

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 165**

51 Int. Cl.:

C12P 13/12 (2006.01)

C07C 319/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2004 E 04804026 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 1713924**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de metionina a partir de una reserva de fermentación**

30 Prioridad:

18.12.2003 DE 10359668

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

30.05.2016

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**BOY, MATTHIAS;
KLEIN, DANIELA y
SCHRÖDER, HARTWIG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 572 165 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

Procedimiento para el aislamiento de metionina a partir de una reserva de fermentación

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención por fermentación de metionina, a un procedimiento para el aislamiento de la metionina formada en este caso, a la biomasa que contiene metionina que se produce en el aislamiento, a su empleo para la obtención de un pienso o complemento de pienso, así como al empleo de la metionina aislada para la obtención de productos alimenticios o piensos o complementos de productos alimenticios o piensos.

Estado de la técnica

10 Metionina encuentra empleo en los más diversos campos, incluyendo la industria de productos alimenticios, piensos, cosméticos o farmacéuticos.

Hasta el momento son de importancia técnica sólo los procedimientos de obtención químicos para D, L-metionina. Las sustancias de empleo para esta síntesis son sulfuro de hidrógeno, metilmercaptano, acroleína, ácido cianhídrico o metilmercaptopropionaldehído (véase Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1985), vol. A2, página 71).

15 Metionina se produce también a través de procesos metabólicos celulares naturales. Su producción a escala industrial se efectuaría del modo más conveniente por medio de cultivos bacterianos, que se desarrollaron para producir y secretar grandes cantidades de la sustancia deseada. Organismos especialmente apropiados para este fin son bacterias no patógenas corineformes.

20 Es sabido que se puede obtener metionina mediante fermentación de cepas de bacterias coreniformes, en especial *Corynebacterium glutamicum*. Debido al gran significado se trabaja siempre en la mejora de procedimientos de obtención. Las mejoras de procedimientos se pueden referir, por ejemplo, a medidas técnicas de fermentación, a la composición de medios nutrientes, o a las propiedades de rendimiento intrínsecas del propio microorganismo.

25 Para la mejora de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos respecto a la producción de una determinada molécula se pueden emplear métodos de mutagénesis, selección, y elección de mutantes o métodos de técnica de ADN recombinante para la mejora de cepas que producen aminoácido, como por ejemplo de *Corynebacterium*, al amplificarse o eliminarse genes de biosíntesis de aminoácidos aislados, y al ocasionarse de este modo una mejora de la producción de aminoácidos.

30 De este modo, por ejemplo el documento WO-A-02/10209 y el documento DE-A-101 36 986, describen un procedimiento para la obtención por fermentación de L-metionina bajo empleo de bacterias corineformes productoras de L-metionina modificadas genéticamente. En éstos, entre otras cosas, se describe un procedimiento para la obtención de L-metionina que comprende la fermentación de bacterias, la concentración de aminoácidos en el medio o en las bacterias, y el aislamiento de aminoácido. Además se describe un procedimiento para la obtención de aditivo para pienso que contiene L-metionina a partir de un caldo de fermentación, que comprende los siguientes pasos: a) fermentación de microorganismos productores de L-metionina; b) concentración del caldo de fermentación; por ejemplo mediante evaporación; c) separación de la biomasa (0-100 %), por ejemplo mediante centrifugación; y 35 d) el secado, por ejemplo mediante liofilización o secado por pulverizado, granulación por pulverizado.

El documento US 3 139 386 describe un procedimiento para el aislamiento de L-metionina obtenida mediante fermentación, calentándose a 100°C un caldo de fermentación que contiene metionina, y separándose y cristalizándose L-metionina a partir del caldo.

40 Swapan et al describen, en *J. Microbial Biotechnology*, 4 (1), 35-41 (1989) describen la producción microbiana de metionina por medio de un mutante de *Bacillus megaterium*, mediante separación de las células del caldo de fermentación, ajuste de pH a 5, tratamiento con carbón activo y cromatografía de intercambio iónico.

45 Por el documento DE-A-35 33 198 es conocida la obtención por fermentación de L-leucina por medio de bacterias termófilas especiales. La fermentación se efectúa a +60°C de manera continua bajo retención de biomasa, separación de medio agotado que contiene producto, enfriamiento (hasta +2°C) en un cristizador, obtención de aminoácido separado por cristalización y recirculación de las aguas madre al reactor. La producción de metionina por fermentación no se describe en el mismo.

50 Los procedimientos para la producción microbiana de metionina descritos hasta la fecha no cumplen los requisitos de una producción a escala industrial. El motivo es por una parte la solubilidad limitada de metionina en medio de fermentación acuoso, que ocasiona que, con rendimiento de biosíntesis elevado, la metionina precipita en el caldo

de fermentación, y por consiguiente dificulta la purificación. Otro motivo es que, en el trabajo según estado de la técnica, se producen corrientes de desechos considerables, cuya eliminación está vinculada a costes elevados.

Breve descripción de la invención

5 Por lo tanto, era tarea de la presente invención poner a disposición un procedimiento mejorado para el aislamiento de metionina obtenida por fermentación, que es aplicable en especial a aquellos caldos de fermentación que contienen metionina en parte en forma cristalina. Otra tarea consistía en poner a disposición un procedimiento de elaboración para caldos de fermentación que contienen metionina, que no genera prácticamente corrientes de desechos, y por consiguiente se puede llevar a cabo de manera especialmente económica.

10 Sorprendentemente, el anterior problema se soluciona mediante puesta a disposición de un procedimiento de elaboración que aprovecha selectivamente las propiedades de solubilidad de metionina para la separación de la biomasa. El procedimiento utiliza la cristalización como método de purificación para L-metionina obtenida por fermentación. Proporciona dos productos diferentes para la aplicación como aditivo de alimentación (producto de baja y alta concentración). En variantes preferentes no se producen prácticamente corrientes de desechos, y éstas permiten de este modo una producción de metionina especialmente económica a escala industrial.

15 Descripción detallada de la invención

A) Definiciones generales

“Metionina” en el sentido de la invención comprende en principio L- o D-metionina, mezclas de estos isómeros, como por ejemplo racematos, pero preferentemente L-metionina.

