比)自發酵液分離。此分離一般藉由固液分離之習知方法(例如藉助於離心或過濾)來執行。若適當，則執行該初步分離以便移除不包含或包含僅少量非揮發性微生物代謝物的粗固體顆粒。此初步過濾可使用熟習該項技術者已知之習知方法(例如使用粗篩、網、穿孔薄片或類似物)來執行。若適當，則亦可在離心力分離器中將粗固體顆粒分離。此處所用設備(諸如傾析器、離心機、雙錐筒體離心機及分離器)亦為熟習該項技術者所知。然而，在移除揮發性成分之前，較佳分離出不超過30%重量比、尤其不超過5%重量比之發酵液之不溶性成分。

較佳地，在不預先分離出固體成分的情況下，自發酵液大體獲得至少一種非揮發性固態代謝物，從而將所有固體成分集攏為總體。

根據本發明，(若適當)在預先分離出一部分固體非澱粉成分之後，發酵繼大體移除發酵液之揮發性成分之後而進行。大體意謂，揮發性成分移除後，剩留固體或至少半固體殘餘物，若適當，則該等固體或半固體殘餘物可藉由添加固體物質而轉化為固體產物。通常，此意謂揮發性成分

經移除而使殘餘水分含量降低至不超過20%重量比、經常不超過15%重量比且尤其不超過10%重量比。通常，發酵液之揮發性成分自發酵液移除直至殘餘水分含量有利地降低至以乾燥後所測定之固體成分總重量計之0.2%重量比至20%重量比、較佳1%重量比至15%重量比、特別較佳2%重量比至10%重量比且特別更佳5%重量比至10%重量比範圍內。殘餘水分含量可藉由熟習該項技術者已知之習知方法來測定，例如藉助於熱重量測定法(Hemminger等人，Methoden der thermischen Analyse, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989)測定。

根據一第一實施例，發酵液之揮發性成分可藉由僅大體移除發酵液之揮發性成分(例如藉由將其蒸發)而分離出。

根據一第二實施例，將除含有揮發性成分外、一般亦含有經溶解之非揮發性成分之發酵液的液體成分自非溶解成分(意即所需代謝物以及生物質及澱粉原料之固體非澱粉成分)移除。接著藉由用於固液分離之習知方法(諸如過濾、離心等)執行液體成分之移除。

亦可將第一與第二實施例之方法組合。舉例而言，首先可將發酵液之液體成分之一部分或主要部分與非溶解成分分離，且將揮發性成分之剩餘部分藉由蒸發自發酵液之經分離之非溶解成分移除。此外，發酵液之經分離之液體組分中之揮發性組分之主要部分或全部可藉由蒸發加以移除，且經受進一步處理。亦可將自經分離之液體成分蒸發揮發性成分後所得之殘餘物與分離液體成分後所得之固體

組合，自程序觀點而言，此可為尤其有利的。

若適當則在上述初步分離後，可以一、或二或三個步驟、尤其以一步或兩步程序完成步驟c)中自發酵液獲得非揮發性代謝物。通常，用於獲得固態代謝物之至少一個步驟、尤其最後步驟包含一個乾燥步驟。

在一步程序之狀況中，若適當則在上述初步分離後，移除發酵液之揮發性成分，直至達到所需殘餘水分含量。

在兩步或多步程序之狀況中，若適當則在上述初步分離後，首先將發酵液例如藉助於微濾、超濾或以熱方法藉由蒸發一部分揮發性成分加以濃縮。在該步驟中所移除之揮發性成分之量通常為以發酵液之揮發性成分之總重量計之10%重量比至80%重量比且尤其為20%重量比至70%重量比。發酵液之剩餘揮發性成分以一或多個後續步驟移除直至達到所需殘餘水分含量。

根據本發明，在無重要產物之先前損耗或實際分離的情況下，大體移除液體培養基之揮發性成分。因此，當移除發酵液之揮發性成份時，非揮發性代謝物大體上未隨液體培養基之揮發性成分一起移除，但在由此所獲得之殘餘物中剩留至少一部分、通常大部分且尤其全部來自發酵液之剩餘固體成分。然而，根據本發明，在移除發酵液之揮發性成分時，可連同發酵液之揮發性成分一起移除一部分、較佳少量(通常不超過以代謝物之總乾重計之20%重量比，例如0.1%重量比至20%重量比，較佳不超過10%重量比、尤其不超過5%重量比，特別較佳不超過2.5%重量比且特

別更佳不超過1%重量比)之所需非揮發性微生物代謝物。在一特別更佳實施例中，在揮發性成分移除後，在每種狀況中以代謝物之總乾重計之至少90%重量比、尤其至少95%重量比、特定地99%重量比且更特定地約100%重量比之所需非揮發性微生物代謝物仍作為固體與發酵培養基之部分或全部固體成分保持混合。

此得到固體或半固體(例如漿糊狀)殘餘物，該殘餘物包含非揮發性代謝物及澱粉原料之非揮發性(通常為固體非澱粉)成分或其至少大部分、經常至少90%重量比或全部的固體非澱粉成分。

與發酵之固體成分一起存在之乾代謝物的性質可藉由添加諸如載劑及塗料、黏合劑及其他添加劑之調配助劑以本身已知之方式調配，該等性質特定地與諸如下列之各種參數相關：諸如活性物質含量、粒度、顆粒形狀、易起塵、吸濕性、穩定性(尤其儲存穩定性)、顏色、氣味、流動特性、易聚結性、靜電荷、感光性及高溫穩定性、機械穩定性及再分散性。

習用的調配助劑包括，例如黏合劑、載劑、粉化佐劑/助流劑，此外包括有色顏料、殺生物劑、分散劑、消泡劑、黏度調節劑、酸、鹼、抗氧化劑、酶穩定劑、酶抑制劑、吸附劑、脂肪、脂肪酸、油劑或該等物之混合物。該等調配助劑有利地作為無水助劑而使用，尤其當使用諸如噴霧乾燥、流化床乾燥及冷凍乾燥之調配及乾燥方法時。

黏合劑之實例為：碳水化合物，尤其為糖，諸如單醣、

雙醣、寡醣及多醣，例如糊精、海藻糖、葡萄糖、葡萄糖漿、麥芽糖、蔗糖、果糖及乳糖；膠體物質，諸如動物蛋白質，例如明膠、酪蛋白(尤其酪蛋白酸鈉)，植物蛋白質，例如大豆蛋白質、豌豆蛋白質、豆蛋白質、羽扇豆蛋白質、玉蜀黍蛋白、小麥蛋白質、玉米蛋白質及稻蛋白質；合成聚合物，例如聚乙二醇、聚乙烯醇及尤其BASF之Kollidon牌；視情況經改質之生物聚合物，例如木質素、甲殼素、聚葡萄胺糖、聚乳酸交酯及改質澱粉，例如辛烯基琥珀酸酐(OSA)；樹膠，例如阿拉伯樹膠；纖維素衍生物，例如甲基纖維素、乙基纖維素、(羥乙基)甲基纖維素(HEMC)、(羥丙基)甲基纖維素(HPMC)、羧甲基纖維素(CMC)；粗粉，例如經研磨之玉米、小麥、黑麥、大麥及稻。

載劑之實例為：碳水化合物，尤其在上文如黏合劑中所提及之糖，及澱粉，例如來自玉米、稻、馬鈴薯、小麥及木薯之澱粉；改質澱粉，例如辛烯基琥珀酸酐；纖維素及微晶纖維素；無機礦物質或壤土，例如黏土、煤、矽藻土、矽石、動物脂及高嶺土；粗粉，例如粗小麥粉、麥麩(例如小麥麩)，在上文如黏合劑中所提及之粗粉；鹽類，諸如金屬鹽類，尤其有機酸之鹼金屬鹽及鹼土金屬鹽，例如檸檬酸鎂、乙酸鎂、甲酸鎂、甲酸氫鎂、檸檬酸鈣、乙酸鈣、甲酸鈣、甲酸氫鈣、檸檬酸鋅、乙酸鋅、甲酸鋅、甲酸氫鋅、檸檬酸鈉、乙酸鈉、甲酸鈉、甲酸氫鈉、檸檬酸鉀、乙酸鉀、甲酸鉀、甲酸氫鉀；無機鹽，例如硫酸

鎂、碳酸鎂、矽酸鎂或磷酸鎂、硫酸鈣、碳酸鈣、矽酸鈣或磷酸鈣、硫酸鋅、碳酸鋅、矽酸鋅或磷酸鋅、硫酸鈉、碳酸鈉、矽酸鈉或磷酸鈉、硫酸鉀、碳酸鉀、矽酸鉀或磷酸鉀；鹼土金屬氧化物，諸如CaO及MgO；無機緩衝劑，諸如鹼金屬磷酸氫鹽，尤其磷酸氫鈉及磷酸氫鉀，例如K_2HPO_4、KH_2PO_4及Na_2HPO_4；且所提及之與本發明之代謝物之製備相關之吸附劑具有低熔點或油性稠度。

粉化佐劑或助流劑之實例為矽藻土、矽石，例如Degussa之Sipernat牌；黏土、煤、動物脂及高嶺土；以上如載劑中所述之澱粉、改質澱粉、無機鹽、有機酸鹽及緩衝劑；纖維素及微晶纖維素。

關於其他添加劑，可提及如下實例：有色顏料，諸如TiO_2、類胡蘿蔔素及其衍生物、維生素B_2、辣椒紅素、葉黃素、玉米黃質、角黃素、還原蝦紅素、酒石黃、日落黃FCF、靛藍、植物炭、胭脂素、氧化鐵；殺生物劑，諸如苯甲酸鈉、山梨酸、山梨酸鹼金屬鹽及山梨酸鹼土金屬鹽(諸如山梨酸鈉、山梨酸鉀及山梨酸鈣)、4-羥基苯甲酸乙酯、亞硫酸氫鹼金屬鹽(諸如亞硫酸氫鈉及焦亞硫酸鈉)、甲酸、甲酸鹽且尤其甲酸鹼金屬鹽(諸如甲酸鈉)、甲醛、硝酸鈉、乙酸鹽且尤其乙酸鹼/鹼土金屬鹽(諸如乙酸鈉及乙酸鉀)、乙酸、乳酸、丙酸；分散劑及黏度調節劑，諸如海藻酸鹽、卵磷脂、1,2-丙二醇、瓊脂、角叉菜膠、阿拉伯膠、瓜耳豆膠、黃原膠、潔冷膠(gellan gum)、桂樹膠、山梨糖醇、聚乙二醇、丙三醇、果膠、改質澱粉、改

質纖維素(例如甲基纖維素、HPMC、乙基纖維素、羧甲基纖維素)、微晶纖維素、單甘油酯及二甘油酯、蔗糖酯；消泡劑，諸如乙烯基功能性矽油(例如購自Wacker Chemie之SILOFOAM®SC 155)，及脂肪醇烷氧化物(例如購自BASF AG之Plurafac®)；無機酸，諸如磷酸、硝酸、鹽酸、硫酸；有機酸，諸如飽和及不飽和單羧酸及二羧酸，例如甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、棕櫚酸、硬脂酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、順丁烯二酸及反丁烯二酸；鹼，諸如鹼金屬氫氧化物，例如NaOH及KOH；抗氧化劑，諸如維生素C、3-第三丁基-4-羥基大茴香醚(BHA)、3,5-二-第三-4-羥基甲苯(BHT)、6-乙氧基-1,2-二羥基-2,2,4-三薄荷基喹啉(乙氧喹啉)；酶穩定劑，諸如鈣鹽、鋅鹽(諸如硫酸鋅)、鎂鹽(硫酸鎂)、胺基酸；酶抑制劑，諸如抑胃肽A或胍*HCl；被吸附物，諸如矽石、二氧化矽、糖或鹽類；脂肪，諸如甘油酯，例如單甘油酯、二甘油酯及三甘油酯；脂肪酸，諸如硬脂酸；油劑，諸如向日葵油、玉米油、大豆油及棕櫚油。

上述添加劑及(若適當)其他添加劑(諸如塗料)之量視所述代謝物之特別需要及所用添加劑之性質可大幅度改變，且在每種狀況中以最終調配形式之產物或物質混合物之總重量計，其例如可在0.1%重量比至80%重量比範圍內且尤其在1%重量比至30%重量比範圍內。

調配助劑之添加可在處理發酵液之前、期間或之後(亦稱為產物調配或固體設計)、尤其在乾燥期間進行。調配

助劑在處理發酵液或代謝物之前添加可為有利的，尤其有利於改良待處理之物質或產物之可處理性。調配助劑可添加至所獲得之固態代謝物中或添加至包含代謝物之溶液或懸浮液中，例如在發酵完成後直接添加至發酵液中，或添加至在處理期間及在最後乾燥步驟之前所獲得之溶液或懸浮液中。

因此，例如，可使該等助劑與微生物代謝物之懸浮液混合；該懸浮液亦可例如藉由噴霧或混合塗佈至載體物質。例如在噴霧包含代謝物之溶液或懸浮液時，將調配助劑在乾燥期間添加可為重要的。調配助劑之添加尤其在乾燥後進行，例如當將塗佈劑/塗層塗佈至乾顆粒時。其他佐劑可在乾燥後與任選塗佈步驟後添加至產物中。

自發酵液移除揮發性成分可藉由用於自液相分離固相之習知方法(包括過濾方法及蒸發液相之揮發性成分的方法)以本身已之方式進行。該等方法(亦可包括大致淨化重要產物之步驟及調配步驟)描述於例如Belter, P. A, Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology, John Wiley & Sons (1988)及Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry，第5版之CD-ROM, Wiley-VCH中。發酵完成後可在產品調配或處理之範疇內使用之熟習該項技術者已知之方法、設備、助劑及通用或特定實施例另外描述於EP 1038 527、EP 0648 076、EP 835 613、EP 0219 276、EP 0394 022、EP 0547 422、EP 1088 486、WO 98/55599、EP 0758 018及WO 92/12645。

在將揮發性成分自重要產物及發酵液之非澱粉固體成分分離之一第一較佳實施例中，將非揮發性微生物代謝物(若以溶解形式存在於液相中)例如藉由結晶或沉澱自液相轉變成固相。之後，將包括代謝物之非揮發性固體成分藉由固液分離之習知方法，例如藉助於離心、傾析或過濾而自液體成分分離。油性代謝物亦可以類似方式而分離出，所述油性發酵產物藉由添加吸附劑(例如矽石、矽膠、壤土、黏土及活性炭)轉變為固態。

