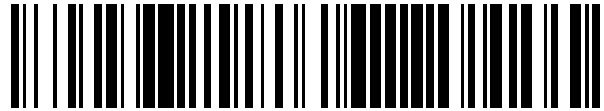


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 747**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10763723 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2488050**

54 Título: **Composición rica en metionina destinada a la alimentación animal**

30 Prioridad:

14.10.2009 FR 0957183

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2014

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRERES (100.0%)
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

FUERTES, PATRICK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 438 747 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición rica en metionina destinada a la alimentación animal

La presente invención se refiere a una nueva composición de metionina, líquida o cristalina, obtenida por biotransformación de biomasa por unos microorganismos apropiados para la producción de metionina.

5 La metionina, como otros aminoácidos azufrados, es indispensable para el metabolismo celular. Sin embargo, la metionina no es producida por los animales, que deben por lo tanto encontrarla en cantidades suficientes en su alimentación. Por lo tanto, la misma es producida de manera industrial para ser añadida como complementos alimenticios, en particular para la alimentación animal. La metionina puede también emplearse como medicamento en el tratamiento o la prevención de enfermedades diversas, como las alergias o las fiebres reumatoideas.

10 Las fuentes habituales de metionina son bien las proteínas de origen animal, o bien la síntesis química. Sin embargo, la disminución de la utilización de las proteínas animales tras el desarrollo de la ESB o de la gripe aviar ha conducido a un aumento de la demanda de metionina de síntesis.

15 La D,L-metionina se produce generalmente a partir de recursos fósiles y de derivados de la petroquímica, en particular a partir de acroleína, de metil-mercaptano y de cianuros. La obtención del enantiómero L más activo, necesita unas etapas suplementarias de resolución del racémico que aumentan drásticamente los costes de producción.

20 Hoy en día, la producción de metionina por biotransformación constituye una alternativa ventajosa a la petroquímica debido a la rarefacción de los recursos fósiles y al aumento del coste de las materias primas. La aplicación de estos procedimientos necesita sin embargo disponer de microorganismos apropiados para producir la metionina por biofermentación sobre una fuente de carbono.

Se han publicado las primeras soluciones eficaces industrialmente, y se describen en particular en las solicitudes de patente WO 2005/111202, WO 2007/017710, WO 2007/077041, WO 2007/135188 y WO 2009/043803. Otros microorganismos productores de la metionina se describen igualmente, en particular, en las solicitudes de patente WO 2004/038 013, WO 2006/001616, WO 2006/138689 y WO 2007/012078.

25 La producción a gran escala de metionina biosintética encuentra no obstante unos problemas propios de la recuperación de moléculas químicas en un fermentador, en particular para la purificación de los productos acabados. En este caso, la calidad de la mezcla bruta obtenida, el contenido de impurezas y su naturaleza revisten una gran importancia.

30 La presente invención se refiere por lo tanto a una nueva composición líquida de metionina, procedente de un proceso de fermentación, cuyo contenido en metionina y en otros constituyentes permite una purificación más fácil, en particular para la obtención de un producto sólido que comprende un contenido superior de metionina con respecto a los residuos secos de la composición líquida.

35 La composición de metionina procede de un proceso de fermentación, es decir de transformación de biomasa, en el que se cultiva un microorganismo modificado para producir la metionina sobre un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono. Las fuentes de carbono se seleccionan entre todas las fuentes de carbono susceptibles de ser metabolizadas por un microorganismo, y en particular la glucosa, la sacarosa, los mono- u oligosacáridos, el almidón y sus derivados, y sus mezclas.

40 Por lo tanto, la composición según la invención se distingue de las composiciones de metionina obtenidas por otros procedimientos, en particular químicos, por el contenido en isótopos de carbono de las moléculas de metionina que son específicos de los productos de fermentación por oposición a los productos procedentes de materias primas fósiles. La composición según la invención puede también diferenciarse de las composiciones de metionina obtenidas por otros procedimientos por la naturaleza y/o el contenido de las impurezas presentes.

45 La composición según la invención es una composición de metionina procedente de un proceso de fermentación que comprende del 50 al 95% en peso de metionina y que comprende menos del 10% en peso de isoleucina. De manera preferida, la composición comprende del 60 al 95% en peso de metionina.

Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes son dados aquí en peso de los residuos secos de la composición, ya se trate de una composición líquida o sólida.

50 Más particularmente, la composición según la invención es un aditivo alimenticio que comprende, incluso que consiste en, una composición de metionina procedente de un proceso de fermentación, en particular tal como se define en la presente descripción.

Según uno de sus aspectos, la presente invención tiene por objeto un aditivo alimenticio para la alimentación animal que comprende, incluso que consiste en, una composición de metionina procedente de un proceso de fermentación que comprende:

- del 60 al 95%, en particular del 70 al 95%, en peso de metionina,
- del 0,05 al 2,5%, en particular del 0,1 al 2%, particularmente del 0,3 al 2%, en peso de N-acetil-metionina, y
- del 0,05 al 3,5%, en particular del 0,2 al 3%, particularmente del 0,3 al 3% en peso de isoleucina.