20 La solubilidad de metionina asciende a 20°C en agua aproximadamente a 30 g/l, a 70°C se sitúa por encima de 90 g/l. En el caldo de fermentación se observan solubilidades de orden de magnitud comparable bajo estas condiciones.

25 Las medidas de procedimiento, como “concentración”, “separación”, “lavado”, “secado”, comprenden todos los procedimientos situados en el ámbito de las capacidades técnicas en el sentido de la presente invención. De este modo, por ejemplo se puede entender por “concentración” una evaporación de la fase líquida bajo presión normal, o aplicación de un vacío. Se puede efectuar una “concentración”, a modo de ejemplo, bajo aplicación de técnicas de uso común, como la ósmosis inversa, o la nanofiltración, o dispositivos de uso común, como por ejemplo un evaporador molecular por gravedad, evaporador de capa fina o evaporador rotatorio, o combinaciones de los mismos. Una “separación” puede comprender, a modo de ejemplo, una centrifugación, una filtración, una decantación, o combinaciones de estos procedimientos. Un “lavado” puede comprender, a modo de ejemplo, la separación por filtración de un producto sólido y un lavado simple o múltiple, en caso dado tras suspensión del residuo de filtración. Un “secado” puede comprender, a modo de ejemplo, una liofilización, un secado por pulverizado, una granulación por pulverizado, un secado en lecho turbulento, o combinaciones de estos procedimientos.

B) Formas preferentes de ejecución de la invención

35 Un primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de metionina obtenida por fermentación, a) calentándose una fracción líquida que contiene metionina, que se produce en la fermentación de un microorganismo productor de metionina, que contiene metionina en especial en forma parcialmente no disuelta, a una temperatura en el intervalo de 60 a 100°C, que es suficiente para aumentar la solubilidad de metionina en la fase líquida, preferentemente para disolver metionina esencialmente por completo, b) obteniéndose a partir de la misma una fase líquida enriquecida en metionina, al separarse la biomasa del caldo de fermentación concentrado, y c) separándose por cristalización metionina, en caso dado tras concentración de la fase líquida concentrada, lavándose, en caso dado, la biomasa g1) separada en la etapa b), siendo calentado, en caso dado, el líquido empleado para el lavado, y g3) secándose.

45 La metionina se encuentra “esencialmente” disuelta si está disuelta, por ejemplo, en más de un 95 %, más de un 98 %, en especial más de un 100 %, referido al contenido en metionina total.

50 Una “fracción líquida” que contiene metionina es típicamente el caldo obtenido a partir del proceso de fermentación, que contiene metionina, en especial en forma parcialmente no disuelta, y en caso dado puede presentar otros componentes sólidos, que pueden estar contenidos habitualmente en caldos de fermentación; o un líquido derivado del mismo, por ejemplo mediante tratamiento previo apropiado. Un “tratamiento previo” podría consistir, a modo de ejemplo, en una concentración por evaporación y/o en una adición de sustancias. A modo de ejemplo, al caldo se podrían añadir fracciones que contienen metionina procedentes de cargas de elaboración previas, o aditivos (véase a continuación) que favorecen los siguientes pasos de elaboración o el empleo del producto según determinación

(por ejemplo como aditivo de alimentación).

5 El contenido en metionina no disuelta en el caldo de fermentación, en caso dado enriquecido, se sitúa, referido al peso total del caldo de fermentación, en el intervalo de aproximadamente un 1 a un 10 % en peso, de modo preferente de aproximadamente un 3 a un 8 % en peso, o referido al contenido en producto sólido total de aproximadamente un 30 a un 80 % en peso, de modo preferente de aproximadamente un 50 a un 57 % en peso.

A modo de ejemplo, una fermentación según la invención puede dar por resultado un contenido en metionina de aproximadamente 96 g/l, de los cuales aproximadamente 46 g/l se presentan en disolución y aproximadamente 50 g/l se presentan no disueltos a una temperatura de fermentación típica.

10 El contenido en metionina de la fase líquida enriquecida se sitúa, referido a sus residuos anhidros, en el intervalo de aproximadamente un 60 a un 100 % en peso, o aproximadamente un 90 a un 100 % en peso, a modo de ejemplo de aproximadamente un 75 a un 85 % en peso, o aproximadamente un 95 a un 100 % en peso.

Para disolver esencialmente metionina se calienta a una temperatura en el intervalo a) de aproximadamente 60 a 120°C, de modo preferente aproximadamente 70 a 100°C, según cantidad de producto a disolver. En caso dado puede ser necesario trabajar a presión ligeramente elevada, como por ejemplo 1 a 5 atm.

15 En la etapa a) se emplea preferentemente como fracción líquida el caldo de fermentación que contiene biomasa sin tratamiento previo adicional.

20 La fase líquida de la etapa b) enriquecida en metionina se obtiene al separarse la biomasa a partir del caldo de fermentación enriquecido con metionina disuelta, calentado. Para evitar una cristalización prematura de metionina, durante la separación de la biomasa se trabaja igualmente a temperatura elevada, preferentemente a una temperatura en el intervalo indicado anteriormente.

En una forma preferente de ejecución de la invención

d) se separa la metionina cristalizada,

e) se lava en caso dado la metionina sólida separada, preferentemente cristalina, y

f) se seca en caso dado.

25 Puede ser necesario un calentamiento de líquido de lavado si, por ejemplo, se debe obtener metionina sólida en la fracción de biomasa separada, y se desea en lo posible obtener metionina a partir de la fracción de biomasa.

Para evitar corrientes de desechos, preferentemente

g2) se reúne el líquido de lavado producido en la etapa g1) con la fase líquida enriquecida en metionina de la etapa b).

30 Las fases líquidas de la fase b) obtenidas según tipos de procedimiento anteriores, que contienen metionina, se concentran adicionalmente a continuación, por ejemplo mediante evaporación bajo calentamiento, y en caso dado aplicación de un vacío. En este caso, el contenido en metionina en el concentrado que se produce en este caso se sitúa en el intervalo de aproximadamente un 10 a un 40 % en peso, referido al peso total de concentrado. En este caso, la separación de metionina se efectúa preferentemente mediante cristalización por refrigeración. A tal efecto,

35 la disolución se enfría a temperaturas en el intervalo de 0 a 20°C. Una vez concluida la cristalización, la metionina sólida se lava con líquido de lavado frío, por ejemplo agua, y se seca, en caso dado bajo ligero calentamiento.