微生物代謝物之沉澱可以習知方式(J.W. Mullin: Crystallization，第3版，Butterworth-Hinemann, Oxford 1993)進行。沉澱可例如藉由添加另一種溶劑、添加鹽類及改變溫度而開始。所得沉澱物可連同其他固體成分藉由本文中所述之用於分離固體之習知方法自液體分離。

微生物代謝物之結晶同樣可以習知方式完成。習知結晶方法描述於例如以下文獻中：Janeic, S.J., Grootscholten, P.A., Industrial Crystallization, New York, Academic, 1984；A. W. Bamforth: Industrial Crystallization, Leonard Hill, London 1965；G. Matz: Kristallisation，第2版，Springer Verlag, Berlin 1969；J. Nývlt: Industrial Crystallization-State of the Art. VCH Verlagsges., Weinheim 1982; S. J. Jancic', P. A. M. Grootscholten: Industrial Crystallization, Reidel, Dordecht 1984；O. Söhnel, J. Garside: Precipitation, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1992；A. S. Myerson (編)：Handbook of Industrial

Crystallization, Butterworth-Heineman, Boston 1993；J. W. Mullin: Crystallization，第3版，Butterworth-Heinemann, Oxford 1993; A. Mersmann (編)：Crystallization Technology Handbook, Marcel Dekker, New York 1995。結晶可例如藉由真空中之冷卻、蒸發、結晶(絕熱冷卻)、反應結晶或鹽析而開始。結晶可例如在攪拌式及非攪拌式容器中藉由直接接觸方法進行，在蒸發結晶器中進行(R. K. Multer, Chem Eng.(N.Y.) 89 (1982) March, 87-89)，在真空結晶器中分批或連續進行，例如在強制循環結晶器(Swenson強制循環結晶器)或流化床結晶器(Oslo型)中進行(A. D. Randolph, M. A. Larson: Theory of Particulate Processes，第2版，Academic Press, New York 1988；J. Robinson, J. E. Roberts, Can. J. Chem. Eng. 35 (1957) 105-112；J. Nývlt: Design of Crystallizers, CRC Press, Boca Raton, 1992)。分步結晶亦為可行的(L. Gordon, M. L. Salutsky, H. H. Willard: Precipitation from Homogeneous Solution, Wiley-Interscience, New York 1959)。同樣地，可將對映異構體及外消旋體進行分離(J. Jacques, A. Collet, S. H. Willen: Enantiomers, Racemates and Resolutions, Wiley, New York 1981；R. A. Sheldon: Chirotechnology, Marcel Dekker, New York 1993；A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby (編)：Chirality in Industry, Wiley, New York 1985)。

習知過濾方法例如為濾餅過濾及深度過濾(例如描述於A. Rushton, A. S. Ward, R. G. Holdich: Solid-Liquid Filtration

and Separation Technology, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1996，第177ff頁，K. J. Ives，於A. Rushton (編)：Mathematical Models and Design Methods in Solid-Liquid Separation, NATO ASI系列E Nr. 88, Martinus Nijhoff, Dordrecht 1985，第90ff頁中)及錯流過濾，尤其用於移除大於0.1 μm固體之微過濾(例如描述於J. Altmann, S. Ripperger, J. Membrane Sci. 124 (1997) 119-128中)。

在微濾及超濾之狀況中，可能使用例如藉由各種方法(R. Zsigmondy, US 1 421 341, 1922；D. B. Pall, US 4 340 479, 1982；S. Loeb, S. Sourirajan, US 3 133 132, 1964)所製備之微孔隙膜(A. S. Michaels: "Ultrafiltration", in E. S. Perry (編輯)：Progress in Separation and Purification，第1卷，Interscience Publ., New York 1968)、均質膜(J. Crank, G. S. Park (編)：Diffusion in Polymers, Academic Press, New York 1968；S. A. Stern: "The Separation of Gases by Selective Permeation," 於P. Meares (編)：Membrane Separation Processes, Elsevier, Amsterdam 1976)、不對稱膜(R. E. Kesting: Synthetic Polymeric Membranes, A Structural Perspective, Wiley-Interscience, New York 1985)及帶電膜(F. Helfferich: Ion-Exchange, McGraw-Hill, London 1962)。一般材料為纖維素酯、耐綸、聚氯乙烯、丙烯腈、聚丙烯、聚碳酸酯及陶瓷。該等膜之使用以板式模組(R. F. Madsen, Hyperfiltration and Ultrafiltration in Plate-and-Frame Systems, Elsevier, Amsterdam 1977)、螺

旋模組(US 3 417 870, 1968 (D. T. Bray))、管束或空心纖維模組(H. Strathmann: "Synthetic Membranes and their Preparation"，於M. C. Porter (編)：Handbook of Industrial Membrane Technology, Noyes Publication, Park Ridge, NJ 1990，第1-60頁)之形式進行。此外，可使用液膜(N. N. Li: "Permeation Through Liquid Surfactant Membranes", AIChE J. 17 (1971) 459；S. G. Kimura, S. L. Matson, W. J. Ward III: "Industrial Applications of Facilitated Transport", in N. N. Li (編)：Recent Developments in Separation Science，第V卷，CRC Press, Boca Raton, Florida, 1979，第11-25頁)。所需物質可在饋料側濃縮且經由滯留液流排出，或在饋料側消耗且經由濾液/滲透液流排出。

習知離心方法描述於例如G. Hultsch, H. Wilkesmann, "Filtering Centrifuges"，於D.B. Purchas, Solid-Liquid Separation, Upland Press, Croydon 1977，第493-559頁；及H. Trawinski, Die äquivalente Klärfläche von Zentrifugen [the equivalent clarifying area of centrifuges], Chem. Ztg. 83 (1959) 606-612中。可使用諸如管式離心機、籃式離心機及特定而言推進式離心機、滑動過濾式離心機及盤式分離器之各種設計。

在根據該第一實施例之方法中，若適當，則繼固相自液相分離後，以習知方式執行乾燥步驟。習知乾燥方法描述於例如O. Krischer, W. Kast: Die wissenschaftlichen Grundlagen der Trocknungstechnik [The scientific basis of

drying technology]，第3版，Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1978；R. B. Keey: Drying: Principles and Practice, Pergamon Press, Oxford 1972; K. Kröll: Trockner und Trocknungsverfahren [Dryers and drying methods]，第2版，Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1978；Williams-Gardener, A.: Industrial Drying, Houston, Gulf, 1977；K. Kröll, W. Kast: Trocknen und Trockner in der Produktion [Drying and dryers in production], Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1989中。乾燥方法之實例包括例如在以下各乾燥器中之對流乾燥方法：乾燥箱、隧道式乾燥器、帶式乾燥器、圓盤式乾燥器、噴射乾燥器、流化床乾燥器、充氣及轉筒乾燥器、噴霧乾燥器、氣動對流乾燥器、旋渦乾燥器、混合乾燥器、漿料研磨乾燥器、研磨乾燥器、環式乾燥器、乾燥塔、旋轉乾燥器、轉盤乾燥器。其他方法利用接觸進行乾燥，例如槳葉乾燥、真空或冷凍乾燥、錐體乾燥器、抽吸乾燥器、圓盤式乾燥器、薄膜接觸乾燥器、滾筒乾燥器、黏性相乾燥器、板式乾燥器、回轉盤管乾燥器、雙錐體乾燥器；或用於乾燥目的之熱輻射(紅外線)或例如紅外線旋轉乾燥器)或介電能量(微波)。用於熱乾燥方法之乾燥裝置在大多數狀況中藉由蒸汽、油、氣體或電加熱，且可視其設計而定部分地在真空中操作。

已分離出之液相可作為處理用水再循環。未再循環入製程中之液相的部分可以多步驟蒸發方法濃縮以形成糖漿。

若在傾析步驟之前所需代謝物未由液相轉變成固相，則所得糖漿亦包含代謝物。通常，該糖漿具有10%重量比至90%重量比、較佳20%重量比至80%重量比且特別較佳25%重量比至65%重量比範圍內之乾物質含量。該糖漿與已經傾析及隨後乾燥所分離之固體混合。乾燥例如可藉助於滾筒乾燥器、噴霧乾燥器或槳葉乾燥器進行，較佳使用滾筒乾燥器。乾燥較佳以使所得固體具有以所得固體之總乾重計不超過30%重量比、較佳不超過20%重量比、特別較佳不超過10%重量比且特別更佳不超過5%重量比之殘餘水分含量之方式進行。

在自重要產物分離揮發性成分及自發酵液分離非澱粉固體成分之第二較佳實施例中，若適當則在先前所述固體成分之預分離步驟之後藉由蒸發移除揮發性成分。蒸發可以本身已知之方式完成。蒸發揮發性成分之適當方法的實例為噴霧乾燥、流化床乾燥或流化床凝聚、冷凍乾燥、氣動對流乾燥器及接觸乾燥器及擠出乾燥。亦可執行上述方法與諸如擠出、粒化或製粒之賦形方法之組合。在該等最後所述方法之狀況中，較佳使用經部分或大量預乾燥之含代謝物之物質混合物。

在一尤其較佳實施例中，移除發酵液之揮發性成分包含噴霧乾燥方法或流化床乾燥方法(包括流化床製粒)。為此，若適當則在用於移除粗固體顆粒之初步分離後，將包含僅少量非揮發性微生物代謝物(若有)之發酵液饋至一或多個噴霧乾燥或流化床乾燥裝置中。載有固體之發酵液之

傳輸或饋料可便利地藉助於用於包含固體之液體之習知傳輸設備(例如泵，諸如偏心單轉子螺桿泵(例如購自Delasco PCM)或高壓泵(例如購自LEWA Herbert Ott GmbH))執行。

可使用之噴霧乾燥裝置為該項技術中已知的所有習知噴霧乾燥裝置，例如，該等以上文獻中所述之彼等裝置尤其為噴嘴塔，特定而言為裝有增壓噴嘴之彼等噴嘴塔，及盤式塔；與流化床及流化床噴霧製粒機整合之噴霧乾燥器較佳用於使用流化床乾燥之下述實施例中。

適於藉助噴霧乾燥進行乾燥之系統尤其為其中載有固體之發酵液以並流或逆流方式乾燥之彼等系統。此處，發酵液有利地在垂直佈置之噴霧塔之頂部經由噴嘴或經由轉盤通入該噴霧塔中且同時霧化，而用於乾燥之氣流(例如空氣或氮)在上部或下部區通入噴霧塔中。發酵液之揮發性成分經由噴霧塔之下部出口或經由噴霧塔之頂部排出，而包括所需微生物代謝物之非揮發性或固體成分可作為大體乾燥粉末在底部自噴霧塔排出或移除，且由該步驟進一步處理。

然而，產物之所需殘留水分無需在該一乾燥步驟中儘早獲得，而可在隨後之其他乾燥步驟中進行調節。為此，例如，可在噴霧乾燥步驟後進行流化床乾燥步驟。將噴霧塔及/或流化床之廢氣有利地藉助於漩渦分離器及/或過濾器自夾帶顆粒中釋放出且將其收集以便進一步處理；接著可將揮發性成分收集於例如冷凝單元中(若適當)，且例如作為再循環處理用水再加以使用。

當設計及操作該所用裝置時，熟習該項技術者應考慮到發酵液中可相當多的固體量。因此，尤其所用噴嘴之內徑及/或排出孔必須以盡可能低地消除或保持堵塞或阻塞趨勢之方式進行選擇。排出孔或內徑之適當尺寸通常為約至少0.4 mm，較佳至少1 mm，且視發酵液及其中所存在之物質、壓力及所需產量之特性而定，通常在0.6 mm至5 mm範圍內。

用於乾燥步驟之氣流的溫度在所需壓力下通常高於水性發酵液之沸點，例如為在110℃至300℃、尤其120℃至250℃及特定地在130℃至220℃範圍內之溫度。亦可能將水性發酵培養基溫熱至低於其沸點之溫度，例如在25℃至85℃及尤其30℃至70℃範圍內之溫度以便支持乾燥過程。同樣，可能將水性發酵培養基過熱至較佳100℃以上，使該液體培養基加熱至其在所需壓力下到達噴嘴才沸騰且噴嘴釋放壓力後發生自發性蒸發之溫度點。

此外可將發酵液與例如在30℃至90℃範圍內之溫度下已經預熱之例如空氣或氮氣之氣流混合。若使用雙物質噴嘴而非單物質噴嘴，則此混合步驟可在進入噴霧塔之實際乾燥空間之前直接完成。

在任何狀況中，當選擇溫度時，應顧及所需微生物代謝物之熱穩定性或沸點。通常，將用於乾燥之氣流之溫度調節至至少20℃、較佳至少50℃、低於所述非揮發性微生物代謝物之沸點或分解點之溫度為有利的。此處，必須顧及在有些狀況中乾燥物質之溫度可顯著地低於所添加之氣流

之溫度，只要並非所有的揮發性成分已經蒸發。在此方面，亦經設定滯留時間影響待乾燥之物質的溫度。因此，乾燥程序可在待乾燥之代謝物之沸點或沸點以上範圍內之進風溫度下執行至少一段時間。適當的溫度條件可藉由熟習該項技術者藉由常規實驗來測定。

在一尤其較佳實施例中，乾燥過程在經垂直設計、可並流或逆流(較佳逆流)操作之噴霧塔中進行。在噴霧塔之頂部經由一或多個(例如1、2、3或4，尤其1或2個)噴嘴完成載有固體之發酵液(其已經冷卻至室溫或其仍處於發酵溫度或低於發酵溫度之溫度，例如18℃至37℃)的饋料。將為乾燥過程所提供之熱氣流(較佳空氣)通入噴霧塔之頂區或底區。所得粉末在噴霧塔之底端或頂部移除。若需要，則可接著進行流化床乾燥。

所得粉末之平均粒度主要藉由霧化度(將載有固體之發酵液通入噴霧塔時所獲得)確定。霧化度就其而言視噴嘴處所用壓力或圓盤之旋轉速度而定。噴嘴處所應用之壓力通常在標準壓力以上之5巴至200巴、例如約10巴至100巴及尤其約20巴至60巴範圍內。圓盤旋轉速度通常在5000 rpm至30000 rpm範圍內。為乾燥目的所通入之氣流之通過速率主要視液體培養基之流速而定。若液體培養基之流速低(例如在10 l/h至1000 l/h範圍內)，則其通常在100 m^3/h至10000 m^3/h範圍內；若流速較高(例如在1000 l/h至50000 l/h範圍內)，則其通常在10000 m^3/h至10000000 m^3/h範圍內。