5 Muy particularmente, el aditivo alimenticio puede comprender, incluso consistir, en una composición que comprende además:

- del 1,0 al 6,0% en peso, en particular del 2,0 al 5,0% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina.
- del 0,1 al 2% en peso, en particular del 0,2 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y
- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,1 al 2% en peso, particularmente del 0,2 al 1,5% en peso de lípidos.

10 La composición o el aditivo según la invención puede ser una composición líquida, acuosa, y en este caso se trata más particularmente de la composición obtenida al final de la fermentación, después de la eliminación de la biomasa y de una parte de las impurezas orgánicas. Se la designará como una composición "en bruto".

15 Según una variante, cuando la composición, o el aditivo, es líquida, esta se presenta en forma de solución, en particular clara. Esta composición, o aditivo, en forma líquida puede estar desprovista de metionina en forma sólida y en particular cristalizada.

La composición, o el aditivo, en forma líquida puede por otra parte presentarse en forma de dispersión.

Muy particularmente, el contenido de metionina de esta composición, o aditivo, en forma líquida es menor o igual que 8 g/100 ml, en particular que 4,8 g/100 ml, particularmente que 4,5 g/100 ml, incluso que 4 g/100 ml de composición líquida.

20 De manera ventajosa, la composición, o el aditivo, líquido según la invención comprende del 60 al 85% en peso de metionina, más particularmente entre el 70 y el 85%.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en metionina que va del 60 al 80% en peso, en particular del 65 al 75% en peso.

25 La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en N-acetil-metionina que va del 0,5 al 2,0% en peso, en particular del 0,75 al 1,75% en peso.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en isoleucina que va del 0,20 al 1,5% en peso, en particular del 0,3 al 1,0% en peso.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en aminoácidos diferentes de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina, que va del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso.

30 La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en azúcares totales que va del 0,5 al 2% en peso, en particular del 0,75 al 1,5% en peso.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en lípidos que va del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 1,5% en peso.

35 Así, según un primer modo de realización, el aditivo alimenticio en forma líquida comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- del 60 al 80% en peso, en particular del 65 al 75% en peso de metionina,
- del 0,5 al 2,0% en peso, en particular del 0,75 al 1,75% en peso de N-acetil-metionina, y
- del 0,20 al 1,5% en peso, en particular del 0,3 al 1,0% en peso de isoleucina.

40 Aún más particularmente, el aditivo alimenticio en forma líquida comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,
- del 0,5 al 2% en peso, en particular del 0,75 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y
- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 1,5% en peso de lípidos.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en metionina que va del 70 al 90% en peso, en particular del 75 al 85% en peso.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en N-acetil-metionina que va del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso.

5 La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en isoleucina que va del 0,1 al 1,0% en peso, en particular del 0,3 al 0,75% en peso.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina que va del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso.

10 La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en azúcares totales que va del 0,25 al 2% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso.

La composición, o el aditivo, líquido puede comprender un contenido en lípidos que va del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso.

Así, según un segundo modo de realización, el aditivo alimenticio en forma líquida comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- 15
- del 70 al 90% en peso, en particular del 75 al 85% en peso, de metionina,
 - del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso, de N-acetil-metionina, y
 - del 0,1 al 1,0% en peso, en particular del 0,3 al 0,75%, en peso de isoleucina.

Aún más particularmente, el aditivo alimenticio en forma líquida comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- 20
- del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,
 - del 0,25 al 2% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y
 - del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,05 al 2,0% en peso, de lípidos.

25 La composición según la invención puede presentarse en forma sólida. Esta composición es más particularmente el producto de cristalización de la metionina contenida en la composición líquida definida anteriormente, después de un tratamiento de purificación.

De manera ventajosa, la composición sólida según la invención comprende entre el 75 y el 95% en peso de metionina, más particularmente entre el 85 y el 95%.

Por otra parte, el aditivo alimenticio puede presentarse en forma sólida.

30 La composición, o el aditivo sólido puede comprender un contenido en metionina que va del 80 al 95% en peso, en particular del 85 al 95% en peso.

La composición, o el aditivo sólido puede comprender un contenido en N-acetil-metionina que va del 0,05 al 0,5% en peso, en particular del 0,05 al 0,3% en peso.

35 La composición, o el aditivo sólido puede comprender un contenido en isoleucina que va del 0,05 al 5,0% en peso, en particular del 0,1 al 3,0% en peso.

La composición, o el aditivo sólido puede comprender un contenido en aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina que va del 1,0 al 5,0% en peso, en particular del 1,5 al 4,0% en peso.

La composición, o el aditivo sólido puede comprender un contenido en azúcares totales que va del 0,1 al 1,5% en peso, en particular del 0,2 al 1,0% en peso.