Según otra variante de procedimiento, las aguas madre que se producen en la etapa d)

d1) con la fracción líquida que contiene metionina a partir de otra carga de fermentación se reúnen con un microorganismo productor de metionina; o

40 d2) la biomasa separada de la misma o de otra carga de fermentación, con un microorganismo productor de metionina, se añade antes del secado según etapa g3).

Según otra variante de procedimiento, el líquido de lavado que se produce en la etapa e)

e1) se reúne con la fracción líquida que contiene metionina a partir de otra carga de fermentación se reúne con un

microorganismo productor de metionina; o

e2) la biomasa separada de la misma u otra carga de fermentación, con un microorganismo productor de metionina, se añade antes del secado según etapa g3).

5 Mediante recirculación de las aguas madre y el líquido de lavado se suprime adicionalmente una producción de corrientes de desechos.

Según la invención, además es preferente que el secado según etapa g3) comprenda un paso de secado por pulverizado.

10 Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención por fermentación de metionina, fermentándose un microorganismo natural o recombinante, y aislándose la metionina formada según un procedimiento según la anterior definición.

En una forma de ejecución preferente, los procedimientos según la invención se llevan a cabo bajo empleo de un microorganismo productor de metionina, seleccionado entre bacterias naturales o recombinantes de la especie *Corynebacterium*.

15 Además, el producto desecado obtenible según la anterior etapa g3) se puede emplear para la obtención de un pienso o de un aditivo para pienso (aditivo de alimentación).

Además, la metionina aislada según la invención se puede emplear para la obtención de un producto alimenticio o pienso, o complemento para producto alimenticio o pienso.

20 Las biomásas que contienen metionina desecadas, obtenibles según un procedimiento conforme a la anterior definición, se pueden emplear para la obtención de aditivos de alimentación, que comprenden tales biomásas, así como de composiciones de piensos, que contienen tal aditivo de alimentación, además de componentes de piensos habituales.

En los siguientes párrafos se describen otros acondicionamientos de la invención.

C) Células huésped empleadas según la invención

25 Para el procedimiento según la invención se emplea preferentemente bacterias corineformes. Estas son preferentemente bacterias de la especie *Corynebacterium*. De la especie *Corynebacterium* se debe citar en especial el tipo *Corynebacterium glutamicum*, que es conocida en el mundo técnico por su capacidad de producir L-aminoácidos.

Como ejemplos de cepas apropiadas se deben citar:

de la especie *Corynebacterium*:

30 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965; *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065; o *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608

o de la especie *Brevibacterium*:

35 *Brevibacterium flavum* ATCC 14067; *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 y *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020;

(KFCC = Korean Federation of Culture Collection; ATCC = American Type Culture Collection; FERM BP = Sammlung des National institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japón).

40 Las cepas bacterianas se pueden emplear en este caso sin modificar, o modificadas genéticamente de modo apropiado. A modo de ejemplo se pueden emplear microorganismos en los que los genes refuerzan la vía de biosíntesis de metionina, de modo que se presenta más metionina en la célula. Alternativa o adicionalmente se pueden eliminar o debilitar también genes que están implicados en vías metabólicas de degradación de metionina. Estrategias apropiadas para la mejora de la producción de metionina son conocidas por el estado de la técnica y se describen, a modo de ejemplo, en los documentos WO-A-02/10209, DE-A-102 170 58, DE-A-102 393 08, DE-A-102 390 73, DE-A- 102 390 82 y DE-A-102 228 58, a los cuales se hace referencia expresamente.

5 Para reducir la actividad o cantidad de un enzima, que podría reducir el contenido en metionina, el especialista puede ejecutar diversas medidas aisladas, o en combinaciones. Mediante reducción de la frecuencia de transcripción del gen, que codifica para la proteína según la invención, se puede reducir la concentración de la proteína en cuestión. El especialista puede conseguir esto mediante modificación o intercambio de la región de promotor o regulación, así como del punto de enlace de ribosomas del gen codificante. En sentido descendente de la región codificante, el especialista puede modificar terminadores o insertar secuencias, que conducen a una estabilidad reducida del elemento de transcripción. Estas medidas que reducen el semiperiodo de vida de mRNA posibilitan la expresión de la proteína correspondiente, y de este modo la reducción de su concentración.

10 En el plano del enzima exprimido, secuencias fusionadas pueden conducir a una velocidad de degradación elevada, y con ello igualmente a una reducción de la concentración de proteína. Además, el especialista puede modificar la actividad, la afinidad con el sustrato y la especificidad con el sustrato mediante mutagénesis selectiva o no orientada del gen codificante. Debido a mutaciones en los correspondientes genes, los enzimas pueden influir en su actividad de modo que se llega a una reducción parcial o completa de la velocidad de reacción de la reacción enzimática. Los ejemplos de tales mutaciones son conocidos por el especialista (Motoyama H. Yano H. Terasaki Y. Anazawa H. *Applied & Environmental Microbiology*. 67: 3064-70, 2001, Eikmanns BJ. Eggeling L. Sahm H. Antonie van Leeuwenhoek. 64: 145-63, 1993-94). Los mutantes de la proteína pueden conducir también a homo- o heteromultimerización reducida o inhibida de complejos enzimáticos, y con ello igualmente a una reducción de las propiedades enzimáticas.

20 Los genes modificados en tal medida se pueden presentar integrados en plásmidos, o preferentemente en el cromosoma. En este caso, el gen original, no modificado de este modo, puede estar aún presente adicionalmente, pero de modo preferente puede estar substituido por el gen modificado.

25 Para reducir la actividad en un enzima, medida en una bacteria corineforme, puede ser suficiente exprimir genes que codifican para equivalentes funcionales, como mutantes obtenidos artificialmente, u homólogos naturales de otros organismos. En este caso, el gen original puede estar aún presente adicionalmente, pero de modo preferente puede estar substituido por el gen modificado u homólogo.