若適當，則可在噴霧乾燥過程中同時使用該項技術中已知的習知佐劑。該等佐劑減少或防止噴霧塔中所形成之初級粉粒之凝聚，以便在經改良之乾燥度、經改良之流動性及/或在諸如水之溶劑中之較佳再分散性之意義上，可以靶向方式影響自噴霧塔所排出之粉末之特性，例如有關顆粒尺寸之特性。習知噴霧佐劑之實例為上述調配佐劑。該等噴霧佐劑以例如以發酵液之非揮發性固體成分之乾重計之0.1%重量比至50%重量比、尤其0.1%重量比至30%重量比及特定0.1%重量比至10%重量比範圍內的習知量而使用。

可供所述裝置在每種狀況中方便選擇的設計(詳言之，所用噴嘴之尺度及適當的操作參數)可由熟習該項技術者簡單地藉由常規實驗確定。

在第二較佳實施例之另一態樣中，使用流化床乾燥方法移除發酵液之揮發性成分。以上對於使用噴霧乾燥方法所述之內容亦類似地適用於此，例如有關含固體發酵液之輸送，有關裝置之設計及有關操作參數之選擇，尤其操作溫度之選擇。可使用之適當流化床乾燥設備為該項技術中已知的所有習知流化床乾燥器，尤其與流化床及流化床噴霧製粒機整合的噴霧乾燥器，例如購自Allgaier、DMR、Glatt、Heinen、Hüttlin、Niro及Waldner的噴霧乾燥器。

流化床乾燥器可連續或分批操作。在連續操作之狀況中，在乾燥器中之滯留時間為幾分鐘高至幾小時。因此，該裝置適用於長滯留時間乾燥，例如經約1 h至15 h之時

間。若需要窄的滯留時間分佈，則可使用分隔薄片將流化床分成級聯，或可藉由具有曲流設計之擋板使產物流動近似於理想的活塞流。詳言之，可將較大的乾燥器分成可在不同氣體速度及溫度下操作的複數個乾燥區，例如2至10及尤其2至5個乾燥區。接著使用最後的區作為冷卻區；在該狀況中，通常將進風溫度設定在10℃至40℃範圍內。

在濕料之饋入區域中，通常應注意避免凝聚。此可以不同方式例如藉由局部較高之氣體速度或使用攪拌機構完成。在較小系統之狀況中，或為了改良淨化系統之方便性，可將淨化廢氣之過濾器整合至流化床乾燥器中。

在分批操作式流化床乾燥器中，滯留時間同樣在幾分鐘與幾小時之間。此外，該等裝置適於長滯留時間乾燥。

流化床乾燥器可以振動方式操作，振動支持產物以低氣體速度(意即低於最小流態化速度)及低的床高度下輸送且能防止凝聚。除振動之外，亦可使用脈衝氣體供應來減少乾燥氣體消耗量。將濕料以攝流方式混合於上引熱氣流中，且從而以高熱量及傳質係數乾燥。所需氣體速度大體視粒度及密度而定。舉例而言，對於具有幾百微米直徑之顆粒需要1 m/s至10 m/s範圍內之表觀速度。穿孔底板(穿孔板、conidur板、織造或燒結金屬所製成之底板)防止固體落入熱氣體空間。熱量可僅經由乾燥氣體供應，或在流化床內另外引入(管束或板式)換熱器(K. Masters: Spray Drying Handbook, Longman Scientific & Technical 1991；Arun S. Mujumdar, Handbook of Industrial Drying, Marcel

Dekker, Inc. 1995)。

就其餘而言，對於噴霧乾燥所述之內容類似地適用於流化床乾燥，例如有關乾燥佐劑之添加及以此方式影響產物特性之可能性。

在油性代謝物之狀況中，使用流化床裝置或混合器進行乾燥可例如以將吸附劑引入流化床裝置或混合器且徹底混合或流化之方式實現。實行此舉的同時，可將具有油性代謝物之發酵液噴霧至吸附劑上。接著可將發酵液之揮發性成分藉由向混合器提供能量加以蒸發，或藉由流化床內之熱空氣流加以蒸發。

在另一較佳實施例中，使用冰凍乾燥法將發酵液之揮發性成分移除。此處，含固體發酵液完全冷凍，且經冷凍之揮發性成分自固態蒸發，意即昇華(Georg-Wilhelm Oetjen, Gefriertrocknen [freeze-drying], VCH 1997)。可使用之冷凍乾燥設備為該項技術中已知的所有習知冷凍乾燥器，例如購自Klein Vakuumtechnik及Christ的冷凍乾燥器。

在另一較佳實施例中，使用氣動對流乾燥器將發酵液之揮發性成分移除。此處，將含固體之發酵液施加於直立乾燥管之下部。乾燥氣體驅動所得顆粒以10 m/s至20 m/s之表觀速度上行。使用螺桿、轉盤或以氣動方式饋入含固體發酵液。顆粒藉助於旋渦分離器沈積於乾燥管之頂部，且若仍未達成所需乾燥度，則可將其再循環入乾燥管或通入下游配置的流化床中(K. Masters : Spray Drying Handbook, Longman Scientific & Technical 1991 ; Arun S. Mujumdar,

Handbook of Industrial Drying, Marcel Dekker, Inc. 1995)。可使用之裝置為該項技術中已知的全部習知氣動對流乾燥器，例如購自Nara及Orth的彼等乾燥器。

在另一較佳實施例中，使用接觸乾燥器將發酵液之揮發性成分移除。此類乾燥器尤其適用於乾燥漿糊狀培養基。然而，對其中固體仍以微粒形式存在之培養基使用接觸乾燥器亦為有利的。經由提供能量，將含固體發酵液施加至乾燥器之沸騰器。發酵液之揮發性成分蒸發(K. Masters: Spray Drying Handbook, Longman Scientific & Technical 1991；Arun S. Mujumdar, Handbook of Industrial Drying, Marcel Dekker, Inc. 1995)。存在且可使用多種不同設計的接觸乾燥器，在本上下文中參見上述實例。熟習該項技術者已知的該等乾燥器尤其為：薄膜接觸乾燥器，例如購自BUSS-SMS；滾筒乾燥器，例如購自Gouda；槳葉乾燥器，例如購自BTC-Technology及Drais；接觸帶式乾燥器，例如購自Kunz及Merk；及旋轉管束式乾燥器，例如購自Vetter。

在本發明方法之另一實施例中，其中調配佐劑在乾燥步驟之前使用，可能例如在攪拌容器內或在靜止混合之前將例如穩定劑或黏合劑(諸如聚乙烯醇及明膠)混入微生物代謝物之懸浮液。該懸浮液亦可藉由噴霧或混入混合器或流化床內而施加至載體物質。

另一特定實施例(其中調配佐劑在乾燥步驟期間添加)係關於包含代謝物之濕滴之粉化(在本上下文中，參見EP

0648 076及EP 835613)，其中將含代謝物之懸浮液噴霧，且以打粉劑(例如矽石、澱粉或上述打粉劑之一者)或助流劑將濕滴粉化，以使其穩定，且接著例如在流化床中同樣乾燥。

另一特定實施例(其中調配佐劑在乾燥步驟之後添加)係關於例如將塗料/塗層塗佈至乾顆粒。在乾燥步驟之後與塗佈步驟之後，可將例如矽石、澱粉之尤其用於改良流動特性之助流劑或其他上述助流劑添加至產物中。

為獲得油性代謝物或具有低於水沸點之熔點之彼等物，將所述產物有利地吸附在吸附劑上(參見上文實例)。一般而言，此過程以將相關吸附劑在發酵液發酵時或發酵結束後添加之方式進行。若適當，則吸附劑可在將發酵液預先濃縮之後添加。疏水性吸附劑與親水性吸附劑皆可使用。在第一狀況中，將吸附劑以與固體成分連同經吸附之代謝物之相同分離方式自發酵液之揮發性成分中連同經吸附之代謝物一起分離。在親水性吸附劑之狀況中，應注意呈溶解或懸浮形式之吸附劑不與吸附產物一起藉由處理程序而排出。當使用過濾時，此可例如藉由選擇過濾器之適當小孔徑尺寸來達成。較佳疏水性或親水性吸附劑為上文中關於製備非揮發性偽固態微生物代謝物所提及之吸附劑，尤其為矽藻土、矽石、糖及上述無機及有機鹼及鹼土金屬鹽。

另一可能之產物調配物藉由機械方式、例如藉助於擠出、粒化或所謂的製粒而成形。此處，較佳經乾燥、預乾

燥及/或經調配佐劑處理之代謝物或包含代謝物之物質混合物通常穿過壓模或篩。產物通常經由一或多個螺桿、輪碾機或例如旋轉或縱向移動構件之其他機械組件傳送至壓模。物質通過壓模或篩之後所獲得之擠出物可例如使用刮刀機械地移除，或(若適當)自身碎裂成大小不一的更小顆粒。無壓模之產物調配物成形方法為例如在混合器內之壓製及製粒，例如所謂的高剪切製粒。

若由於蒸發含代謝物之懸浮液及/或藉由添加調配佐劑(例如，諸如澱粉之載劑)至該懸浮液中，可獲得高黏度、糊狀或能粒化且從而能在該等方法之一者中直接使用的物質，則使用所述成形方法有利。否則，亦可在執行擠出、粒化、壓製、製粒(例如高剪切製粒)或造粒製程之前，藉由乾燥或預乾燥含代謝物之懸浮液(例如發酵液)、藉助於上述乾燥方法(較佳藉助於噴霧乾燥)獲得所需高黏度或糊狀稠度。若適當，則將以此方式所獲得之產物與熟習該項技術者已知之用於此目的之習知調配佐劑混合，且擠出、粒化、壓製、製粒或造粒。該等方法亦可以在成形步驟之前將含代謝物之物質混合物之至少一種成分熔化且成形後再固化之方式操作。通常，該實施例需要添加熟習該項技術者已知之用於此目的的習知佐劑。所獲得之產物在此處一般具有500 μm至0.05 m粒度。若需要則可使用諸如研磨之粉碎方法(若適當，則與篩選法組合)來由此獲得更小粒度。

藉由所述調配物成形方法所獲得之顆粒可藉由上述乾燥

方法乾燥直至所需殘餘水分含量。

以上述方式所獲得之全部固態代謝物，或包含該等固態代謝物之物質混合物，例如顆粒、顆粒劑及擠出物，可塗有塗層，意即塗有至少一個其他物質層。塗佈例如在混合器或流化床中實現，其中使待塗顆粒流態化且接著以塗料噴霧。塗料可呈乾燥形式，例如為粉末，或呈於溶劑(例如水、有機溶劑及該等物之混合物，尤其為水)中之溶液、分散液、乳液或懸浮液形式。若存在溶劑，則溶劑在噴霧至顆粒上期間或之後藉由蒸發來移除。此外，亦可以熔體形式施加諸如脂肪之塗料。

可以水性分散液或懸浮液形式噴塗之塗料例如描述於WO 03/059087中。詳言之，該等塗料包括：聚烯烴，諸如聚乙烯、聚丙烯、聚乙烯蠟；蠟；鹽類，諸如鹼金屬或鹼土金屬硫酸鹽、鹼金屬或鹼土金屬氯化物及鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽，例如硫酸鈉、硫酸鎂、硫酸鈣、氯化鈉、氯化鎂、氯化鈣、碳酸鈉、碳酸鎂及碳酸鈣；acronal，例如丙烯酸丁酯/丙烯酸甲酯共聚物，購自BASF之Styrofan牌，例如基於苯乙烯及丁二烯；及如WO 03/059086中所述的疏水性物質。當塗佈該等物質時，塗料之固體含量一般在每種狀況以經調配之最終產物之總重量計之0.1%重量比至30%重量比範圍內，尤其在0.2%重量比至15%重量比範圍內，且特定而言在0.4%重量比至5%重量比範圍內。

可以溶液形式噴霧之塗料例如為聚乙二醇；纖維素衍生物，諸如甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素及乙基纖維素；

聚乙烯醇；蛋白質，諸如明膠；鹽類，諸如鹼金屬或鹼土金屬硫酸鹽、鹼金屬或鹼土金屬氯化物及鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽，例如硫酸鈉、硫酸鎂、硫酸鈣、氯化鈉、氯化鎂、氯化鈣、碳酸鈉、碳酸鎂及碳酸鈣；碳水化合物，諸如糖，例如葡萄糖、乳糖、果糖、蔗糖及海藻糖，澱粉及改質澱粉。當塗佈該等物質時，塗料之固體含量一般在每種狀況以經調配之最終產物之總重量計之0.1%重量比至30%重量比範圍內，尤其在0.2%重量比至15%重量比範圍內，且尤其在0.4%重量比至10%重量比範圍內。

可以熔體形式噴霧之塗料描述於例如DE 199 29 257及WO 92/12645中。詳言之，該等塗料尤其包括聚乙二醇；合成脂肪及蠟，例如購自BASF之Polygen WE®；天然脂肪，諸如動物脂肪，例如蜂蠟及植物脂肪，例如小燭樹蠟；脂肪酸，例如動物蠟、動物脂肪酸、棕櫚酸、硬脂酸、三酸甘油酯；Edenor產品；Vegeole產品；褐煤酯蠟，例如購自BASF之E®。當塗佈該等物質時，塗料之固體含量一般在每種狀況以經調配之最終產物之總重量計之1%重量比至30%重量比範圍內，尤其在2%重量比至25%重量比範圍內，且特定在3%重量比至20%重量比範圍內。

可在乾式塗佈製程中以粉末形式使用之塗料例如為聚乙二醇；纖維素及纖維素衍生物，諸如甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素及乙基纖維素；聚乙烯醇；蛋白質，諸如明膠；鹽類，諸如鹼金屬或鹼土金屬硫酸鹽、鹼金屬或鹼土金屬氯化物及鹼金屬或鹼土金屬碳酸鹽，例如硫酸鈉、硫

酸鎂、硫酸鈣、氯化鈉、氯化鎂、氯化鈣、碳酸鈉、碳酸鎂及碳酸鈣；碳水化合物，諸如糖，例如葡萄糖、乳糖、果糖、蔗糖及海藻糖，澱粉及改質澱粉；脂肪；脂肪酸；動物脂；穀粉，例如玉米粉、小麥粉、黑麥粉、大麥粉或稻粉；黏土；灰及高嶺土。以可以溶液或熔體形式噴霧之物質完成待用作塗層之粉末與待塗佈之產物之間的黏著。該等溶液或熔體之噴霧可與粉末之引入交替的或者平行地實行。較佳地，將待塗佈之產物在流化床或混合器中流態化。接著，較佳連續地將粉末傳輸入流化床或混合器內以便塗佈。在一特別較佳實施例中，將溶液或熔體饋入處理空間中，同時添加粉末。溶液可例如經由連接片提供或較佳經由噴嘴(例如單物質噴嘴或雙物質噴嘴)噴霧至處理空間中。特別較佳地，處理空間內之粉末饋入站及噴嘴之位置彼此在空間上分開，以使溶液或熔體主要與待塗佈之產物而非待施加之粉末接觸。