40 La composición, o el aditivo sólido puede comprender un contenido en lípidos menor o igual que el 0,3% en peso.

Según un tercer modo de realización, el aditivo alimenticio, en particular sólido, comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- 45
- del 80 al 95% en peso, en particular del 85 al 95% en peso, de metionina,
 - del 0,05 al 0,5% en peso, en particular del 0,05 al 0,3% en peso, de N-acetil-metionina, y
 - del 0,1 al 5,0% en peso, en particular del 0,1 al 3,0% en peso, de isoleucina.

Aún más particularmente, el aditivo alimenticio en forma líquida comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- del 1,0 al 5,0% en peso, en particular del 1,5 al 4,0% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,

- 5 - del 0,1 al 1,5% en peso, en particular del 0,2 al 1,0% en peso, de azúcares totales, y
- menos del 0,3% en peso de lípidos.

La composición según la invención, procedente de un proceso de fermentación, comprende ventajosamente menos del 10% de isoleucina, más particularmente menos del 5% en peso.

- 10 La composición según la invención es una composición que comprende generalmente otros residuos procedentes del proceso de bioproducción de metionina y en particular otros aminoácidos. El contenido en aminoácidos distintos de la metionina e isoleucina, es ventajosamente menor que el 10% en peso. Numerosos aminoácidos están presentes como residuos en la composición según la invención y el contenido de cada aminoácido distinto de la metionina y la isoleucina tomados individualmente es ventajosamente inferior al 2%, más ventajosamente inferior al 1% en peso.

- 15 La composición según la invención comprende ventajosamente menos del 0,2% de cenizas, y en particular del 0,01 al 0,2% de cenizas.

El contenido en N-acetil-metionina está ventajosamente comprendido entre el 0 y el 2% en peso. Dependerá en particular del carácter líquido o sólido de la composición en bruto. Su contenido ese acerca a 0 en la composición sólida.

- 20 La composición según la invención comprende también y ventajosamente menos del 2% en peso de lípidos y menos del 2% en peso de azúcares, ventajosamente menos del 1% en peso.

El procedimiento de obtención de las composiciones está constituido de varias etapas:

A) clarificar el medio de fermentación y eliminar las impurezas orgánicas insolubles y solubles de dicho medio de fermentación para la obtención de una composición líquida en bruto,

- 25 Llegado el caso

B) desmineralizar la solución líquida en bruto a fin de eliminar los cationes y aniones de dicho medio de fermentación, para la obtención de una composición líquida en bruto desmineralizada, y garantizar la obtención de una metionina sólida con un perfil higroscópico próximo al de la metionina química,

Llegado el caso

- 30 C) cristalizar la metionina en bruto a partir de la solución líquida desmineralizada, y

D) separación, eventualmente lavado y secado, y eventualmente trituración de los cristales de metionina para la obtención de una composición sólida en bruto.

Se entiende que una composición que comprende metionina cristalizada en una solución de metionina forma parte igualmente de la invención.

- 35 En el sentido de la invención, se entiende por "impurezas orgánicas insolubles" la biomasa, las proteínas y las partículas insolubles residuales.

Por "impurezas orgánicas solubles" se entienden todas las partículas solubles que contaminan el medio de fermentación, en particular las macromoléculas de tipo proteínas solubles y polisacáridos.

- 40 La primera etapa del procedimiento consiste en clarificar el medio de fermentación y eliminar las impurezas orgánicas. La clarificación del medio se realiza mediante cualquier método conocido como tal por el experto en la materia, método seleccionado por ejemplo del grupo constituido por la floculación, la decantación, las técnicas membranarias (microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa) y la centrifugación. La eliminación de las impurezas orgánicas solubles se realiza mediante cualquier método conocido como tal por el experto en la materia, método seleccionado por ejemplo del grupo constituido por la ultrafiltración, el tratamiento térmico, el
45 tratamiento con ayuda de un adsorbente de tipo carbón activo y por la hidrólisis enzimática. La eliminación de estas impurezas solubles permite garantizar el buen comportamiento de la masa cocida durante la cristalización. En efecto, sin esta etapa, la masa cocida tiene un aspecto homogéneo pastoso, que genera unos cristales muy finos y que penaliza su separación así como su lavado. Como consecuencia, la pureza de los cristales disminuye.

- 50 La segunda etapa consiste en eliminar las sales minerales de la solución así obtenida. Esta etapa puede ser realizada por electrodiálisis convencional (EURODIA®) y/o por tratamiento sobre resina intercambiadora de cationes

en forma H⁺ (PUROLITE® C120, PUROLITE® C150, PUROLITE® C160, etc.) y/o resina intercambiadora de aniones (LEWATIT® S4228, LEWATIT® S4528, Rohm & Haas FPA91, etc.). El tratamiento con resinas intercambiadoras de iones se prefiere a la EDC por razones de coste y de eficacia de disminución de las sales. Esta etapa permite, entre otros, reducir el contenido en sales en la metionina sólida y asegurar así una recogida de agua mínima para una buena estabilidad al almacenamiento.