Adicionalmente, para la producción bacteriana de metionina puede ser ventajoso reforzar uno o varios enzimas de la vía biosintética de metionina, de la vía metabólica de cisteína, de la síntesis de semialdehído de aspartato, de glicólisis, de anaplerótica, de metabolismo de pentosa-fosfato, del ciclo de ácido cítrico, o de exportación de aminoácidos.

30 De este modo, para la síntesis de metionina, uno o varios de los siguientes genes puede estar reforzado:

- el gen codificante para una aspartatoquinasa lysC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 281),
- el gen codificante para el aspartato-semialdehído asd (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 282),
- el gen codificante para la glicerinaldehído-3-fosfatodehidrogenasa gap (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174: 6076-6086),
- 35 • el gen codificante para la 3-fosfogliceratoquinasa pgk (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174: 6076-6086),
- el gen codificante para la piruvato-carboxilasa pyc (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174: 6076-6086),
- el gen codificante para la triosefosfatoisomerasa tpi (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174: 6076-6086),
- 40 • el gen codificante para la homoserin-O-acetiltransferasa metA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 725),
- el gen codificante para la cistationin-gamma-sintasa metB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3491),
- el gen codificante para la cistationin-gamma-liasa metC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3061),
- el gen codificante para la cistationin-sintasa meth (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1663),
- el gen codificante para la serin-hidroximetiltransferasa glyA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1110),

ES 2 572 165 T3

- el gen codificante para la O-acetilhomoserin-sulfohidrilasa metY (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726),
 - el gen codificante para la metilentetrahidrofolato-reductasa metF (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2379),
 - el gen codificante para la fosfoserin-aminotransferasa serC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 928)
 - 5 • un gen codificante para la fosfoserin-fosfatasa serB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO. 2767)
 - el gen codificante para la serin-acetil-transferasa cysE (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2818)
 - el gen codificante para la cistein-sintasa cysK (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2817),
 - el gen codificante para una homoserin-dehidrogenasa hom (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306).
- 10 Adicionalmente, para la obtención de metionina según la invención puede ser ventajoso mutar simultáneamente al menos uno de los siguientes genes, de modo que las proteínas correspondientes, en comparación con proteínas no mutadas, son influidas en menor medida, o no son influidas en su actividad por un metabolito, o se aumenta su actividad específica:
- el gen codificante para una aspartatoquinasa lysC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 281),
 - el gen codificante para piruvatocarboxilasa pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
 - 15 • el gen codificante para homoserin-O-acetiltransferasa metA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 725),
 - el gen codificante para cistationin-gamma-sintasa metB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3491),
 - el gen codificante para cistationin-gamma-liasa metC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3061),
 - el gen codificante para metionin-sintasa metH (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1663),
 - el gen codificante para serin-hidroximetiltransferasa glyA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1110),
 - 20 • el gen codificante para O-acetilhomoserin-sulfohidrilasa metY (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726),
 - el gen codificante para metilentetrahidrofolato-reductasa metF (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2379),
 - el gen codificante para fosfoserin-aminotransferasa serC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 928)
 - un gen codificante para la fosfoserin-fosfatasa serB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO. 2767)
 - 25 • el gen codificante para serin-acetil-transferasa cysE (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2818)
 - el gen codificante para cisteín-sintasa cysK (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2817),
 - el gen codificante para una homoserin-dehidrogenasa hom (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306).
- Además, para una producción de metionina puede ser ventajoso debilitar uno o varios de los siguientes genes, en especial reducir o eliminar su expresión:
- 30 • el gen codificante para S-adenosilmetionin-sintasa (E.C.2.5.1.6) metK
 - el gen codificante para homoserin-quinasa thrB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3453)
 - el gen codificante para treonin-dehidratasa ilvA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2328)

- el gen codificante para treonin-sintasa thrC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3486)
 - el gen codificante para meso-diaminopimelato-D-dehidrogenasa ddh (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3494)
 - el gen codificante para fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa pck (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3157)
 - el gen codificante para glucosa-6-fosfato-6-isomerasa pgi (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 950)
- 5
- el gen codificante para piruvato-oxidasa poxB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2873)
 - el gen codificante para dihidrodipicolinosintasa dapA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3476)
 - el gen codificante para dihidropicolinato-reductasa dapB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3477)
 - el gen codificante para diaminopicolinato-decarboxilasa lysA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3451).

10 Además, para la producción de metionina puede ser ventajoso mutar al menos uno de los genes citados anteriormente metK, thrB, ilvA, thrC, ddh, pck, pgi, poxB, dapA, dapB, lysA, de modo que se reduzca parcial o completamente la actividad enzimática de la proteína correspondiente.

Además, para la producción de metionina puede ser ventajoso eliminar otras reacciones secundarias no deseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londres, UK, 1982).

15 Para la consecución de una superexpresión, el especialista puede recurrir a diversas medidas aisladas o en combinación. De este modo se puede aumentar el número de copias de los correspondientes genes, o se puede mutar la región de promotor o de regulación, o el punto de enlace de ribosomas, que se encuentra orientado hacia el gen estructural. Del mismo modo actúan los cassettes de expresión, que se incorporan orientados hacia el gen estructural. Mediante promotores inducibles es posible adicionalmente aumentar la expresión en el transcurso de la producción de L-metionina por fermentación. Mediante medidas para la prolongación del semiperiodo de vida de mARN se mejora igualmente la expresión. Además, mediante inhibición de la degradación de la proteína enzimática se refuerza igualmente la actividad enzimática. Los genes o segmentos génicos se pueden presentar en plásmidos con diferente número de copias, o bien se pueden integrar y amplificar en el cromosoma. Alternativamente se puede conseguir además una superexpresión de los genes en cuestión mediante modificación de la composición de medios y control de cultivo.

20

25

El especialista encuentra instrucciones a tal efecto, entre otros, en Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), en Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), en Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), en el documento EP 0472869, en el documento US 4,601,893, en Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), en Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)), en LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), en el documento WO 96/15246, en Malumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), en el documento JP-A-10-229891, en Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), en Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) y en manuales conocidos de genética y biología molecular.