亦可能施加不同塗料之混合物，詳言之，可能連續施加複數個相同或不同的塗層。

在一替代實施例中，所需非揮發性微生物代謝物可以類似於在生物乙醇製備中獲得副產物之方式連同發酵液之固體成分一起自剩餘發酵液中獲得(其中其稱為"Distiller's Dried Grains with Solubles (DDGS)"且如此所售)。在該狀況中，可將發酵液之液體成分之大體全部或僅部分自固體移除。以此方式所獲得之蛋白質副產物可在進一步加工或處理步驟之前或之後作為用於飼養動物(較佳為農業牲

畜，特別較佳為牛、豬及家禽，特別更佳為牛)之飼料或飼料添加劑使用。

為此，通常以單步驟蒸發程序或通常多步驟蒸發程序將液體之全部(意即包括非揮發性微生物代謝物及其他不溶性或固體成分)濃縮(蒸發)至某種程度，且隨後例如使用傾析器將所包含之固體自剩餘液體(液相)中分離。在本發明之方法中，首先可例如藉由結晶或沉澱將所需代謝物由液相轉變成固態，以使其連同其他固體一起獲得。此處所移除之固體一般具有10%重量比至80%重量比、較佳15%重量比至60%重量比且特別較佳20%重量比至50%重量比範圍內之乾物質含量，且若適當則可使用習知乾燥方法(例如上文中所述之彼等方法)進一步乾燥。藉由進一步加工或處理所獲得之最終調配物有利地具有至少約90%之乾物質含量，以便降低在儲存時損壞的風險。

已分離出之液相可作為處理用水再循環。未再循環進入製程中之液相的部分可以多步驟蒸發方法濃縮以形成糖漿。若在傾析步驟之前所需代謝物未由液相轉變成固相，則所得糖漿亦包含代謝物。通常，該糖漿具有10%重量比至90%重量比、較佳20%重量比至80%重量比且特別較佳25%重量比至65%重量比範圍內之乾物質含量。將此糖漿與已經傾析分離之固體混合且隨後乾燥。乾燥可例如藉助於滾筒乾燥器、噴霧乾燥器或槳葉乾燥器進行，較佳使用滾筒乾燥器。乾燥較佳以使所得固體具有以所得固體之總乾重計不超過30%重量比、較佳不超過20%重量比、特別

較佳不超過10%重量比且特別更佳不超過5%重量比的殘餘水分含量的方式進行。

不僅在此替代實施例中所分離出之液相可作為處理用水再循環，而且可在其他上述實施例中收集之揮發性成分在經歷冷凝後亦可作為處理用水再循環。有利地，液體或揮發相之該等再循環部分可完全或部分地用於步驟a)之生產含糖液體中或用於配製供發酵使用的緩衝劑或營養鹽溶液。當在步驟a)中混合再循環處理用水時，必須考慮由於過高地供給某些礦物質及離子(例如鈉及乳酸鹽離子)而引起的過高百分比對發酵具有不利影響。因此，較佳地，根據本發明當配製用於澱粉液化之懸浮液時將再循環處理用水之百分比限制為不超過75%重量比，較佳不超過60%重量比且特別較佳不超過50%重量比。在步驟a2)之較佳實施例中，當配製懸浮液時處理用水之百分比有利地在5%重量比至60%重量比且較佳10%重量比至50%重量比範圍內。

由於本文中所述之乾燥及精製方法，所得固體之平均粒度可在大體範圍內變化，例如自約1 μm至100 μm範圍內之相對較小之顆粒經由100 μm直至幾百μm範圍內之中等粒度直至約至少500 μm或約1 mm之相對較大之顆粒及更大直至幾毫米(例如直至10 mm)之顆粒變化。在粉末製備中，平均粒度通常在50 μm至1000 μm範圍內。在製備產物之其他固體形式時，例如藉由流化床噴霧乾燥器及噴霧製粒機製備擠出物、壓製物及尤其顆粒中，通常設定較大尺

度，平均粒度經常在200 μm至5000 μm範圍內。術語"平均粒度"在此處係指在非球形顆粒之狀況中單個顆粒之最大顆粒長度的平均值，或係指球狀或近乎球狀顆粒之直徑的平均值。必須考慮在噴霧乾燥處理期間由於一級顆粒凝聚會形成較大的二級顆粒。執行本發明之方法可形成通常在噴霧乾燥中所得到的粒度分佈。

此外，本發明係關於一種如上所述之方法，其中：

(i) 將不超過50%重量比之部分自步驟a2)中所獲得之包含選自穀仁之澱粉原料之非澱粉固體成分的含糖液體培養基中移除，且剩餘物用於執行發酵以便生產第一非揮發性固態代謝物(A)；及

(ii) 將該澱粉原料之所有或部分非澱粉固體成分自用於進行發酵以便生產相同或不同於代謝物(A)之第二非揮發性固態代謝物(B)之該部分中移除。

在一較佳實施例中，將(ii)之非澱粉固體成分以該使含糖液體培養基之剩餘部分之固體含量較佳不超過50%重量比、較佳不超過30%重量比、特別較佳不超過10%重量比且特別更佳不超過5%重量比的方式分離出。

在(ii)之單獨發酵中，此程序使必須滿足例如關於氧轉移速率之某些最低要求之微生物的使用成為可能。在(ii)之分離發酵中所使用之適當微生物例如為桿菌屬，較佳為枯草芽孢桿菌。在分離發酵中藉由該等微生物所產生之化合物尤其選自維生素、輔因子及營養品、嘌呤及嘧啶鹼基、核苷及核苷酸、脂質、飽和及不飽和脂肪酸、芳族化

合物、蛋白質、類胡蘿蔔素，特定地選自維生素、輔因子及營養品、蛋白質及類胡蘿蔔素，且更特定地選自核黃素及泛酸鈣。

此程序之一較佳實施例係關於以兩單獨發酵平行生產相同代謝物(A)及(B)。此在相同代謝物之不同應用具有不同純度要求之狀況中尤為有利。因此，使用含固體發酵液生產第一代謝物(A)，例如用作食品添加劑之胺基酸，例如離胺酸，且使用根據(ii)已耗盡固體之發酵液生產相同的第二代謝物(B)，例如用作食品添加劑的相同胺基酸，在當前狀況中例如為離胺酸。由於完全或部分移除非澱粉固體成分，因此可減小處理代謝物(其應用領域具有更高的純度要求，例如作為食品添加劑)時純化的複雜性。

在此程序之另一較佳實施例中，藉由在發酵中微生物所產生之代謝物B為核黃素。為執行發酵，可使用例如在WO 01/011052、DE 19840709、WO 98/29539、EP 1186664及Fujioka, K : New biotechnology for riboflavin (vitamin B2) and character of this riboflavin. Fragrance Journal (2003), 31(3), 44-48中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。

為執行該方法之該變體，例如可使用以下程序。根據本發明之方法，例如使用較佳處理步驟a)至c)執行較佳大容量的發酵以便生產代謝物A，例如胺基酸，諸如離胺酸。將在步驟a)所獲得之含糖液體培養基中之部分根據(i)移除，且根據(ii)藉由例如離心或過濾之習知方法自固體完全或部分地釋出。根據(ii)，將由此所獲得之大體上完全

或部分地自固體釋出的含糖液體培養基饋至發酵中以便生產代謝物B，例如核黃素。將根據(ii)所分離之固體流有利地返送回大容量發酵之含糖液體培養基之物流中。

根據(ii)由此所產生之含核黃素發酵液可藉由如對於其他碳原料例如在DE 4037441、EP 464582、EP 438767及DE 3819745中所述之類似條件及程序處理。繼溶解細胞群之後，較佳藉由傾析將以結晶形式存在的核黃素分離。例如過濾之其他分離固體的方式亦為可能的。之後，較佳藉助於噴霧乾燥器及流化床乾燥器將核黃素乾燥。或者，根據(ii)所生產之含核黃素發酵混合物可在例如EP 1048668及EP 730034中所述之類似條件下且使用如其所述之類似程序來處理。巴氏殺菌作用之後，將發酵液於此離心，且以無機酸處理剩餘的含固體部分。將所形成之核黃素藉由過濾自含水酸性培養基中移除，洗滌(若適當)且隨後乾燥。

在此程序之另一較佳實施例中，藉由微生物在發酵中所產生之代謝物B為泛酸。為執行發酵，可使用例如在WO 01/021772中對於其他碳原料所述之類似條件及程序。

為執行該方法之變體，例如可遵循諸如以上對於核黃素所述之程序。將根據(ii)經受初步純化且較佳大體上自固體釋出之含糖液體培養基根據(ii)饋至發酵中以便生產泛酸。此處，與含固體液體培養基相比黏度減小之事實尤為有利。較佳地，將經分離之固體流返送回至大容量發酵之含糖液體培養基之物流中。

根據(ii)所生產之含泛酸發酵液可在如對於其他碳原料

所述例如在EP 1050219及WO 01/83799中所述之類似條件下及使用如其所述之類似程序進行處理。將全部發酵液用巴氏法滅菌之後，例如藉由離心或過濾將剩餘固體分離。將在固體分離步驟中所獲得之澄清溢流物部分蒸發，(若適當)以氯化鈣處理，且乾燥，尤其噴霧乾燥。

在平行式大容量發酵製程之範疇內，獲得已分離出之固體以及各自所需非揮發性微生物代謝物(A)。

乾燥及/或調配步驟之後，可將全部或經研磨之穀仁(較佳玉米、小麥、大麥、粟/高梁、黑小麥及/或黑麥)添加至產物調配物中。

此外，本發明係關於可藉由本文中所述之方法獲得之非揮發性代謝物的固體調配物。除發酵之至少一種非揮發性代謝物(成分A)之外，調配物通常包含來自發酵之生物質(成分B)及澱粉原料之部分或全部非澱粉固體成分(成分C)。此外，本發明之物質混合物進一步包含(若適當)上述調配佐劑，諸如黏合劑、載劑、粉化佐劑/助流劑、薄膜或有色顏料、殺生物劑、分散劑、消泡劑、黏度調節劑、酸、鹼、抗氧化劑、酶穩定劑、酶抑制劑、被吸附物、脂肪、脂肪酸、油劑及類似物。

代謝物之量一般為以組分A、B及C之總量計之10%重量比以上，例如大於10%重量比至80%重量比，尤其為20%重量比至60%重量比。代謝物之量一般為以調配物之總重量計之0.5%重量比至80%重量比，尤其為1%重量比至60%重量比。

來自產生非揮發性代謝物之發酵之生物質的量一般為以組分A、B及C之總量計之1%重量比至50%重量比，尤其為10%重量比至40%重量比；或以調配物之總重量計之0.5%重量比至50%重量比，尤其為2%重量比至40%重量比。

通常，來自發酵液之澱粉原料之非澱粉固體成分的量為以組分A、B及C之總量計之至少1%重量比且尤其為5%重量比至50%重量比；或以調配物之總重量計之至少0.5%重量比、尤其為至少2%重量比，例如在2%重量比至50%重量比範圍內、尤其在5%重量比至40%重量比範圍內。

通常，調配佐劑的量應以組分A、B及C之總量計高達400%重量比，經常以組分A、B及C之總量計在0%重量比至100%重量比範圍內；或以調配物之總重量計在0%重量比至80%重量比範圍內且尤其在1%重量比至30%重量比範圍內。

本發明之調配物呈固態，一般呈粉末、顆粒、糰粒、擠出物、壓製物或凝聚物之形式。

本發明之調配物一般含有首先來自澱粉原料之固體成分且此外在製備本發明之調配物中用作增量劑/載劑的膳食纖維。關於對於本發明之目的而歸入術語"膳食纖維"之組分的定義，參考American Association of Cereal Chemists (AACC) in Cereal Foods World (CFW)之報導，46 (3), "The Definition of Dietary Fiber", 2001，第112-129頁，尤其第112頁、第113頁及第118頁。通常，膳食纖維的量為每種狀況中以調配物之總重量計之至少1%重量比、尤其至少

5%重量比、特定地至少10%重量比且經常在1%重量比至60%重量比範圍內、尤其在5%重量比至50%重量比範圍內，且特定在10%重量比至40%重量比範圍內。通常，膳食纖維含量藉由AACC標準方法(American Association of Cereal Chemists. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists，第10版，Method 32-25, Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin (Uppsala method). The Association, St. Paul, MN)確定。

本發明之物質混合物具有大體上與生物質B對應的高蛋白質含量。蛋白質含量之其他部分亦可來源於所使用之澱粉原料。蛋白質含量一般在以調配物之總重量計之20%重量比至70%重量比範圍內。

固有的蛋白質含量(特定而言組分B)及膳食纖維含量(特定而言組分C)對於各種調配方法為有利的，例如在油性代謝物之狀況中，尤其考慮到在本上下文中所使用的乾燥步驟。

本發明之調配物有利地包含一或多種必需之胺基酸，尤其至少一種選自離胺酸、甲硫胺酸、蘇胺酸及色胺酸之胺基酸。若必需之胺基酸(尤其彼等所提及之胺基酸)存在，則其通常各以較在發酵生物乙醇生產中產生的傳統DDGS副產物增加的量尤其至少1.5之因數的量而存在。若所述胺基酸存在於調配物中，則該調配物通常具有每種狀況以調配物之全部乾物質計之以下各物質之含量：至少1%重

量比、尤其在1%重量比至10%重量比範圍內且特定地在1%重量比至5%重量比範圍內之離胺酸含量；至少0.8%重量比、尤其在0.8%重量比至10%重量比範圍內且特別在0.8%重量比至5%重量比範圍內之甲硫胺酸含量；至少1.5%重量比、尤其在1.5%重量比至10%重量比範圍內且特定地在1.5%重量比至5%重量比範圍內之所蘇胺酸含量；及/或至少0.4%重量比、尤其在0.4%重量比至10%重量比範圍內且特定地在0.4%重量比至5%重量比範圍內之色胺酸含量。

本發明之調配物通常亦包含少量水，水經常在每種狀況中以調配物之總重量計之0%重量比至25%重量比範圍內，尤其在0.5%重量比至15%重量比範圍內，特定地在1%重量比至10%重量比範圍內且更特定地在1%重量比至5%重量比之水的範圍內。