La tercera etapa consiste en cristalizar la metionina a fin de recuperar la metionina en bruto en forma sólida. Esta etapa de cristalización se puede realizar mediante una tecnología seleccionada del grupo constituido de la cristalización por enfriamiento, de la cristalización por evapocristalización y de la cristalización adiabática. La compañía solicitante recomienda utilizar la evapocristalización. Si se elige la evapocristalización, la compañía solicitante recomienda pre-concentrar la solución de metionina en bruto por evaporación a vacío con la ayuda de un evaporador de película descendente a fin de aproximarse a la sobresaturación. La solución preconcentrada se transfiere entonces a un cristizador de tipo Draft tube, por ejemplo, para ser concentrada aún más y cristalizar. La solubilidad de la metionina a 35°C es de aproximadamente 70 g/l. Concentrando la solución a aproximadamente 250 g/l, a un vacío que asegure una temperatura de 35°C, el rendimiento de recuperación en metionina es > 70%. En estas condiciones, y gracias a la eliminación de las impurezas solubles, la metionina sólida se cristaliza en forma de esferas esponjosas, fáciles de separar de las aguas madres.

La cuarta etapa consiste en separar la metionina sólida en bruto así obtenida, lavarla y secarla. La recuperación de la metionina sólida en bruto se realiza mediante cualquier método conocido como tal por el experto en la materia, método seleccionado por ejemplo en el grupo constituido por la centrifugación, el escurrido y por la filtración frontal (en tambor, en filtro prensa, etc.). En este último caso, la metionina en bruto está entonces retenida sobre una tela de 40 µm, y las aguas madres pasan a través. La pasta de metionina en bruto se lava después con 1 a 10 BV de agua, preferentemente desmineralizada. La metionina sólida en bruto se seca después y eventualmente se tritura para clasificar las partículas.

La composición en bruto, líquida y sólida, obtenida se describe en la tabla 1 siguiente:

Tabla 1

G / 100g de residuo seco	Composición líquida en bruto	Composición sólida en bruto
L-Metionina (L-MET)	50 - 85	75 - 95
N-acetil-metionina (NAM)	< 2	< 1
Isoleucina (ISO)	< 10	< 10
Derivados de AA desconocido	< 2	< 2
Valina	< 2	< 2
Fenilalanina	< 2	< 2
Leucina	< 2	< 2
Ácido aspártico	< 2	< 2
Treonina	< 2	< 2
Alanina	< 2	< 2
Lisina	< 2	< 2
Arginina	< 2	< 2
Cistina	< 2	< 2
Glutamina	< 2	< 2
Tirosina	< 2	< 2
Ácido glutámico	< 2	< 2
Glicina	< 2	< 2
Citrulina	< 2	< 2

Total de AA fuera de L-MET, NAM y ISO	< 10	< 10
Azúcares totales	< 5	< 2
Lípidos	< 2	< 2
Ácidos orgánicos	< 3	< 2
Tiosulfatos	<7	< 1
Sulfatos	< 1,5	< 2
Fosfatos	< 0,2	< 1
Cloruros	< 0,2	< 0,5
Amonio	< 3	< 1,5
Sodio	< 1	< 0,01
Potasio	< 1	< 0,05
Magnesio	< 0,2	< 0,01
Calcio	< 0,1	< 0,01
Otros	< 10	< 5

La línea "derivados de AA desconocido" corresponde a unas especies próximas a los AA y en curso de identificación.

La línea "otros" corresponde a unas especies no identificadas hoy día.

5 La composición en bruto según la invención puede ventajosamente emplearse directamente, en forma sólida o líquida, en la alimentación animal, como complemento o aditivo alimenticio proporcionado a los animales, mezclado en el bolo alimenticio proporcionado a cada animal, en premezcla, en forma de una composición premezclada o de manera extemporánea, o de manera independiente de los otros alimentos.

10 La invención se refiere por lo tanto también a un aditivo alimenticio que comprende la composición de metionina según la invención.

15 Según también otro de sus aspectos, la invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio para la alimentación animal, en particular tal como se ha definido anteriormente, que comprende, incluso que consiste, al menos la etapa siguiente que consiste, a partir de un medio de fermentación de un procedimiento de preparación de metionina en el que se cultiva un microorganismo modificado para producir la metionina en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, en:

A) clarificar el medio de fermentación y eliminar las impurezas orgánicas insolubles y solubles de dicho medio de fermentación para la obtención de una composición líquida en bruto que comprende:

- del 60 al 80% en peso, en particular del 65 al 75% en peso, de metionina,

- del 0,5 al 2,0% en peso, en particular del 0,75 al 1,75% en peso, de N-acetil-metionina, y

20 - del 0,20 al 1,5% en peso, en particular del 0,3 al 1,0%, en peso, de isoleucina, y

E) recuperar el aditivo alimenticio.

El procedimiento de preparación puede conducir a una composición líquida en bruto que comprende además:

- del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina

25 - del 0,5 al 2% en peso, en particular del 0,75 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y

- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 1,5% en peso, de lípidos.

El procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio puede comprender además una etapa que consiste en:

B) desmineralizar la solución líquida en bruto a fin de eliminar los cationes y aniones de dicho medio de fermentación, en particular para la obtención de una composición líquida en bruto desmineralizada que comprende:

- del 70 al 90% en peso, en particular del 75 al 85% en peso, de metionina,
- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso, de N-acetil-metionina, y
- 5 - del 0,1 al 1,0% en peso, en particular del 0,3 al 0,75%, en peso de isoleucina.

El procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio puede permitir la obtención de una composición líquida en bruto desmineralizada que comprende además:

- del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina

- 10 - del 0,25 al 2% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y
- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso, de lípidos.

Más particularmente, el procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio permite obtener un aditivo alimenticio líquido, y en particular dicho procedimiento no comprende la etapa de cristalización.

El procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio puede comprender además la etapa que consiste en:

- 15 C) cristalizar la metionina sólida en bruto a partir de la composición líquida en bruto, eventualmente desmineralizada.

El procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio puede también comprender la etapa que consiste en:

D) separar, eventualmente lavar, y eventualmente triturar unos cristales de metionina para la obtención de una composición sólida en bruto.

- 20 Finalmente, el procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio puede permitir obtener una composición sólida en bruto que comprende:

- del 80 al 95% en peso, en particular del 85 al 95% en peso, de metionina,
- del 0,05 al 0,5% en peso, en particular del 0,05 al 0,3% en peso, de N-acetil-metionina, y
- del 0,05 al 5,0% en peso, en particular del 0,1 al 3,0%, en peso de isoleucina.

- 25 El procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio puede permitir que la composición de metionina sólida en bruto o la composición sólida en bruto comprenda además:

- del 1,0 al 5,0% en peso, en particular del 1,5 al 4,0% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,
- del 0,1 al 1,5% en peso, en particular del 0,2 al 1,0% en peso, de azúcares totales, y
- menos del 0,3% en peso de lípidos.

- 30 Por otra parte, la invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de un alimento complementado con metionina que comprende al menos una etapa de adición de una composición o de un aditivo alimenticio según la invención.

- 35 Según una variante, esta adición se efectúa mediante la adición de una composición o de un aditivo en forma líquida sobre un alimento sólido. Esto puede efectuarse en particular de manera extemporánea. La adición puede así efectuarse mediante una simple pulverización de la composición o del aditivo.

Según otra variante, esta adición se efectúa por adición de una composición o de un aditivo en forma líquida a un alimento líquido, como el agua de bebida. Esto puede también efectuarse de manera extemporánea.

- 40 Según también otro de sus aspectos, la invención tiene por objeto la utilización de una composición tal como se ha definido anteriormente para la preparación de un aditivo alimenticio y/o de un alimento complementado con metionina.

- 45 El experto en la materia conoce bien las cantidades de metionina necesarias para la alimentación animal en un régimen alimenticio apropiado para cada animal y sabrá determinar como emplear la composición según la invención y en qué cantidad. En particular, la forma líquida en bruto es particularmente adecuada para su aporte en oligoelementos y en agua para facilitar la dosificación, la mezcla y la hidratación de los alimentos habituales del animal.

La composición de metionina en bruto según la invención puede proceder de cualquier procedimiento de bioproducción de metionina con un cultivo de un microorganismo optimizado para favorecer la síntesis de metionina, ya se trate de una bacteria, de levaduras o de hongos (mohos). Ventajosamente, el microorganismo se selecciona entre las *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomyetaceae* y *Corynebacteriaceae*. Más particularmente, el microorganismo es una especie seleccionada entre las especies *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Salmonella* o *Corynebacterium*. Más particularmente, el microorganismo se selecciona entre las especies *Escherichia coli* o *Corynebacterium glutamicum*.

En un modo particular de realización de la invención, la composición de metionina en bruto según la invención proviene del cultivo de los microorganismos descritos en la solicitud internacional WO 2009/043803, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia, y más particularmente los microorganismos descritos en los ejemplos de realización.

La invención se ilustra más particularmente en el ejemplo de realización expuesto a continuación.

Una cepa de *E. coli* productora de metionina de genotipo MG 1655 metA* 11 Ptrc-metH PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP Ptrc36-ARNmst17-metF Δ metJ Δ pykF Δ pykA Δ purU (pME 101- thrA*1- cysE- PgapA-metA*11) (pCC1BAC- serB- serA- serC), descrita en la solicitud internacional WO 2009/043803, se cultiva en condiciones de cultivo de fermentación según el método descrito en esta misma solicitud internacional.

Ejemplo 1: Preparación de metionina en bruto

Un mosto de fermentación procedente de la utilización de la cepa anteriormente descrita y que contiene la L-metionina se purifica de la siguiente manera.

A) Eliminación de las impurezas orgánicas insolubles: la biomasa

La eliminación se realiza por filtración tangencial sobre membrana que presenta un diámetro de poro de 100 nm, entre 40 y 80°C (membrana de tipo cerámico de 3,5 mm de diámetro de canal).