30

D) Puesta en práctica de la fermentación según la invención

35 Los microorganismos obtenidos según la invención se pueden cultivar continua o discontinuamente en procedimiento discontinuo (cultivo por cargas) o en cargas de alimentación (procedimiento de alimentación), o procedimiento por cargas de alimentación reiteradas (procedimiento de alimentación repetitivo) para la producción de metionina. Se puede encontrar una sinopsis sobre métodos de cultivo conocidos en el manual de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)), o en el manual de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

40

El medio de cultivo a emplear tiene que cumplir de modo apropiado los requisitos de las respectivas cepas. En el manual „Manual of Methods für General Bacteriology“ de la American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) se incluyen descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos.

45 Estos medios empleables según la invención comprenden habitualmente una o varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/u oligoelementos.

Fuentes de carbono preferentes son azúcares, como mono-, di- o polisacáridos. Fuentes de carbono muy

convenientes son, a modo de ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. También se puede añadir a los medios azúcares a través de compuestos complejos, como melasas, u otros productos secundarios del refinado de azúcares. También puede ser ventajoso añadir mezclas de diversas fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas, como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco; ácidos grasos, como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico; alcoholes, como por ejemplo glicerina, metanol o etanol; y ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético o ácido láctico.

Fuentes de nitrógeno son habitualmente compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos, o materiales que contienen estos compuestos. Fuentes de nitrógeno ejemplares contienen gas de amoniaco o sales amónicas, como sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico o nitrato amónico, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejas, como agua de hinchamiento de maíz, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne, y otros. Las fuentes de nitrógeno se pueden emplear aisladas o como mezcla.

Compuestos salinos inorgánicos, que pueden estar contenidos en los medios, comprenden las sales de cloruro, fósforo o sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro.

Como fuente de nitrógeno para la obtención de metionina se pueden emplear compuestos inorgánicos que contienen azufre, como por ejemplo sulfatos, sulfitos, ditionitas, tetracionatos, tiosulfatos, sulfuros, pero también compuestos de azufre orgánicos, como mercaptanos y tioles.

Como fuente de fósforo se pueden emplear ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico, o las correspondientes sales que contienen sodio.

Se pueden añadir agentes quelatizantes al medio para mantener los iones metálicos en disolución. Agentes quelatizantes especialmente apropiados comprenden dihidroxifenoles, como catecol o protocatecuato, o ácidos orgánicos, como ácido cítrico.

Los medios de fermentación empleados según la invención también contienen habitualmente otros factores de crecimiento, como vitaminas o promotores de crecimiento, a los que pertenecen, a modo de ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales proceden frecuentemente de componentes de medios complejos, como extracto de levadura, melasas, agua de hinchamiento de maíz, y similares. Al medio de cultivo se pueden añadir además precursores apropiados. La composición exacta de compuestos del medio depende en gran medida del respectivo experimento, y se decide individualmente para cada caso específico. Se puede obtener información sobre la optimización de medios a partir del manual „Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach“ (ed. P. M. Rhodes, P. F. Stanbury, IRL Press (1997), páginas 53-73, ISBN 0 19 963577 3). También se pueden adquirir medios de crecimiento de proveedores comerciales 1, como Standard (Merck) o BHI (Brain heart infusion, DIFCO), y similares.

La totalidad de componentes del medio se esterilizan mediante calor (20 min a 1,5 bar y 121°C) o mediante esterilización. Los componentes se esterilizan conjuntamente, o en caso necesario por separado. Todos los componentes del medio pueden estar presentes al comienzo del cultivo, u opcionalmente se pueden añadir continuamente o por cargas.

La temperatura de cultivo se sitúa normalmente entre 15°C y 45°C, preferentemente a 25°C hasta 40°C, y se puede mantener constante o modificar durante el experimento. El valor de pH del medio se debía situar en el intervalo de 5 a 8,5, preferentemente alrededor de 7,0. El valor de pH para el cultivo se puede controlar durante el cultivo mediante adición de compuestos básicos, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco, o bien agua amoniacal, o compuestos ácidos, como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control de la formación de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes, como por ejemplo poliglicolésteres de ácido graso. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos se pueden añadir al medio sustancias de acción selectiva apropiadas, como por ejemplo antibióticos. Para mantener condiciones aerobias se introduce en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, como por ejemplo aire ambiental. El cultivo se continúa hasta que se ha formado un máximo de producto deseado. Este objetivo se ha alcanzado normalmente en el intervalo de 10 horas a 160 horas.

Los caldos de fermentación obtenidos de este modo, que contienen metionina, tienen habitualmente una masa seca de un 7,5 a un 25 % en peso.

Además, también es ventajoso llevar a cabo la fermentación al menos al final, pero en especial durante al menos un 30 % del tiempo de fermentación con limitación de azúcar. Es decir, durante el tiempo, la concentración de azúcar utilizable en el medio de fermentación se mantiene, o bien se reduce a ≥ 0 a 3 g/l.

E) Purificación de metionina

Si la metionina obtenida tras cristalización según la invención no presentara aún la pureza deseada, ésta se puede purificar adicionalmente. A tal efecto se somete el producto en agua disuelta a una cromatografía con una resina apropiada, reteniéndose el producto deseado o las impurezas completa o parcialmente en la resina de cromatografía. Estos pasos de cromatografía se pueden repetir en caso necesario, empleándose las mismas u otras resinas de cromatografía. El especialista posee experiencia en la selección de resinas de cromatografía apropiadas y su aplicación más eficaz. El producto purificado se puede concentrar mediante filtración o ultrafiltración, y conservar a una temperatura a la que la estabilidad del producto sea máxima.

La identidad y pureza del compuesto aislado se puede determinar mediante técnicas conocidas. Estas comprenden cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), procedimientos espectroscópicos, procedimientos de tñido, cromatografía en capa fina, NIRS, test enzimático o test microbiológicos. Estos procedimientos de análisis se reúnen en: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60: 133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; y Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19: 67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) tomo A27, VCH: Weinheim, páginas 89-90, páginas 521-540, páginas 540-547, páginas 559-566, 575-581 y páginas 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, tomo 17.

F) Secado de la biomasa

Una vez concluida la fermentación se puede elaborar el caldo de fermentación que contiene metionina directamente para dar el aditivo para pienso anhidro acabado. No obstante, según una forma preferente de ejecución de la invención, a partir del caldo de fermentación se elimina en primer lugar la fracción de biomasa completa o parcialmente, preferentemente por completo, a modo de ejemplo mediante centrifugación, y se elabora para dar el aditivo para pienso según la invención. La biomasa producida contiene aún una cierta fracción de metionina, que se puede reducir, en caso deseado, mediante intercalado de un paso de lavado.