本發明之調配物適用於動物或人類營養，例如作為營養品或作為添加劑或補充品，亦可呈預混合物之形式。詳言之，適用於此目的的調配物為包含以下各物之調配物：胺基酸，例如離胺酸、麩胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、蘇胺酸或色胺酸；維生素，例如維生素B_2(核黃素)、維生素B_6或維生素B_{12}；類胡蘿蔔素，例如還原蝦紅素或cantaxanthin；糖，例如海藻糖；或有機酸，例如反丁烯二酸。

本發明之調配物亦適用於紡織品、皮革、纖維素及紙行業。用於紡織領域中的調配物尤其為包含諸如澱粉酶、果

膠酶及/或酸性、混雜型或中性纖維素酶之酶作為代謝物的彼等調配物；用於皮革領域中的調配物尤其為包含諸如脂肪酶、胰腺酶或蛋白酶之酶的彼等調配物；且用於纖維素及紙行業中的調配物尤其為包含諸如澱粉酶、木糖聚糖酶、纖維素酶、果膠酶、脂肪酶、酯酶、蛋白酶、例如漆酶、接觸酶及過氧化酶之氧化還原酶之酶的彼等調配物。

【實施方式】

以下實例意欲說明本發明之個別態樣，然而不應理解為限制本發明。

實例

I. 研磨澱粉原料

下文中所用研磨基料製備如下。使用旋轉粉碎機將全部玉米仁完全研磨。使用不同打漿機、研磨路徑或篩網元件，獲得三種不同的細度。藉助於實驗室振動篩(振動分析儀：Retsch Vibrotronic型VE1；過篩時間：5分鐘，振幅：1.5 mm)進行篩網分析，得到表1中所列的結果。

表1

實驗序號	**T 70/03**	**T 71/03**	**T 72/03**
< 2 mm/% [1)]	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
研磨基料總量	20 kg	11.45 kg	13.75 kg

[1)] 以研磨基料總量計之%重量比

II. 酶促澱粉液化及澱粉糖化

II.1 糖化步驟中不含植酸酶

II.1a) 酶促澱粉液化

將320 g乾式研磨之玉米粉(T71/03)懸浮於480 g水中且在連續攪拌下與310 mg氯化鈣混合。在整個實驗期間連續攪拌。以H_2SO_4將pH調節至6.5且將混合物加熱至35℃之後，添加2.4 g之Termamyl 120L型L (Novozymes A/S)。在40分鐘過程中，將反應混合物加熱至86.5℃之溫度，以NaOH將pH再調節至上述值(若適當)。在將溫度升高至91℃之過程期間，將另外400 g乾式研磨之玉米粉(T71/03)在30分鐘內添加。將反應混合物在此溫度下保持約100分鐘。隨後添加另外2.4 g Termamyl 120L，且將此溫度保持約100分鐘。在實驗期間使用碘-澱粉反應監測液化之進程。最後將溫度升高至100℃，且使反應混合物另外沸騰20分鐘。此時，不再能偵測到澱粉。將反應器冷卻至35℃。

II.1b) 糖化

在恆定攪拌下將II.1a)中所獲得之反應混合物加熱至61℃。在整個實驗期間連續攪拌。以H_2SO_4將pH調節至4.3之後，添加10.8 g (9.15 ml) Dextrozyme GA (Novozymes A/S)。在以葡萄糖測試條(Boehringer之S-Glucotest)監測反應進程之時間期間，使溫度保持約3小時。結果列於以下表2中。隨後將反應混合物加熱至80℃且接著冷卻。由此產生1180 g具有約1.2 kg/l之密度及約53.7%重量比之乾物

質含量(如藉由紅外線乾燥器所測定)之液體產物。經水洗滌後，獲得約14%重量比之乾物質含量(無水溶性成分)。如藉由HPLC所測定，反應混合物之葡萄糖含量等於380 g/l(參見表2，試樣序號7)。

表2：

試樣序號	分鐘(自添加葡糖澱粉酶始)	上澄液中之葡萄糖濃度[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. 糖化步驟中有植酸酶

II.2a) 澱粉液化

如II.1a)中所述將乾式研磨之玉米粉試樣液化。

II.2b) 糖化

在恆定攪拌下，將II.2a)中所獲得之反應混合物加熱至61℃。在整個實驗期間連續攪拌。以H_2SO_4將pH調節至4.3之後，添加10.8 g (9.15 ml) Dextrozyme GA (Novozymes A/S)及70 μl植酸酶(700單位植酸酶，購自BASF AG之Natuphyt液體10000 L)。在以葡萄糖測試條(Boehringer之S-Glucotest)監測反應進程之時間期間，使溫度保持約3小時。隨後將反應混合物加熱至80℃且接著冷卻。將所得產物藉由紅外線乾燥器乾燥且以水洗滌。反應混合物之葡萄糖含量藉由HPLC測定。

II.3 澱粉之酶促液化及糖化之其他協定

II.3a) 玉米粉

將360 g去離子水引入反應容器中。將1.54 ml $CaCl_2$儲備溶液(100 g $CaCl_2 \times 2$ H_2O/l)添加至漿液中直至最後濃度為約70 ppm Ca^{2+}。在恆定攪拌下，將240 g玉米粉緩慢注入水中。使用50%重量比濃度NaOH水溶液將pH調節至6.5之後，添加4.0 ml (等於2%重量比酶/乾物質)之Termamyl 120 L型L (Novozymes A/S)。接著將漿液快速加熱達到85℃。此過程期間，需要不斷監測且(若適當)調節pH。

達到最終溫度後，開始添加其他粗粉，最初添加50 g粗粉。此外，將0.13 ml $CaCl_2$儲備溶液添加至漿液中以便使Ca^{2+}濃度維持在70 ppm。添加期間，將溫度恆定保持在85℃。保持至少10分鐘，以確保在添加另一部分(50 g粗粉及0.13 ml $CaCl_2$儲備溶液)之前反應完全。添加兩部分之後，添加1.67 ml Termamyl；之後，添加另外兩部分(在每種狀況中為50 g粗粉及0.13 ml $CaCl_2$儲備溶液)。達成55%重量比之乾物質含量。添加之後，將溫度升高至100℃，且使漿液沸騰10分鐘。

取一試樣且將其冷卻至室溫。將試樣以去離子水(約1:10)稀釋後，添加一滴濃盧格氏液(Lugol's solution)(每公升5 g之I與10 g之KI的混合物)。深藍顯色指示存在殘餘澱粉；當所有澱粉均水解時，觀察到棕色顯色。當測試指示存在一部分殘餘澱粉時，將溫度再降低至85℃且保持恆定。另外添加1.67 ml之Termamyl直至碘-澱粉反應為陰性。

對於隨後的糖化反應而言，將澱粉測試為陰性之混合物的溫度調節至61℃。藉由添加50%濃度之硫酸將pH調節至4.3。在反應過程中，將pH維持在此值。將溫度維持在61℃。添加5.74 ml (等於1.5%重量比酶/乾物質)之Dextrozym GA (Novozymes A/S)以便將液化澱粉轉化成葡萄糖。使反應進行1小時。為使酶失活，將混合物加熱至85℃。將熱混合物填充入無菌容器中，將其冷卻且接著在4℃下儲存。獲得420 g/l之最終葡萄糖濃度。

II.3b) 黑麥粉(包括以纖維素酶/半纖維素酶之預處理)

將360 g去離子水引入反應容器中。在恆定攪拌下，將155 g黑麥粉緩慢注入水中。將溫度恆定維持在50℃。使用50%重量比濃度NaOH水溶液將pH調節至5.5之後，添加3.21 ml (等於2.5%重量比酶/乾物質)之Viscozyme L (Novozymes A/S)。30分鐘後，開始添加其他粗粉，最初添加55 g粗粉。另外30分鐘後，添加另外的50 g粗粉；30分鐘後，添加另外的40 g粗粉。最後添加完後30分鐘，可開始液化。

添加1.7 ml $CaCl_2$儲備溶液(100 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$/l)。使用50%重量比之NaOH水溶液將pH調節至6.5之後，添加5.0 ml (等於2%重量比酶/乾物質)之Termamyl 120 L型L (Novozymes A/S)。接著在85℃將漿液快速加熱。此過程期間，連續監測且(若適當)調節pH。

達到最終溫度後，開始添加其他粗粉，最初添加60 g粗粉。此外，將0.13 ml $CaCl_2$儲備溶液添加至漿液中以使

Ca^{2+}濃度維持在70 ppm。在添加期間，將溫度恆定保持在85℃。保持至少10分鐘，以確保在添加另一部分(40 g粗粉及0.1 ml $CaCl_2$儲備溶液)之前反應完全。添加1.1 ml Termamyl；之後，添加另一部分(40 g粗粉及0.1 ml $CaCl_2$儲備溶液)。達成55%重量比之乾物質含量。添加完後，將溫度升高至100℃，且使漿液沸騰10分鐘。

取一試樣且將其冷卻至室溫。將試樣以去離子水(約1:10)稀釋後，添加一滴濃盧格氏液(Lugol's solution)(每公升5 g之I與10 g之KI的混合物)。深藍顯色指示存在殘餘澱粉；當所有澱粉均水解時，觀察到棕色顯色。當測試指示存在一部分殘餘澱粉時，將溫度再降低至85℃且保持恆定。另外添加1.1 ml Termamyl直至碘-澱粉反應為陰性。

對於隨後的糖化反應而言，將澱粉測試為陰性之混合物的溫度調節至61℃。藉由添加50%濃度的硫酸將pH調節至4.3。在反應過程中，將pH維持在此值。將溫度維持在61℃。添加5.74 ml (等於1.5%重量比酶/乾物質)之Dextrozym GA (Novozymes A/S)以便將液化澱粉轉化成葡萄糖。使反應進行1小時。為使酶失活，將混合物在85℃加熱。將熱混合物填充入無菌容器，將其冷卻且接著在4℃下儲存。獲得370 g/l之最終葡萄糖濃度。

II.3c) 小麥粉(包括以木糖聚糖酶之預處理)

將360 g去離子水引入反應容器中。將水加熱至55℃，且使用50%重量比濃度之NaOH水溶液將pH調節至6.0。溫度及pH調節之後，添加3.21 ml (等於2.5%重量比酶/乾物質)

之Shearzyme 500L (Novozymes A/S)。在恆定攪拌下，將155 g小麥粉緩慢注入溶液中。使溫度及pH保持恆定。30分鐘後，開始添加其他粗粉，最初添加55 g粗粉。另外30分鐘後，添加另外的50 g粗粉；30分鐘後，添加另外的40 g粗粉。最後添加完後30分鐘，可開始液化。

如II.3b中所述進行液化及糖化。獲得400 g/l之最終葡萄糖濃度。

III. 菌株ATCC13032 $lysC^{fbr}$

在以下部分實例中，使用經修飾之麩胺酸棒桿菌菌株，該菌株以ATCC13032 $lysC^{fbr}$之名描述於WO 05/059144中。

實例1

a) 酶促澱粉液化及糖化

將500 g之乾式研磨之玉米粉懸浮於750 ml水中且再於攪拌式混合器中精細研磨。將懸浮液分為4個試樣序號1至4，且各試樣均以約3 g熱穩定之α-澱粉酶處理(試樣序號1及2：Termamyl L；試樣序號3及4：Spezyme)。接著將試樣序號2及4以約7 g/l葡糖澱粉酶處理(試樣序號2：Dextrozyme GA；試樣序號4：Optidex)。由此形成淺黃色黏性試樣，其固體內含物在每種狀況中藉由離心分離，疏水性固體層浮於透明液相上。

忽略或考慮已離心分離出之糰粒，使用HPLC將以此方式所獲得之各試樣之透明上澄液以經濃縮之形式及10倍稀釋後加以分析。當考慮糰粒時，假定糰粒乾物質含量為50%重量比。基於原試樣之結果列於以下表3中。

表3：

	試樣序號			
	1	2	3	4
上澄液，10倍稀釋，無糰粒				
葡萄糖[g/kg]	73.0	287.3	63.7	285.1
果糖[g/kg]	3.4	2.3	5.3	2.7
寡醣[g/kg]	202.1	38.2	150.8	31.5
總糖量[g/kg]	278	328	220	319
上澄液，10倍稀釋，有糰粒				
葡萄糖[g/kg]		178		168
總糖量[g/kg]	172	203	130	188
上澄液，不稀釋，有糰粒				
葡萄糖[g/kg]		198		189

b) 發酵

使用麩胺酸棒桿菌(燒瓶4-9)將根據實例II.1所獲得之兩種玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗。此外，平行使用類似於實例II.1所製備之小麥粉水解產物(燒瓶1-3)。

b.1) 接種物之製備

將細胞在無菌CM瓊脂上劃線培養(組成：參見表4；在121℃下20分鐘)且接著在30℃培育48小時。隨後將細胞自平板刮離且再懸浮於生理鹽水中。在每種狀況中將250 ml錐形燒瓶中之25 ml培養基以由此所製備之細胞懸浮液接種，用於接種之細胞懸浮液之量應使光學密度在600 nm達到1之OD_{600}值。

表4：CM瓊脂平板之組成

濃度	成分
10.0 g/l	D-葡萄糖
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	尿素
10.0 g/l	細菌蛋白腖 (Difco)
5.0 g/l	酵母萃(Difco)
5.0 g/l	牛肉萃(Difco)
22.0 g/l	瓊脂

b.2) 發酵液之製備

燒瓶培養基1至9之組成列於表5中。

表5：燒瓶培養基

	燒瓶序號		
	1-3	**4-6**	**7-9**
小麥 399.66 g/kg**	250 g/l***		
玉米I 283.21 g/kg**		353 g/l***	
玉米II 279.15 g/kg**			358 g/l***
$(NH_4)_2SO_4$	50 g/l		
$MgSO_4.7H_2O$	0.4 g/l		
KH_2PO_4	0.6 g/l		
$FeSO_4.7H_2O$	2 mg/l		
$MnSO_4.H_2O$	2 mg/l		
硫胺HCl	0.3 mg/l		
生物素	1 mg/l		
$CaCO_3$	50 g/l		
pH*	7.8		

*待經稀NaOH水溶液調節
**水解產物中之葡萄糖濃度
***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，在30℃下及在增濕搖動器中搖動(200 rpm)下將燒瓶培育48小時。發酵終止後，糖及離胺酸含量藉由HPLC測定。HPLC使用得自Agilent之1100 Series LC