La temperatura se mantiene preferiblemente a 40°C con una presión transmembranaria de 1 bar y una diafiltración con el 20% de agua desmineralizada.

En estas condiciones, el flujo medio es de 30 L/h/m² y el permeado obtenido es límpido y brillante. El permeado, liberado de la biomasa y de las partículas insolubles, contiene además unas impurezas orgánicas solubles, en particular unos azúcares y proteínas solubles que conviene eliminar antes de la cristalización.

B) Eliminación de las impurezas orgánicas solubles: los azúcares y macromoléculas solubles

Esta etapa tiene por objetivo eliminar los azúcares (polisacáridos) y las macromoléculas contenidas en el mosto de fermentación. En efecto, estas impurezas afectan negativamente al comportamiento de la masa cocida (aspecto ligado, homogéneo, cristales muy finos) y la recuperación de la fase sólida durante la etapa de cristalización de la L-metionina.

Esta eliminación se puede realizar por ultrafiltración sobre membrana cerámica que presenta un umbral de corte de 5 kDa. A 40°C, el flujo de filtración es de media de 25 l/h/m² y aproximadamente el 70% de las macromoléculas están retenidas en el producto retenido.

El permeado, que corresponde a la composición líquida en bruto, tiene la composición siguiente:

Tabla 2

g/100 g de residuo seco	Composición líquida en bruto
L-Metionina (L-MET)	72,6
N-acetil-metionina (NAM)	1,36
Isoleucina (ISO)	0,50
Derivado de AA desconocido	1,2
Valina	0,61
Fenilalanina	0,58
Leucina	0,18
Ácido aspártico	0,25

Treonina	0,26
Alanina	0,39
Lisina	0,10
Arginina	0,04
Cistina	0,02
Glutamina	0,17
Tirosina	0,28
Ácido glutámico	0,17
Glicina	0,10
Citrulina	0,15
AA fuera de MET, NAM y ISO	3,99
Azúcares totales	0,89
Lípidos	1,05
Ácidos orgánicos	< 3
Tiosulfatos	4,72
Sulfatos	1,04
Fosfatos	0,09
Cloruros	0,10
Amonio	2,26
Sodio	0,58
Potasio	0,42
Magnesio	0,10
Calcio	0,02
Otros	8,47

Este permeado se desmineraliza entonces antes de ser cristalizado para conducir a la composición sólida en bruto.

C) Desmineralización del permeado:

5 Esta etapa de desmineralización tiene como objetivo eliminar los aniones y los cationes minerales presentes en el mosto de fermentación que contiene la L-metionina.

La misma se puede impulsar por electrodiálisis convencional y/o tratamiento sobre resina intercambiadora de catión fuerte y sobre resina intercambiadora de anión.

10 Cuando el tratamiento se realiza sobre resinas intercambiadoras de iones, el porcentaje de desmineralización es superior al alcanzado por electrodiálisis convencional. Así, con una resina intercambiadora de cationes fuerte (de tipo PUROLITE[®] C120, C150), es posible eliminar más del 85% de los cationes garantizando al mismo tiempo un rendimiento en metionina > 95%, por dimensionamiento correcto del volumen de resina. En efecto, al ser la metionina anfótera, esta se fijará igualmente sobre la resina, pero la afinidad de los cationes para la resina es más importante que la de la metionina: existe entonces desplazamiento de la metionina por los cationes.

15 Por el mismo mecanismo de afinidad, el permeado tratado sobre resina intercambiadora de aniones (de tipo Rohm & Haas FPA91, Bayer 4228, etc.) ve disminuir su cantidad en aniones en más del 95% con un rendimiento en metionina > 80%.

Después del tratamiento de desmineralización, la solución tiene la composición siguiente:

Tabla 3

Compuestos	Cantidad (%/seco)
L-metionina (MET)	79,38
N-Acétyl-Méthionne (NAM)	1,49
Isoleucina (ISO)	0,54
AA fuera de MET, NAM e ISO	4,36
Azúcares totales	0,77
Lípidos	1,18
Ácido succínico	1,10
Ácido cítrico	0,16
Tiosulfato	0,23
Sulfato	0,12
Fosfato	0,05
Cloruro	0,10
NH ₄	0,25
Na	0,08
K	0,11
Mg	0,10
Ca	0,02
Fe	0,01
otros	9,55

Esta solución se concentra después a fin de cristalizar la L-metionina.

5 D) Cristalización

La solución desmineralizada se pre-concentra por evaporación del agua a 50°C sobre un evaporador a vacío con película descendente de tipo WIEGAND®. El factor de concentración es del orden de 2 a 5 según la concentración inicial en L-metionina.

Es aquí igual a 3 para aproximarse a la sobresaturación a 50°C (80 g/l).

- 10 La solución preconcentrada se transfiere entonces a un evapocristalizador de circulación forzada para concentrarse aún más y cristalizar a vacío (50 mBares) a aproximadamente 35°C. El factor de concentración aplicado en este evapocristalizador es de aproximadamente 3, para alcanzar 240 g/l.