La elaboración de la biomasa según la invención para dar un producto anhidro apropiado se puede efectuar según diversos procedimientos conocidos en sí por el estado de la técnica. Para la obtención son apropiados en especial procedimientos de secado, como procedimiento de pulverizado, granulación por pulverizado, secado por contacto, secado en lecho fluidizado o liofilización. Se describen procedimientos apropiados, a modo de ejemplo, en: O. Krischer, W. Kast, Trocknungstechnik, primer tomo, "Die wissenschaftlichen Grundlagen der Trocknungstechnik", editorial Springer 1978; Krischer/Kröll, Trocknungstechnik, segundo tomo, "Trockner und Trocknungsverfahren", editorial Springer 1959; K. Kröll, W. Kast, Trocknungstechnik, tercer tomo, "Trocknen und Trockner in der Produktion", editorial Springer 1989; K. Masters, "Spray Drying Handbook", Longman Scientific & Technical 1991, 725 páginas; H. Uhlemann, L. Mörl, "Wirbelschicht - Sprühgranulation", editorial Springer 2000; Gefriertrocknung: Georg-Wilhelm Oetjen, "Gefriertrocknen", VCH 1997; así como el documento EP-A-0 809 940. En este caso se hace referencia expresamente a la manifestación de los documentos descritos anteriormente.

El paso de secado según la invención se efectúa preferentemente mediante secado por pulverizado, como por ejemplo secado por pulverizado con lecho fluidizado integrado, o mediante granulación por pulverizado.

En caso deseado, el secado se puede llevar a cabo en presencia de un material soporte útil como pienso apropiado, mediante lo cual se puede mejorar la susceptibilidad de esparcimiento y con ello la calidad del producto.

Como materiales soporte útiles como pienso se pueden emplear soportes inertes habituales. Un soporte „inerte“ no debe mostrar interacciones negativas con los aditivos nutrientes contenidos en el aditivo, y debe ser inofensivo para el empleo como sustancia auxiliar en aditivos para piensos. Como ejemplos de materiales soporte apropiados se deben citar: compuestos inorgánico u orgánicos de origen natural o sintético. Son ejemplos de soportes inorgánicos de bajo peso molecular apropiados soportes inorgánicos sales, como cloruro sódico, carbonato de calcio, sulfato sódico y sulfato de magnesio, o ácido silícico. Son ejemplos de soportes orgánicos apropiados en especial azúcares, como por ejemplo glucosa, fructosa, sacarosa, así como dextrina y productos de almidón. Como ejemplos de soportes orgánicos de peso molecular elevado se deben citar: preparados de almidón y celulosa, como en especial almidón de maíz, harina de cereales, como por ejemplo harina de trigo, centeno, cebada y avena, o mezclas de los mismos, o sémola de trigo duro. El material soporte puede estar contenido en el preparado, referido a la base seca, en una fracción de aproximadamente un 5 a un 85 % en peso, como por ejemplo aproximadamente un 10 a un 30 % en peso, un 20 a un 40 % en peso, o un 50 a un 85 % en peso.

A continuación se deben tratar brevemente algunas técnicas de secado preferentes en forma general.

El secado por pulverizado se puede llevar a cabo de modo que en primer lugar se bombee la biomasa aún húmeda al atomizador en la torre de pulverizado. La atomización se efectúa, por ejemplo, por medio de una tobera de presión (tobera unitaria), una tobera binaria, o un atomizador centrífugo. El secado de las gotitas se efectúa mediante una corriente de aire caliente conducida al secador de pulverizado. En el caso de empleo de atomizadores centrífugos, el

5 secado se efectúa preferentemente en corriente paralela. En el caso de toberas, el secado se puede efectuar también en contracorriente o corriente mixta. El polvo desecado se puede descargar en la torre, o se conduce concomitantemente con la corriente de aire y se separa en un ciclón y/o filtro. Según producto y régimen puede ser necesario un secado subsiguiente, que se puede efectuar en un lecho fluidizado adosado al secador de pulverizado, o externo.

10 En una variante del procedimiento de secado según la invención, al paso de secado, en especial al secado por pulverizado, sigue una aglomeración de lecho fluidizado continua o discontinua. A tal efecto, en un secador de lecho fluidizado se dispone un material pulverulento, por ejemplo aditivo pulverulento obtenido mediante secado por pulverizado, al comienzo del procedimiento. La fluidización se efectúa, por ejemplo, mediante alimentación de aire calentado previamente. Se pulveriza sobre el lecho fluidizado una fase líquida, como por ejemplo biomasa adicional o una disolución que contiene agente aglutinante, mediante lo cual el polvo dispuesto se humedece con esta disolución y se aglomera en medida creciente mediante sus propiedades adhesivas. Al mismo tiempo se descarga continuamente o casi continuamente, es decir, de manera sincronizada a intervalos, una cantidad parcial de aglomerado del lecho fluidizado. La descarga se clasifica, por ejemplo, con ayuda de un tamiz. El producto grueso formado en este caso se moltura y se devuelve de nuevo al lecho fluidizado de manera continua. Las fracciones finas, como por ejemplo de la instalación de filtración de aire de escape, se pueden devolver igualmente de manera continua.

20 Otra variante de procedimiento preferente comprende un secado por pulverizado de biomasa para dar un polvo, acoplado con la subsiguiente aglomeración del polvo desecado por pulverizado. Esto se puede llevar a cabo de manera discontinua o continua. Es preferente el régimen continuo. Tales procedimientos se pueden llevar a cabo bajo empleo de instalaciones de secado por pulverizado convencionales. No obstante, la puesta en práctica se efectúa preferentemente en dispositivos que son conocidos como FSD (Fluidized Spray Dryer), SBD (Spray Bed Dryer) o MSD (Multi Stage Dryer).