System執行。經鄰苯二醛預先衍生化之管柱允許定量測定所形成之胺基酸，使用得自Agilent之Hypersil AA管柱將產物混合物分離。結果收集於表6中。

表6

燒瓶編號	果糖 g/l	葡萄糖 g/l	蔗糖 g/l	總糖量 g/l
1	0.00	0.00	4.71	4.71
2	0.00	7.75	4.82	12.57
3	0.00	13.85	4.57	18.42
4	0.00	17.20	11.38	28.58
5	0.00	21.08	11.31	32.39
6	0.00	25.51	11.29	36.80
7	0.00	32.59	9.83	42.42
8	0.00	24.10	10.01	34.11
9	0.00	39.26	9.94	49.20

在所有燒瓶中，離胺酸以約30 g/l至40 g/l之量級之可比量(相當於在標準發酵中使用葡萄糖營養液所獲得的產量)來製備。

c) 乾粉之製備

c.1) 噴霧乾燥

藉助於滾筒泵(類型：ISM444，Ismatec)將250 g具有約20%重量比之固體含量之含離胺酸液體(如實例1a及1b中所述，獲自於玉米粉懸浮液)在室溫下導入玻璃燒杯中且輸送入噴霧塔之並流操作之雙物質噴嘴(Niro, Minor High Tec)中。噴射壓力為4巴。在噴霧過程期間，將小部分約2 g至3 g之Sipernat S22計量輸入。入口溫度為95℃至100℃。調節泵排量以使得產物溫度大體上不低於50℃。

執行噴霧乾燥處理時，將噴霧塔之壁以離胺酸適度塗佈。所獲得之乾粉目測為精細的且具有優良流動性。獲得23 g乾粉。

c.2) 擠出

將400 g已在80℃加熱60分鐘、具有約20%重量比之固體含量之含離胺酸液體(與實例1a及1b類似，獲自於玉米粉懸浮液)以藉由溶解14 g聚乙烯醇(PVA；M_W=10 000至190 000 g/mol)於75 g水中所製備之PVA溶液處理。所得懸浮液之pH為約7。將此懸浮液添加至約950 g玉米澱粉(來自Roquette)中，最初將其置於Lödige混合器中且在約100-350 rpm下混合。

隨後將自混合器排出且具有約30℃溫度之粉質、濕潤、漿糊狀的產物饋至DOME擠出機(Fuji Paudal Co. Ltd.)中且藉由30℃以下之溫度擠出。將擠出物在來自BÜCHI之流化床乾燥器中，在小於60℃之產物溫度下乾燥120分鐘。此得到600 g顆粒。

c.3) 流化床中之黏聚作用

最初將500 g之Na_2SO_4導入流化床裝置Aeromatic MP-1 (Niro Aeromatic；穿孔底板之穿孔區域：12% (12% FF))中且溫熱至50℃溫度。藉助於滾筒泵將998 g具有約20%重量比之固體含量之含離胺酸液體(與實例1a及1b類似，獲自於玉米粉懸浮液)饋至雙物質噴嘴(d=1.2 mm)中且經由頂部噴霧位置中之該噴嘴(意即自上方)噴霧至已導入錐體中之固體上。噴霧壓力為1.5巴。在每種狀況中在添加278 g及

另外添加320 g含離胺酸液體(分別對應於經噴霧之發酵固體10及20%重量比(以流化床裝置中之全部固體計)之部分)之後間斷噴霧過程以便進行中間乾燥及取樣(在每種狀況中為50 g)。將入口空氣調節至約45 m^3/h至60 m^3/h範圍內之量且在乾燥步驟期間減小。入口空氣溫度在46℃至80℃範圍內，在有些狀況中在最後乾燥步驟期間更低。調節泵排量以使產物溫度為約50℃且大體上不低於45℃。冷卻後，排出513 g產物。所取全部三種產物試樣之黏聚物之大小在幾百微米範圍內。

c.4) 接觸乾燥

將240 g具有約20%重量比之含離胺酸液體(與實例1a及1b類似，獲自於玉米粉懸浮液)放置於500 ml圓底燒瓶，且接著藉助於旋轉蒸發器、在稍微減壓下(880毫巴至920毫巴)濃縮。浴溫為140-145℃。約40分鐘後，將燒瓶壁上所形成之塗層機械研磨且繼續進行乾燥處理。另外40分鐘後，重複進行研磨。接著繼續乾燥，間或中斷以便進一步研磨殘餘物。總乾燥時間為2.5 h。所獲得之顆粒為暗褐色且具有優良流動性。顆粒之殘餘水分為3%。僅少量顆粒黏附至燒瓶壁。

實例2

使用根據實例II.1所獲得之玉米粉水解產物，使用WO 05/059144中所述之菌株ATCC13032 $lysC^{fbr}$，以類似於實例1b)之方式進行發酵。在30℃在無菌CM瓊脂(組成：參見表4；在121℃為20分鐘)上將細胞培育48小時。隨後將細

胞自平板刮離且再懸浮於生理鹽水中。在每種狀況中以由此所製備之細胞懸浮液將250 ml錐形燒瓶中之25 ml培養基1或2 (參見表5)接種，用於接種之細胞懸浮液之量應使得光學密度在610 nm達到1之OD_{610}值。接著將試樣在增濕搖動器(相對大氣濕度為85%)中在200 rpm下及30℃下培育48小時。培養基中之離胺酸濃度藉助於HPLC測定。在所有狀況中，產生約相同量之離胺酸。

如實例1c.2)中所述處理所得含離胺酸發酵液以得到擠出物。

實例3

使用麩胺酸棒桿菌(ATCC13032 $lysC^{fbr}$) (燒瓶1+2)將根據實例II.3a所獲得之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗。此外，平行使用類似於實例II.3所製備之小麥粉水解產物(燒瓶3+4)及黑麥粉水解產物(燒瓶5+6)。

3.1) 接種物之製備

將細胞在無菌CM+CaAc瓊脂(組成：參見表7；在121℃下20分鐘)上劃線培養，且接著在30℃下培育48小時，接著接種於新鮮平板上，且在30℃下培育隔夜。隨後將細胞自平板刮離且再懸浮於生理鹽水中。在每種狀況中以由此所製備之細胞懸浮液將250 ml具有兩塊擋板之錐形燒瓶中之23 ml培養基(參見表8)接種，用於接種之細胞懸浮液之量應使光學密度在610 nm達到0.5之OD_{610}值。

表 7：CM+CaAc瓊脂板之組成

濃度	成分
10.0 g/l	D-葡萄糖
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	尿素
5.0 g/l	細菌蛋白腖(Difco)
5.0 g/l	酵母萃(Difco)
5.0 g/l	牛肉萃(Difco)
20.0 g/l	酪蛋白胺基酸
20.0 g/l	瓊脂

3.2) 發酵液之製備

燒瓶培養基1至6之組成列於表8中。

在對照培養基中，使用相應量之葡萄糖溶液而非粗粉水解產物。

表 8：燒瓶培養基

	燒瓶序號		
	1+2	**3+4**	**5+6**
玉米 344 g/kg **	174 g/l ***		
小麥 343 g/kg **		175 g/l ***	
黑麥 310 g/kg **			194 g/l ***
$(NH_4)_2SO_4$	20 g/l		
尿素	5 g/l		
KH_2PO_4	0.113 g/l		
K_2HPO_4	0.138 g/l		
ACES	52 g/l		
MOPS	21 g/l		
檸檬酸×H_2O	0.49 g/l		
3,4-二羥基苯甲酸	3.08 mg/l		
NaCl	2.5 g/l		
KCl	1 g/l		
$MgSO_4$×7 H_2O	0.3 g/l		
$FeSO_4$×7 H_2O	25 mg/l		

$MnSO_4 \times 4\text{-}6\ H_2O$	5 mg/l
$ZnCl_2$	10 mg/l
$CaCl_2$	20 mg/l
H_3BO_3	150 μg/l
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	100 μg/l
$CuCl_2 \times 2\ H_2O$	100 μg/l
$NiSO_4 \times 6\ H_2O$	100 μg/l
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	25 μg/l
生物素(Vit. H)	1050 μg/l
硫胺×HCl(Vit B_1)	2100 μg/l
菸鹼醯胺	2.5 mg/l
泛酸	125 mg/l
氰鈷胺(Vit B_{12})	1 μg/l
4-胺基苯甲酸(PABA; Vit. H_1)	600 μg/l
葉酸	1.1 μg/l
吡哆醇(Vit. B_6)	30 μg/l
核黃素(Vit. B_2)	90 μg/l
CSL	40 ml/l
pH*	6.85

*待經稀NaOH水溶液調節
**水解產物中之葡萄糖濃度
***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，在30℃下在增濕搖動器中搖動(200 rpm)下將燒瓶培育48小時。發酵終止後，葡萄糖及離胺酸含量藉由HPLC測定。HPLC分析使用得自Agilent之1100 Series LC System執行。測定所形成之胺基酸需要以鄰苯二醛將柱預先衍生化，使用得自Agilent之Zorbax Extend C18管柱將產物混合物分離。結果收集於表9中。

表9

燒瓶序號	葡萄糖[g/l]	離胺酸[g/l]
1	1.2	12.0
2	1.2	10.8
3	0.2	10.6
4	0.2	10.0
5	0.0	11.1
6	0.0	9.5

在所有燒瓶中，離胺酸以約10 g/l至12 g/l之量級之可比量(相當於在標準發酵中使用葡萄糖營養液所獲得的產量)而製備。

根據實例1c.1)處理所得含離胺酸發酵液以形成可流動粉末。

實例4

將根據實例II.3a所獲得之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗(燒瓶1-3)。泛酸鹽製造菌株為桿菌屬PA824 (詳細描述於WO 02/061108中)。此外，平行使用類似於實例II.3所製備之小麥粉水解產物(燒瓶4-6)及黑麥粉水解產物(燒瓶7-9)。

4.1) 接種物之製備

將裝有兩塊擋板之250 ml錐形燒瓶中之42 ml預培養培養基(參見表10)在每種狀況中以0.4 ml冷凍培養物接種，且在43℃下在增濕搖動器中搖動(250 rpm)下培育24小時。

表10：預培養培養基之組成

成分	濃度
麥芽糖	28.6 g/l
大豆粉	19.0 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	7.6 g/l
麩胺酸單鈉	4.8 g/l
檸檬酸鈉	0.95 g/l
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	9.5 mg/l
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	1.9 mg/l
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	1.4 mg/l
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	1.9 mg/l
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0.2 mg/l
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0.7 mg/l
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	15.2 g/l
KH_2PO_4	3.9 g/l
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0.9 g/l
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0.09 g/l
MOPS	59.8 g/l
pH*	7.2

*待經稀KOH水溶液調節

將裝有兩塊擋板之250 ml錐形燒瓶中之42 ml主培養基(參見表11)在各種狀況中以1 ml之預培養物接種。

4.2) 發酵液之製備

燒瓶培養基1至9之組成列於表11中。

在對照培養基中，使用相應量之葡萄糖溶液而非粗粉水解產物。

表11：燒瓶培養基

	燒瓶序號		
	1-3	**4-6**	**7-9**
玉米 381.4 g/kg **	75 g/l ***		
小麥 342.0 g/kg **		84 g/l ***	
黑麥 303.0 g/kg **			94 g/l ***
大豆粉	19.0 g/l		
$(NH_4)_2SO_4$	7.6 g/l		
麩胺酸單鈉	4.8 g/l		
檸檬酸鈉	0.95 g/l		
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	9.5 mg/l		
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	1.9 mg/l		
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	1.4 mg/l		
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	1.9 mg/l		
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0.2 mg/l		
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0.7 mg/l		
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	15.2 g/l		
KH_2PO_4	3.9 g/l		
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	0.9 g/l		
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	0.09 g/l		
MOPS	59.8 g/l		
pH*	7.2		

*待經稀NaOH水溶液調節

**水解產物中之葡萄糖濃度

***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，在43℃且在增濕搖動器中搖動(250 rpm)下將燒瓶培育24小時。發酵終止後，葡萄糖及泛酸含量藉由HPLC測定。葡萄糖測定藉助於得自Bio-Rad之Aminex HPX-87H管柱執行。泛酸濃度藉助於在得自Phenomenex之Aqua C18管柱上之分離來測定。結果收集於表12中。

表12

燒瓶序號	葡萄糖[g/l]	泛酸[g/l]
1	0.00	1.75
2	0.00	1.70
3	0.00	1.73
4	0.10	1.80
5	0.10	1.90
6	0.19	1.96
7	0.12	2.01
8	0.12	2.12
9	0.13	1.80

在所有燒瓶中，泛酸以約1.5 g/l至2 g/l之量級之可比量製備，該量依照在標準發酵中以葡萄糖營養液所獲得之產量。

所得含泛酸發酵液根據實例1c.3)處理以形成黏聚物，或根據實例1c.4部分地處理以形成粗乾粉。

實例5

使用黑麴黴將根據實例II.3a所獲得之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗(燒瓶1-3)。此外，平行使用類似於實例II.3所製備之小麥粉水解產物(燒瓶4-6)及黑麥粉水解產物(燒瓶7-9)。

5.1) 菌株

與NP505-7之生產(詳述於WO 98/46772中)類似，在glaA促進劑控制下自無花果麴黴(Aspergillus ficuum)生成具有phyA基因之6個複本的黑麴黴植酸酶的生產菌株。所用對照物為具有3個經修飾之glaA擴增子(類似於ISO 505)但整合之phyA表現卡匣之菌株。

5.2) 接種物之製備

將100 ml裝有擋板之錐形燒瓶中之20 ml預培養培養基(參見表13)在每種狀況中以100 µl冷凍培養物接種，且在34℃下在增濕搖動器中搖動(170 rpm)下培育24小時。

表13：預培養培養基之組成

成分	濃度
葡萄糖	30.0 g/l
得自酪蛋白之蛋白胨	10.0 g/l
酵母萃	5.0 g/l
KH_2PO_4	1.0 g/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.5 g/l
$ZnCl_2$	30 mg/l
$CaCl_2$	20 mg/l
$MnSO_4 \times 1\ H_2O$	9 mg/l
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	3 mg/l
Tween 80	3.0 g/l
青黴素	50000 IU/l
肺炎鏈球菌	50 mg/l
pH*	5.5