Después de la separación en filtro prensa CHOQUENET® y lavado con un volumen de agua desmineralizada por volumen de pasta, los cristales se secan sobre un lecho fluidizado a 45°C (de tipo AEROMATIC®).

- 15 En estas condiciones, el rendimiento de recuperación de L-metionina es > 80% para una pureza > 85%/seca.

La composición de la L-metionina sólida en bruto se presenta en la tabla siguiente:

Tabla 4

g/100 g de residuo seco	Composición sólida en bruto
L-Metionina (L-MET)	89,49
N-acetil-metionina (NAM)	0,13
Isoleucina (ISO)	2,41
Derivado de AA desconocido	0,50
Valina	0,69
Fenilalanina	0,44
Leucina	0,20
Ácido aspártico	0,09
Treonina	0,19
Alanina	0,15
Lisina	0,05
Arginina	0,04
Cistina	0,02
Glutamina	0,13
Tirosina	0,44
Ácido glutámico	0,19
Glicina	0,18
Citrulina	0,61
Total AA fuera de L-MET, NAM e ISO	2,37
Azúcares totales	0,31
Lípidos	< 1
Ácidos orgánicos	< 1
Tiosulfatos	0,02
Sulfatos	0,02
Fosfatos	0,05
Cloruros	0,01
Amonio	0,04
Sodio	0,01
Potasio	0,03
Magnesio	< 0,01
Calcio	< 0,01
Otros	3,95

El licor madre contiene todavía cerca del 40%/seco de metionina. Para optimizar el rendimiento global, es posible reciclar el licor madre aguas arriba del Process, en su totalidad o en parte, en forma líquida o después de un segundo chorro de cristalización, antes o después de un tratamiento apropiado.

5 La metionina sólida en bruto obtenida a partir del procedimiento descrito en el ejemplo según la invención tiene una estabilidad higroscópica comparable a la de la metionina química.

Ejemplo 2: Alimentación de los animales

La metionina en bruto obtenida anteriormente en forma sólida se añade a un alimento de base para pollos de engorde.

El alimento de base tiene la composición siguiente:

10

Tabla 5

	%
Trigo	61,93
Semilla de soja cocida	16,20
Aceite de palma	0,50
Tortas de soja	18,40
Fosfato bicálcico	0,94
Harina de Carbonato	0,86
Sal	0,24
Bicarbonato de sosa	0,20
Lisina al 50% líquida	0,20
Clor. Colina al 75%	0,06
Prem. Treonina 25	0,03
Prem. Fitasa	0,04
Premezcla aves de corral	0,40

15

Este alimento se suplementa con metionina en bruto para obtener unas composiciones que comprenden diferentes contenidos en metionina en bruto, con 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2% y 0,25% de metionina añadida (que corresponden respectivamente a aproximadamente el 0,063%, 0,125%, 0,188%, 0,250% y 0,313% de metionina sólida en bruto añadida al alimento).

Los animales se reparten en grupos y se nutren con el alimento de base como control, o con un alimento suplementado con metionina en bruto según la invención, y después se pesan con 1, 14 y 28 días.

20

Se constata una clara mejora de los rendimientos para los alimentos suplementados con la metionina según la invención. Un óptimo de eficacia se identifica hacia aproximadamente el 0,4% de metionina en el alimento final, es decir del 0,1 a aproximadamente el 0,15% de metionina añadida (el alimento de base tiene un contenido en metonina del orden del 0,29%).

Efectuando el mismo experimento con la DL-metionina de origen químico, se observa un óptimo hacia aproximadamente el 0,48% de metionina en el alimento final, es decir aproximadamente el 0,19% de metionina añadida.

25

La metionina en bruto según la invención parece por lo tanto mejor utilizada por el animal que la DL-metionina de origen químico.

REIVINDICACIONES

1. Aditivo alimenticio para la alimentación animal que comprende, incluso que consiste en, una composición de metionina procedente de un proceso de fermentación que comprende:

- del 60 al 95%, en particular del 70 al 95%, en peso de metionina,
- 5 - del 0,05 al 2,5%, en particular del 0,1 al 2%, en peso de N-acetil-metionina, y
- del 0,05 al 3,5%, en particular del 0,2 al 3%, en peso de isoleucina.

2. Aditivo alimenticio según la reivindicación 1, caracterizado por que la composición de metionina comprende además:

- 10 - del 1,0 al 6,0% en peso, en particular del 2,0 al 5,0% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,
- del 0,1 al 2% en peso, en particular del 0,2 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y
- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,1 al 2% en peso, de lípidos.

3. Aditivo alimenticio según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que se presenta en forma líquida.

4. Aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- del 60 al 80% en peso, en particular del 65 al 75 % en peso, de metionina,
- del 0,5 al 2,0 % en peso, en particular del 0,75 al 1,75% en peso, de N-acetil-metionina, y
- del 0,20 al 1,5% en peso, en particular del 0,3 al 1,0%, en peso, de isoleucina.

5. Aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- 20 - del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,
- del 0,5 al 2% en peso, en particular del 0,75 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y
- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,75 al 1,5% en peso, de lípidos.

6. Aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- 25 - del 70 al 90% en peso, en particular del 75 al 85% en peso, de metionina,
- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso, de N-acetil-metionina, y
- del 0,10 al 1,0% en peso, en particular del 0,3 al 0,75%, en peso de isoleucina.

7. Aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6, caracterizado por que comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- 30 - del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,
- del 0,25 al 2% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y
- 35 - del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso, de lípidos.

8. Aditivo alimenticio según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por que se presenta en forma sólida.

9. Aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 8, caracterizado por que comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- 40 - del 80 al 95% en peso, en particular del 85 al 95% en peso, de metionina,
- del 0,05 al 0,5% en peso, en particular del 0,05 al 0,3% en peso, de N-acetil-metionina, y
- del 0,05 al 5,0% en peso, en particular del 0,1 al 3,0%, en peso de isoleucina.

10. Aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 8 y 9, caracterizado por que comprende, incluso consiste en, una composición que comprende:

- del 1,0 al 5,0% en peso, en particular del 1,5 al 4,0% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,

5 - del 0,1 al 1,5% en peso, en particular del 0,2 al 1,0% en peso, de azúcares totales, y

- menos del 0,3% en peso de lípidos.

11. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio para la alimentación animal, en particular tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que comprende, incluso consiste en, al menos la etapa siguiente que consiste, a partir de un medio de fermentación de un procedimiento de preparación de metionina en el que se cultiva un microorganismo modificado para producir la metionina en un medio de cultivo apropiado que comprende una fuente de carbono, en:

10

A) clarificar el medio de fermentación y eliminar las impurezas orgánicas insolubles y solubles de dicho medio de fermentación, en particular para la obtención de una composición líquida en bruto que comprende,

- del 60 al 80% en peso, en particular del 65 al 75% en peso, de metionina,

15 - del 0,5 al 2,0% en peso, en particular del 0,75 al 1,75% en peso, de N-acetil-metionina, y

- del 0,20 al 1,5% en peso, en particular del 0,3 al 1,0%, en peso, de isoleucina, y

E) recuperar el aditivo alimenticio,

12. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según la reivindicación 11, caracterizado por que la composición líquida en bruto comprende además:

20 - del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,

- del 0,1 al 2% en peso, en particular del 0,75 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y

- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,75 al 1,5% en peso, de lípidos.

13. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según la reivindicación 11 ó 12, caracterizado por que comprende además la etapa consistente en:

25

B) desmineralizar la solución líquida en bruto a fin de eliminar los cationes y los aniones de dicho medio de fermentación, en particular para la obtención de una composición líquida en bruto desmineralizada que comprende:

- del 70 al 90% en peso, en particular del 75 al 85% en peso, de metionina,

- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso, de N-acetil-metionina, y

30 - del 0,10 al 1,0% en peso, en particular del 0,3 al 0,75%, en peso de isoleucina.

14. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según la reivindicación 13, caracterizado por que la composición líquida en bruto desmineralizada comprende además:

- del 2 al 6% en peso, en particular del 3 al 5% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina

35 - del 0,25 al 2% en peso, en particular del 0,5 al 1,5% en peso, de azúcares totales, y

- del 0,05 al 2,5% en peso, en particular del 0,075 al 2,0% en peso, de lípidos.

15. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizado por que el aditivo alimenticio es líquido, y en particular dicho procedimiento no comprende ninguna etapa de cristalización.

40

16. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado por que comprende además la etapa consistente en

C) cristalizar la metionina sólida en bruto a partir de la composición sólida en bruto, eventualmente desmineralizada.

17. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según la reivindicación 16, caracterizado por que comprende además la etapa consistente en

D) separar, eventualmente lavar y eventualmente triturar unos cristales de metionina para la obtención de una composición sólida en bruto.

18. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según la reivindicación 16 ó 17, caracterizado por que la composición sólida en bruto comprende

- 5
- del 80 al 95% en peso, en particular del 85 al 95% en peso, de metionina,
 - del 0,05 al 0,5% en peso, en particular del 0,05 al 0,3% en peso, de N-acetil-metionina, y
 - del 0,05 al 5,0% en peso, en particular del 0,1 al 3,0%, en peso de isoleucina.

19. Procedimiento de preparación de un aditivo alimenticio según la reivindicación 18, caracterizado por que la composición de metionina sólida en bruto o la composición sólida en bruto comprende además:

- 10
- del 1,0 al 5,0% en peso, en particular del 1,5 al 4,0% en peso, de aminoácidos distintos de la metionina, N-acetil-metionina e isoleucina,
 - del 0,1 al 1,5% en peso, en particular del 0,2 al 1,0% en peso, de azúcares totales, y
 - menos del 0,3% en peso de lípidos.