25 Una instalación de secado Fluidized Spray Dryer (FSD) para la obtención continua de un producto anhidro según la invención se puede accionar en especial según el siguiente esquema: la biomasa seca se introduce a través de una alimentación en la cabeza del secador FSD, y se pulveriza con ayuda de un atomizador. El secado se efectúa mediante introducción de aire en corriente paralela. En este caso, el aire se calienta previamente mediante una calefacción. El polvo desecado por pulverizado se reúne en el lecho fluidizado integrado en el fondo del secador FSD, y en éste se pulveriza con ayuda de un dispositivo de pulverizado bajo empleo de aire a presión, por ejemplo se pulveriza con una disolución de agente aglutinante y se fluidiza con aire alimentado. El aire se calienta previamente a tal efecto y se alimenta por debajo del fondo de afluencia del lecho fluidizado integrado mediante una alimentación. El aglomerado previo producido en este caso llega a continuación a un lecho fluidizado posterior, externo. En este lecho fluidizado externo se introduce aire calentado previamente desde abajo a través de una alimentación adicional. El aglomerado previo dispuesto en el lecho fluidizado se pulveriza de nuevo con ayuda de otro dispositivo de pulverizado bajo empleo de aire a presión (por ejemplo con disolución de agente aglutinante), y se aglomera para dar el producto final. El aglomerado acabado se descarga del lecho fluidizado y se puede elaborar adicionalmente como se describe anteriormente.

La composición y cantidad de líquidos introducidos por tobera se ajustan a las propiedades adhesivas de la disolución pulverizada, el tamaño de aglomerado a alcanzar y las condiciones de proceso.

40 Para el caso en el que las propiedades adhesivas de la biomasa pulverizada no sean suficientes, para garantizar una adhesión estable de las partículas tras el pulverizado, es ventajoso adicionalmente el empleo de un agente aglutinante. De este modo se evita que los aglomerados se descompongan de nuevo en el secado. En tales casos es preferente pulverizar un agente aglutinante soluble o dispersable en medio acuoso en el lecho fluidizado. Como ejemplos de agentes aglutinantes apropiados se deben citar disoluciones de hidratos de carbono, como por ejemplo glucosa, sacarosa, dextrinas, entre otras, alcoholes sacáricos, como por ejemplo manita, o disoluciones de polímero, como por ejemplo disoluciones de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polivinilpirrolidona (PVP), celulosa etoxilada (EC), etilcelulosa o propilcelulosa. Mediante selección apropiada de cantidad y propiedades adhesivas del agente aglutinante pulverizado se producen aglomerados de diferente tamaño y resistencia.

50 Si el agente aglutinante se pulveriza como disolución separada, la fracción de agente aglutinante de la disolución se sitúa en el intervalo de aproximadamente un 1 a un 30 % en peso, referido al peso total de la disolución. En este caso, el agente aglutinante se presenta igualmente disuelto en un medio acuoso, preferentemente agua exenta de gérmenes, desalinizada. Del mismo modo pueden estar contenidos aditivos habituales, como por ejemplo tampón o solubilizador.

55 La fracción de agente aglutinante en el producto final asciende según la invención a un 0 hasta aproximadamente un 20 % en peso, a modo de ejemplo aproximadamente un 1 a un 6 % en peso. La cantidad óptima es dependiente también del tipo de agente aglutinante seleccionado. En este caso se debe procurar evitar influencias negativas sobre el producto.

G) Formulaciones

i) Aditivos para pienso y composiciones de pienso

5 El aditivo para pienso que contiene metionina se presenta preferentemente como polvo finamente dividido, susceptible de esparcido, o bien en forma granulada. En este caso, las partículas se pueden situar en un intervalo de tamaños de 5 a 200 µm, como por ejemplo 10 a 150 µm, 20 a 100 µm, o 30 a 80 µm, sin estar limitados al mismo.

La densidad aparente de los aditivos según la invención se puede situar en el intervalo de aproximadamente 100 a 600 g/l, como por ejemplo 150 a 400 g/l, o 200 a 350 g/l, sin estar limitados al mismo.

El contenido en metionina del aditivo según la invención varía según modo de obtención.

10 En este caso, el cristalizado de metionina obtenible según la invención presenta un contenido en metionina de más de un 60 % en peso, como por ejemplo aproximadamente un 70 a un 98 % en peso, de modo preferente aproximadamente un 80 a un 95 % en peso, de modo especialmente preferente aproximadamente un 87 a un 95 % en peso. La fracción de sales (residuos del caldo de fermentación se puede situar en este caso en el intervalo de aproximadamente un 0 a un 20 % en peso, en especial aproximadamente un 5 a un 15 % en peso. Otros componentes secundarios de fermentación pueden estar contenidos en una fracción de aproximadamente un 0 a un 20 % en peso, en especial aproximadamente un 5 a un 15 % en peso.

15 La metionina de la biomasa obtenida según la invención presenta un contenido en metionina de más de un 3 % en peso, como por ejemplo aproximadamente un 5 a un 40 % en peso, o aproximadamente un 10 a un 35 % en peso. La fracción de sales se puede situar en este caso en el intervalo de aproximadamente un 0 a un 30 % en peso, como por ejemplo un 5 a un 25 % en peso. Otros componentes secundarios de fermentación pueden estar contenidos en una fracción de aproximadamente un 0 a un 20 % en peso, como aproximadamente un 5 a un 15 % en peso.

El contenido en humedad residual del aditivo acabado se sitúa preferentemente en el intervalo de menos de aproximadamente un 3-5 % en peso, referido al peso total de aditivo. Los anteriores datos porcentuales en peso son referidos al peso total del producto anhidro (preferentemente sin humedad residual).

25 Además de los componentes descritos anteriormente, las formulaciones, como se ha mencionado anteriormente, pueden contener otros aditivos que se pueden añadir antes, durante o tras la elaboración de la biomasa. Como ejemplos se pueden citar sustancias conservantes, antibióticos, aditivos antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelatizantes, sales inofensivas desde el punto de vista fisiológico, saborizantes, colorantes y similares. También pueden estar contenidos aditivos relevantes para la nutrición, como por ejemplo vitaminas (por ejemplo las vitaminas 30 A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, D₃ y/o E, K₃, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantoténico); taurina, ácidos garbónicos y sus sales, como por ejemplo ácidos tricarbónicos, como citrato, isocitrato, trans-/cis-aconitato, y/o homo-citrato, enzima, carotenoides, minerales, como por ejemplo P, Ca, Mg y/o Fe, y oligoelementos, como Se, Cr, Zn, Mn, proteínas, hidratos de carbono, grasas, aminoácidos. Además pueden estar contenidos ácido breznopirúvico, L-carnitina, ácido lipónico, coenzima Q10, ácidos aminocarboxílicos, como por ejemplo creatina, ácido orótico, mioinositol, flavonoides, 35 betaína, ácido p-aminobenzoico.