*待經稀硫酸調節

將裝有一塊擋板之250 ml錐形燒瓶中之50 ml主培養基(參見表14)在各種狀況中以5 ml預培養物接種。

5.3) 發酵液之製備

燒瓶培養基1至9之組成列於表14中。

在對照培養基中，使用相應量之葡萄糖溶液而非粗粉水解產物。

表14：燒瓶培養基

	燒瓶序號		
	1-3	**4-6**	**7-9**
玉米　381.4 g/kg **	184 g/l ***		
小麥　342.0 g/kg **		205 g/l ***	
黑麥　303.0 g/kg **			231 g/l ***
得自酪蛋白之蛋白腺	25.0 g/l		
酵母萃	12.5 g/l		
KH_2PO_4	1.0 g/l		
K_2SO_4	2.0 g/l		
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.5 g/l		
$ZnCl_2$	30 mg/l		
$CaCl_2$	20 mg/l		
$MnSO_4 \times 1\ H_2O$	9 mg/l		
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	3 mg/l		
青黴素	50000 IU/l		
肺炎鏈球菌	50 mg/l		
Ph*	5.6		

*待經稀硫酸調節
**水解產物中之葡萄糖濃度
***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，在34℃下及在增濕搖動器中搖動(170 rpm)下將燒瓶培育6天。發酵終止後，藉助於檢定測定植酸酶活性。發酵終止後，以植酸作為受質且在250 mM乙酸/乙酸鈉/Tween 20 (0.1%重量比)緩衝劑(pH 5.5)中在適當植酸酶活性水準(標準：0.6 U/ml)下測定植酸酶活性。使檢定標準化以供微量滴定板(MTP)之用。將10 μl酶溶液與140 μl之6.49 mM植酸鹽溶液於250 mM乙酸鈉緩衝劑pH 5.5 (植酸鹽：植酸之十二鈉鹽)混合。在37℃下培育1小時後，藉由添加等容量(150 μl)三氯乙酸將反應中止。將此混合物之一等分試樣(20 μl)移入280 μl之包含0.32 N H_2SO_4、

0.27%重量比鉬酸銨及1.08%重量比抗壞血酸之溶液。此後將其在50℃培育25分鐘。在820 nm處量測藍色溶液之吸收性。結果收集於表15中。

表15：

	植酸酶活性 [FTU/ml]*
玉米	433
小麥	476
黑麥	564
對照物	393

*) FTU=福爾馬肼(Formazine)濁度單位

將所得含植酸酶發酵液根據實例1c.1)處理以得到粉末且根據實例1c.3)處理以得到微粒黏聚物。

實例6

使用棉阿舒囊黴將根據實例II.3a所獲得之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗(燒瓶1-4)。此外，平行使用類似於實例II.3所製備之小麥粉水解產物(燒瓶5-8)及黑麥粉水解產物(燒瓶9-12)。

6.1) 菌株

所用核黃素生產菌株為棉阿舒囊黴ATCC 10895 (s.a. Schmidt G等人，Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer Ashbya gossypii. Microbiology 142: 411-417, 1996)。

6.2) 接種物之製備

將細胞在無菌YMG瓊脂(組成：參見表16；在121℃下20分鐘)上劃線培養，且接著在28℃下培育72小時。

表16：YMG瓊脂板之組成

成分	濃度
D-葡萄糖	4.0 g/l
酵母萃	4.0 g/l
麥芽萃	10.0 g/l
瓊脂	30.0 g/l
pH	7.2

之後，將裝有兩塊擋板之250 ml錐形燒瓶中之50 ml預培養培養基(參見表17)在每種狀況中以一種環滿細胞接種，且在28℃下在增濕搖動器中搖動(180 rpm)下培育24小時。

表17：預培養培養基之組成

成分	濃度
細菌蛋白腖	10.0 g/l
酵母萃	1.0 g/l
肌醇	0.3 g/l
D-葡萄糖	10.0 g/l
pH*	7.0

*待經稀NaOH水溶液調節

將裝有兩塊擋板之250 ml錐形燒瓶中之50 ml主培養基(參見表18)在各種狀況中以5 ml預培養物接種。

6.3) 發酵液之製備

燒瓶培養基1至12之組成詳細列於表18中。

在對照培養基中，使用相應量之葡萄糖溶液而非粗粉水解產物。

表18：燒瓶培養基

	燒瓶序號		
	1-4	**5-8**	**9-12**
玉米 381.4 g/kg **	26.2 g/l ***		
小麥 342.0 g/kg **		29.2 g/l ***	
黑麥 303.0 g/kg **			33.0 g/l ***
細菌蛋白腖	10.0 g/l		
酵母萃	1.0 g/l		
肌醇	0.3 g/l		
pH*	7.0		

*待經稀NaOH水溶液調節
**水解產物中之葡萄糖濃度
***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，在28℃及在增濕搖動器中搖動(180 rpm)下將燒瓶培育6天。發酵終止後，維生素B_2含量藉由HPLC測定。結果收集於表19中。

表19

	微生物B_2
玉米	**2.73 g/l**
小麥	**2.15 g/l**
黑麥	**2.71 g/l**
對照物	**0.12 g/l**

將所得含維生素B_2發酵液根據實例1c.1)處理以得到粉末且根據實例1c.3)處理以得到顆粒黏聚物。

實例7

使用麩胺酸棒桿菌將根據實例II.3a所獲得之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗(燒瓶1-3)。此外，平行使用類似於實例II.3所製備之小麥粉水解產物(燒瓶4-6)及黑麥粉水解

產物(燒瓶7-9)。

7.1) 菌株

產生甲硫胺酸之棒狀桿菌屬菌株已為熟習該項技術者所知。該等菌株之生產例如描述於Kumar D. Gomes J. Biotechnology Advances, 23(1):41-61, 2005；Kumar D.等人，Process Biochemistry, 38:1165-1171, 2003；WO 04/024933及WO 02/18613中。

7.2) 接種物之製備

將細胞在無菌CM+Kan瓊脂(組成：參見表20；在121℃下20分鐘)上劃線培養且接著在30℃下培育24小時。之後，將細胞自平板刮離且再懸浮於生理鹽水中。在每種狀況中將250 ml裝有兩塊擋板之錐形燒瓶中之25 ml培養基(參見表5)以所得細胞懸浮液接種，用於接種之細胞懸浮液之量應使光學密度在610 nm達到0.5之OD_{610}值。

表20：CM+Kan瓊脂板之組成

濃度	成分
10.0 g/l	D-葡萄糖
2.5 g/l	NaCl
2.0 g/l	尿素
10.0 g/l	細菌蛋白腖(Difco)
5.0 g/l	酵母萃(Difco)
5.0 g/l	牛肉萃(Difco)
20 μg/ml	卡那黴素
25.0 g/l	瓊脂

7.3) 發酵液之製備

燒瓶培養基1至9之組成列於表21中。在對照培養基中，使用相應量之葡萄糖溶液而非粗粉水解產物。

表21：燒瓶培養基

	燒瓶序號		
	1-3	**4-6**	**7-9**
玉米　381.4 g/kg **	157.2 g/l ***		
小麥　342.0 g/kg **		175.6 g/l ***	
黑麥　303.0 g/kg **			198.0 g/l ***
$(NH_4)_2SO_4$	20 g/l		
尿素	5 g/l		
KH_2PO_4	0.113 g/l		
K_2HPO_4	0.138 g/l		
ACES	52 g/l		
MOPS	21 g/l		
檸檬酸×H_2O	0.49 g/l		
3,4-二羥基苯甲酸	3.08 mg/l		
NaCl	2.5 g/l		
KCl	1 g/l		
$MgSO_4$×7 H_2O	0.3 g/l		
$FeSO_4$×7 H_2O	25 mg/l		
$MnSO_4$×4-6 H_2O	5 mg/l		
$ZnCl_2$	10 mg/l		
$CaCl_2$	20 mg/l		
H_3BO_3	150 µg/l		
$CoCl_2$×6 H_2O	100 µg/l		
$CuCl_2$×2 H_2O	100 µg/l		
$NiSO_4$×6 H_2O	100 µg/l		
Na_2MoO_4×2 H_2O	25 µg/l		
生物素(Vit. H)	1050 µg/l		
硫胺×HCl(Vit B_1)	2100 µg/l		
菸鹼醯胺	2.5 mg/l		
泛酸	125 mg/l		
氰鈷胺(Vit B_{12})	1 µg/l		
4-胺基苯甲酸(PABA；Vit. H_1)	600 µg/l		
葉酸	1.1 µg/l		
吡哆醇(Vit. B_6)	30 µg/l		
核黃素(Vit. B_2)	90 µg/l		
CSL	40 ml/l		
卡那黴素(Kanamycin)	25 µg/ml		
pH*	6.85		

*待經稀NaOH水溶液調節

**水解產物中之葡萄糖濃度

***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，將燒瓶在30℃下及在增濕搖動器中搖動(200 rpm)下培育直至所有葡萄糖耗光為止。發酵終止後，甲硫胺酸含量藉由HPLC（管柱：Agilent ZORBAX Eclipse AAA；根據Eclipse AAA協定之方法，Technical Note 5980-1193)測定。結果收集於表22中。

表22

	燒瓶	甲硫胺酸[μmol/L]
玉米	1	9643.1
	2	9509.2
	3	9395.3
小麥	4	6839.9
	5	7133.9
	6	7028.9
黑麥	7	7894.7
	8	7526.5
	9	6998.9
對照物	10	1920.8
	11	1916.3

如實例1c.4)中所述處理所得含甲硫胺酸發酵液以得到粗粉。

實例8

使用細菌130Z將根據實例II.3a所獲得之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗。

8.1) 菌株

所用琥珀酸鹽生產菌株為細菌130Z (ATCC第55618號)。

8.2) 發酵液之製備

將120 ml血清燒瓶中之50 ml主培養基(參見表23)在每種狀況中以1 ml冷凍培養物接種。在將血清燒瓶密封之前，

將CO_2注入其中(0.7巴)。

培養基之組成列於表23中(參見US 5,504,004)。在對照培養基中，使用相應量之葡萄糖溶液而非粗粉水解產物(最終葡萄糖濃度：100 g/l)。

表23：培養基*

成分	濃度
玉米 381.4 g/kg **	262 g/l***
NaCl	0.1 g/l
K_2HPO_4	0.3 g/l
$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	20 mg/l
$CaCl_2 \times H_2O$	20 mg/l
$(NH_4)_2SO_4$	0.1 g/l
生物素	200 μg/l
CSL	15.0 g/l
10%酵母萃	15.0 g/l
$MgCO_3$	80.0 g/l

*以氣體處理且在CO_2/N_2氣氛下填充
**水解產物中之葡萄糖濃度
***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，在37℃下及在搖動器中搖動(160 rpm)下將血清燒瓶培育46小時。發酵終止後，葡萄糖及琥珀酸鹽含量藉由HPLC測定。測定藉助於得自Bio-Rad之Aminex HPX-87H管柱執行。結果收集於表24中。

表24

序號	葡萄糖[g/l]	琥珀酸鹽[g/l]
1	30.93	42.501
2	29.273	44.114
對照物	17.414	47.73

如實例1c.1)中所述處理所得含琥珀酸鹽發酵液以得到乾

粉。

實例9

使用大腸桿菌將根據實例II.3a所獲得之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗(燒瓶1-3)。此外，平行使用類似於實例II.3所製備之小麥粉水解產物(燒瓶4-6)及黑麥粉水解產物(燒瓶7-9)。

9.1) 菌株

產生L-蘇胺酸之大腸桿菌菌株已為熟習該項技術者所知。該等菌株之製備例如描述於EP 1013765 A1、EP 1016710 A2、US 5,538,873中。

9.2) 接種物之製備

將細胞在無菌LB瓊脂上劃線培養。若在所述菌株中存在適當的抗性基因作為標記，則將抗生素添加至LB瓊脂中。可用於此目的的物質例如為卡那黴素(40 μg/ml)或安比西林(100 mg/l)。在30℃下將菌株培育24小時。將細胞在補充有甲硫胺酸(50 μg/ml)、卡那黴素(40 μg/ml)及高絲胺酸(10 μg/l)之無菌M9葡萄糖最小培養基上劃線培養後，在30℃下將其培育24小時。之後，將細胞自平板刮離且再懸浮於生理鹽水中。在每種狀況中將250 ml裝有兩塊擋板之錐形燒瓶中之25 ml培養基(參見表25)以由此所製備之細胞懸浮液接種，用於接種之細胞懸浮液之量應使光學密度在610 nm達到0.5之OD_{610}值。

9.3) 發酵液之製備

燒瓶培養基1至9之組成列於表25中。在對照培養基中，

使用相應量之葡萄糖溶液而非粗粉水解產物。

表25：燒瓶培養基

	燒瓶序號		
	1-3	**4-6**	**7-9**
玉米 381.4 g/kg **	157.2 g/l ***		
小麥 342.0 g/kg **		175.6 g/l ***	
黑麥 303.0 g/kg **			198.0 g/l ***
$(NH_4)_2SO_4$	22 g/l		
K_2HPO_4	2 g/l		
NaCl	0.8 g/l		
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.8 g/l		
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	20 mg/l		
$MnSO_4 \times 5\ H_2O$	20 mg/l		
硫胺×HCl(Vit B_1)	200 mg/l		
酵母萃	1.0 g/l		
$CaCO_3$(經單獨滅菌)	30 g/l		
卡那黴素	50 mg/l		
安比西林	100 mg/l		
pH*	6.9 ± 0.2		

*待經稀NaOH水溶液調節

**水解產物中之葡萄糖濃度

***每公升培養基中經稱重之水解產物之量

接種後，將燒瓶在30℃下及在增濕搖動器中搖動(200 rpm)下培育直至所有葡萄糖耗光為止。發酵終止後，L-蘇胺酸含量藉由如Lindroth等人，Analytical Chemistry 51:1167-1174, 1979所述之逆相HPLC測定。

將所得含蘇胺酸發酵液根據實例1c.1)至1c.3)進一步處理以得到粉末、擠出物或黏聚物。

實例10

使用適當的菌株，類似於實例9之程序製備其他L-胺基

酸麩胺酸、組胺酸、脯胺酸及精胺酸。所述菌株例如描述於EP 1016710中。

將所得含胺基酸發酵液根據實例1c.1)至1c.3)進一步處理以得到乾燥產物。

實例11

使用黑麴黴將經部分糖化之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗。

11.1) 液化及(部分)糖化

類似於實例II.3a執行液化。將懸浮液冷卻至61℃且將pH調節至4.3之後，添加5.38 ml (等於1.5%重量比酶/乾物質)之Dextrozyme GA (Novozymes A/S)。在每種狀況中，在酶添加10分鐘、15分鐘、20分鐘、30分鐘、45分鐘及60分鐘後，取50 g試樣且將其懸浮於25 ml無菌、冰冷、完全去礦物質之水中。將試樣放置入冰浴中且立即用於燒瓶測試。未發生酶之失活。

11.2) 發酵

使用實例5.1)中所用的菌株。如實例5.2)中所述，製備接種物。

為製備發酵液，使用表29中所列之燒瓶培養基組成。將每一試樣以兩個燒瓶製備。

表29：燒瓶培養基

玉米	10 g/l ***
得自酪蛋白之蛋白腺	25.0 g/l
酵母萃	12.5 g/l
KH_2PO_4	1.0 g/l
K_2SO_4	2.0 g/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0.5 g/l
$ZnCl_2$	30 mg/l
$CaCl_2$	20 mg/l
$MnSO_4 \times 1\ H_2O$	9 mg/l
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	3 mg/l
青黴素	50000 IU/l
肺炎鏈球菌	50 mg/l
pH*	5.6

*待經稀硫酸調節

***每公升培養基中經稱重之部分糖化水解產物之量

接種後，在34℃下及在增濕搖動器中搖動(170 rpm)下將燒瓶培育6天。發酵終止後，藉助於檢定(如實例5.3中所述)測定植酸酶活性。結果收集於表30中。

表30

x分鐘後終止標準糖化程序	燒瓶	植酸酶活性[FTU/ml]
10	1	425
	2	387
15	3	312
	4	369
20	5	366
	6	316
30	7	343
	8	454
45	9	372
	10	358
60	11	298
	12	283

將所得含植酸酶發酵液根據實例1c.2)及1c.3)處理以得到擠出物或黏聚物。

實例12

使用麩胺酸棒桿菌將經部分糖化之玉米粉水解產物用於搖動燒瓶實驗。

12.1) 液化及(部分)糖化

以類似於實例II.3a之方式執行液化。將懸浮液冷卻至61℃且將pH調節至4.3之後，添加5.38 ml (等於1.5%重量比酶/乾物質) Dextrozyme GA (Novozymes A/S)。在每種狀況中，在酶添加10分鐘、15分鐘、20分鐘、30分鐘、45分鐘及60分鐘後，取50 g試樣且將其懸浮於25 ml無菌、冰冷、完全去礦物質之水中。將試樣放置入冰浴中且立即用於燒瓶測試。未發生酶之失活。

12.2) 發酵

使用實例3)中所用的菌株。如實例3.1)中所述製備接種物。

為製備發酵液，使用表31中所列之燒瓶培養基組成。將每一試樣以兩個燒瓶製備。

表31：燒瓶培養基

玉米	4.5 g/l ***
$(NH_4)_2SO_4$	20 g/l
尿素	5 g/l
KH_2PO_4	0.113 g/l
K_2HPO_4	0.138 g/l
ACES	52 g/l
MOPS	21 g/l
檸檬酸×H_2O	0.49 g/l
3,4-二羥基苯甲酸	3.08 mg/l
NaCl	2.5 g/l
KCl	1 g/l
$MgSO_4$×7 H_2O	0.3 g/l
$FeSO_4$×7 H_2O	25 mg/l
$MnSO_4$×4-6 H_2O	5 mg/l
$ZnCl_2$	10 mg/l
$CaCl_2$	20 mg/l
H_3BO_3	150 μg/l
$CoCl_2$×6 H_2O	100 μg/l
$CuCl_2$×2 H_2O	100 μg/l
$NiSO_4$×6 H_2O	100 μg/l
Na_2MoO_4×2 H_2O	25 μg/l
生物素(Vit. H)	1050 μg/l
硫胺×HCl(Vit B_1)	2100 μg/l
菸鹼醯胺	2.5 mg/l
泛酸	125 mg/l
氰鈷胺(Vit B_{12})	1 μg/l
4-胺基苯甲酸(PABA；Vit. H_1)	600 μg/l
葉酸	1.1 μg/l
吡哆醇(Vit. B_6)	30 μg/l
核黃素(Vit. B_2)	90 μg/l
CSL	40 ml/l
pH*	6.85

*待經稀NaOH水溶液調節

***每公升培養基中經稱重之部分糖化水解產物之量

接種後，在30℃及在增濕搖動器之搖動(200 rpm)下將燒

瓶培育48小時。發酵終止後，葡萄糖及離胺酸含量藉由HPLC測定。HPLC分析以Agilent 1100 Series LC System執行。葡萄糖藉助於得自Bio-Rad之Aminex HPX-87H管柱測定。胺基酸濃度藉助於在Agilent 1100 Series LC系統HPLC上之高壓液相層析測定。將柱預先經鄰苯二醛衍生化允許量化所形成之胺基酸，使用Hypersil AA管柱(Agilent)將胺基酸混合物分離。結果收集於表32中。

表32

x分鐘後終止標準糖化處理	燒瓶	離胺酸[g/l]
10	1	15.05
	2	11.71
	3	14.24
15	4	14.91
	5	15.27
	6	12.20
20	7	13.19
	8	13.65
	9	11.14
30	10	15.38
	11	12.45
	12	11.56
45	13	13.13
	14	14.64
	15	13.48
60	16	14.58
	17	13.72
	18	14.27

根據實例1c.1)或1c.4)處理所得含離胺酸發酵液以得到粉末或顆粒。

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種藉由以糖為基礎之微生物發酵作用生產至少一種非揮發性固態微生物代謝物之方法，該方法中使用具有以液體培養基總重量計之20%重量比以上單醣含量之含糖液體培養基培育生產所需代謝物的微生物菌株，且隨後大量地移除發酵液之揮發性成分，該含糖液體培養基藉由以下製備：

a1) 研磨選自穀粒之澱粉原料；及

a2) 在至少一種澱粉液化酶存在下在水性液體中液化研磨基料，繼之使用至少一種糖化酶糖化，其中對於液化目的而言，該研磨基料之至少一部分係藉由連續性地或批次性地添加至該水性液體中加以液化。

此外，本發明係關於一種可藉由本發明方法獲得之非揮發性微生物代謝物之固體調配物；及係關於該固體調配物作為添加劑或補充物用於人類或動物營養或用於處理紡織品、皮革、纖維素、紙或表面的用途。

六、英文發明摘要：

84 95132 PFW C12P

Fermentative production of nonvolatile microbial metabolites in solid form

The present invention relates to a method for the production of at least one nonvolatile microbial metabolite in solid form by sugar-based microbial fermentation, in which process a microorganism strain which produces the desired metabolites is grown using a sugar-containing liquid medium with a monosaccharide content of more than 20% by weight based on the total weight of the liquid medium, and the volatile constituents of the fermentation liquor are subsequently largely removed, the sugar-containing liquid medium being prepared by:

a1) milling selected starch feedstock from cereal grains; and

a2) liquifying the millbase in an aqueous liquid in the presence of at least one starch-liquefying enzyme, followed by saccharification using at least one saccharifying enzyme, where, for liquefaction purposes, at least a portion of the millbase is liquefied by continuous or batchwise addition to the aqueous liquid.

Furthermore, the invention relates to a solid formulation, of a nonvolatile microbial metabolite, obtainable by the method according to the invention; and to the use of such a solid formulation as additive or supplement for human or animal nutrition or for the treatment of textiles, leather, cellulose, paper or surfaces.

十、申請專利範圍：

1. 一種藉由以糖為基礎之微生物發酵作用生產至少一種非揮發性固態微生物代謝物之方法，其中該方法中生產所需代謝物之微生物菌株係使用具有以液體培養基總重量計之20%重量比以上單醣含量之含糖液體培養基培育，且隨後該發酵液之揮發性成分係經大量地移除，該含糖液體培養基之製備包含：

a1) 製備研磨基料，其係藉由研磨選自穀粒之澱粉原料；及

a2) 在至少一種澱粉液化酶存在下，在水性液體中液化該研磨基料，繼之使用至少一種糖化酶進行糖化作用；

其中，對於該液化目的而言，該研磨基料至少一部分在該液化期間係連續性地或批次性地添加至該水性液體中。

2. 如請求項1之方法，其包含

a) 如步驟a1)及a2)中所述，製備具有20%重量比以上之單醣含量之含糖液體培養基，其中該含糖液體培養基亦包含該澱粉原料之非澱粉固體成分；

b) 在發酵中使用該含糖液體培養基，以便生產該(等)非揮發性代謝物；及

c) 藉由移除該發酵液之至少某些揮發性成分，從該發酵液中獲得該(等)非揮發性固態代謝物及該澱粉原料之至少部分的非澱粉固體成分。

3. 如請求項2之方法，其中步驟a)中所製備之該含糖液體培養基包含至少20%重量比之該澱粉原料之該非澱粉固體成分。

4. 如前述請求項中任一項之方法，其中該研磨基料係在至少一種α-澱粉酶存在下在水性液體中液化，並隨後使用至少一種葡糖澱粉酶加以糖化。

5. 如請求項4之方法，其中該至少一種α-澱粉酶之部分係在步驟a2)之液化期間添加至該水性液體中。

6. 如前述請求項中任一項之方法，其中該穀物係選自玉米、黑麥、黑小麥及小麥穀粒。

7. 如前述請求項中任一項之方法，其中步驟a1)之研磨期間所獲得之該研磨基料包含至少50%重量比之粗粉顆粒，該等粗粉顆粒具有100微米以上之粒度。

8. 如前述請求項中任一項之方法，其中該研磨基料在步驟a2)中之液化及糖化作用係在使該液體培養基之黏度不超過20 Pas之方式進行。

9. 如前述請求項中任一項之方法，其中在該液化期間所添加之該研磨基料總量之至少25%重量比係在高於該研磨基料中所存在之澱粉之膠凝溫度的溫度下添加。

10. 如前述請求項中任一項之方法，其中具有30%重量比以上單醣含量之含糖液體培養基係經製備。

11. 如前述請求項中任一項之方法，其中至少一種植酸酶係在該發酵步驟之前添加至該含糖液體培養基中。

12. 如前述請求項中任一項之方法，其中該(等)所生產之非

揮發性代謝物係選自：有機單羧酸、二羧酸及三羧酸，其視情況具有附著於其之羥基且具有3至10個碳原子；蛋白型及非蛋白型胺基酸、嘌呤鹼基、嘧啶鹼基；核苷、核苷酸、脂質；飽和及不飽和脂肪酸；具有4至10個碳原子之二醇、具有3或3個以上羥基之更高官能度醇、具有至少4個碳原子之更長鏈醇、碳水化合物、芳族化合物、維生素、原維生素、輔因子、營養品、蛋白質、類胡蘿蔔素、具有3至10個碳原子之酮、內酯、生物聚合物及環糊精。

13. 如前述請求項中任一項之方法，其中該等所製備之非揮發性代謝物係選自酶、胺基酸、維生素、雙醣、具有3至10個碳原子之脂族單羧酸及二羧酸、具有3至10個碳原子之脂族羥基羧酸、具有3至10個碳原子之酮、具有4至10個碳原子之烷醇及具有3至10個碳原子之烷二醇。

14. 如前述請求項中任一項之方法，其中該等微生物係選自可生產至少一種以下代謝物之天然或重組微生物：酶、胺基酸、維生素、雙醣、具有3至10個碳原子之脂族單羧酸及二羧酸、具有3至10個碳原子之脂族羥基羧酸、具有3至10個碳原子之酮、具有4至10個碳原子之烷醇及具有3至10個碳原子之烷二醇。

15. 如請求項14之方法，其中該等微生物係選自：棒狀桿菌屬(Corynebacterium)、芽胞桿菌屬(Bacillus)、棉阿舒囊黴屬(Ashbya)、埃希氏菌屬(Escherichia)、麴黴屬(Aspergillus)、產鹼桿菌屬(Alcaligenes)、放線桿菌屬

(Actinobacillus)、厭氧螺菌屬(Anaerobiospirillum)、乳酸桿菌屬(Lactobacillus)、丙酸桿菌屬(Propionibacterium)、梭菌屬(Clostridium)及根黴屬(Rhizopus)，其中尤其為以下菌株：麩胺酸棒桿菌(Corynebacterium glutamicum)、枯草芽孢桿菌(Bacillus subtilis)、棉阿舒囊黴(Ashbya gossypii)、大腸桿菌(Escherichia coli)、黑麴黴(Aspergillus niger)、協腹產鹼桿菌(Alcaligenes latus)、產琥珀酸厭氧螺菌(Anaerobiospirillum succiniproducens)、琥珀酸放線桿菌(Actinobacillus succinogenes)、德氏乳酸桿菌(Lactobacillus delbrückii)、萊希曼氏乳桿菌(Lactobacillus leichmannii)、阿拉伯糖丙酸桿菌(Propionibacterium arabinosum)、Propionibacterium schermanii、費氏丙酸桿菌(Propionibacterium freudenreichii)、丙酸梭狀芽孢桿菌(Clostridium propionicum)、丙酮丁醇梭桿菌(Clostridium acetobutlicum)、Clostridium formicoaceticum、米根黴(Rhizopus oryzae)及少根根黴(Rhizopus arrhizus)。

16. 如前述請求項中任一項之方法，其中該發酵液中所存在之不超過30%重量比之固體係在移除該發酵液之揮發性成分之前移除。

17. 如前述請求項中任一項之方法，其中該發酵液之液相係經移除而未預先分離掉該發酵液之不溶性成分，且該代謝物與該發酵液之所有不溶性成分的全部一起獲得。

18. 如前述請求項中任一項之方法，其中該至少一種非揮發性代謝物係以固態型式與所有不溶性成分的全部一起從該發酵液中獲得，而未預先移除該發酵液之不溶性成分。

19. 如前述請求項中任一項之方法，其中該發酵液之揮發性成分自該發酵液移除，直至殘餘水分含量為以該等固體成分總乾重計之0.2至20%重量比，較佳地為1至15%重量比，及特佳地為5至10%重量比。

20. 如前述請求項中任一項之方法，其中該發酵液係經噴霧乾燥、流化床乾燥或冷凍乾燥，以移除該等揮發性成分。

21. 如請求項20之方法，其中一或多種乾燥佐劑係經使用。

22. 一種代謝物之固體調配物，其可藉由如請求項1至21中任一項之方法獲得。

23. 如請求項22之調配物，其包含：

A) >10至80%重量比之至少一種非揮發性代謝物；

B) 1至50%重量比之生物質量，其係來自生產該非揮發性代謝物之發酵作用；

C) 1至50%重量比之來自該發酵液之該澱粉原料之非澱粉固體成分；及

D) 以組份A、B及C之總重量計之0至400%重量比之習知調配佐劑；

A、B與C重量份總和為100%重量比。

24. 如請求項23之調配物，其包含以該調配物總重量計至少

5%重量比之膳食纖維。

25. 一種如請求項22至24中任一項之調配物之用途，其係用於人類或動物營養。

26. 一種如請求項22至24中任一項之調配物之用途，其係用於處理紡織品、皮革、纖維素、紙或表面。

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)