Los aditivos para pienso que contienen metionina se pueden incorporar en formulaciones para pienso comerciales que pueden alimentar, a modo de ejemplo, vacas, cerdos, ovejas, aves, y similares. A tal efecto, el aditivo según la invención se mezcla con componentes para pienso habituales, y se confecciona en caso dado, a modo de ejemplo 40 se peletiza. Los componentes para pienso habituales son, por ejemplo, maíz, cebada, mandioca, avena, soja, harina de pescado, sémola de trigo, aceite de soja, cal, minerales, oligoelementos, aminoácidos y vitaminas.

ii) Complemento de productos alimenticios y piensos

La metionina obtenida según la invención encuentra empleo como aditivo en productos alimenticios y piensos, o aditivo en complementos de productos alimenticios y piensos, como por ejemplo preparados multivitamínicos. El 45 producto obtenido según la invención se puede incorporar a tal efecto en la cantidad deseada y de modo conocido en sí en productos alimenticios y piensos, o bien complementos de productos alimenticios y piensos convencionales. En este caso, puede estar contenido en las más diversas fracciones convenientes según empleo.

iii) Formulaciones revestidas

Las formulaciones descritas anteriormente pueden presentar adicionalmente, en caso dado, un revestimiento. En este caso, éstas están provistas de un agente de revestimiento, que comprende al menos un compuesto 50 seleccionado entre:

- polialquilenglicoles, en especial polietilenglicoles, a modo de ejemplo con un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 400 a 15 000, como por ejemplo 400 a 10 000;
- polímeros o copolímeros de óxido de polialquileno, a modo de ejemplo con un peso molecular numérico de aproximadamente 4000 a 20 000, en especial copolímeros en bloques de polioxietileno y polioxipropileno;
- 5 • poliestirenos sustituidos, derivados de ácido maleico y copolímeros de estireno-ácido maleico;
- polímeros vinílicos, en especial polivinilpirrolidonas, a modo de ejemplo con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 7000 a 1 000 000; por separado o en combinación con otros compuestos, como éteres de celulosa o almidones;
- 10 • copolímeros de vinilpirrolidona/acetato de vinilo, a modo de ejemplo con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 30 000 a 100 000;
- alcoholes polivinílicos, a modo de ejemplo con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 10 000 a 200 000, y polifitalatos de vinilo;
- hidroxipropilmetilcelulosas, a modo de ejemplo con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 6000 a 80 000;
- 15 • polímeros y copolímeros de alquil(met)acrilato, a modo de ejemplo con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 100 000 a 1 000 000, en especial copolímeros de acrilato de etilo/metacrilato de metilo y copolímeros de metacrilato/acrilato de etilo;
- acetatos de polivinilo, a modo de ejemplo con un peso molecular promedio en número de aproximadamente 250 000 a 700 000, en caso dado estabilizados con polivinilpirrolidona;
- 20 • polialquilenos, en especial polietilenos;
- polímeros aromáticos, a modo de ejemplo ligninas;
- ácidos poliacrílicos;
- poliacrilamidas;
- policianoacrilatos;
- 25 • resinas de ácido fenoxiacético-formaldehído;
- derivados de celulosa, como etilcelulosa, etilmetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, acetatoftalato de celulosa;
- grasas animales, vegetales o sintéticas, y grasas modificadas, como por ejemplo poliglicoles, alcoholes grasos, alcoholes grasos etoxilados, ácidos grasos superiores, mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos superiores, por ejemplo monoestearato de glicerina, etoxilatos de alquilarilo y monoetanolamidas de coco;
- 30 • ceras animales y vegetales o ceras animales y vegetales modificadas químicamente, como cera de abeja, cera Candelilla, cera Carnauba, cera de éster de Montana y cera de aceite de germen de arroz, aceite de ballena, lanolina, cera yoyoba, cera de sasol;
- proteínas animales y vegetales, como por ejemplo gelatinas, derivados de gelatina, sustitutos de gelatina, caseína, suero, queratina, proteína de soja; zeína y proteína de trigo;
- 35 • mono- y disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, como por ejemplo ácido hialurónico, pululano, elsinano, almidones, almidones modificados, así como pectinas, alginatos, quitosano, carragaen;
- aceites vegetales, como por ejemplo aceite de girasol, cártamo, semillas de algodón, soja, germen de maíz, oliva, colza, linaza, olivo, coco, aceite de palmiste; aceites sintéticos o semisintéticos, como por ejemplo triglicéridos de cadena media o aceites minerales; aceites animales, como por ejemplo aceite de arenque, sardina y ballena;
- 40 • aceites/grasas endurecidos (hidrogenados o parcialmente hidrogenados), como por ejemplo, de los citados anteriormente, en especial aceite de palma hidrogenado, aceite de semillas de algodón hidrogenado, aceite de soja hidrogenado;
- 45 • revestimientos de esmalte, como por ejemplo terpenos, en especial goma-laca, bálsamo de tolú, bálsamo de Perú, sandáraca, y resinas de silicona;
- ácidos grasos, ácidos carboxílicos C₆ a C₂₄ tanto saturados, como también mono- y poliinsaturados;
- ácidos silícicos;

y mezclas de los mismos.

- 50 La adición de plastificantes o emulsionantes a grasas o ceras antes del revestimiento puede ser ventajosa, en caso dado, para la mejora de la flexibilidad de la película.

55 La aplicación de revestimientos se efectúa de modo conocido en sí, en caso dado junto con aditivos, por regla general a través de instalaciones para la aplicación por goteo o aplicación por tobera sobre el producto de valor dispuesto en un mezclador. Son ejemplos a tal efecto lanzas, duchas, toberas unitarias o múltiples, o instalaciones de goteo o atomización giratorias. En el más sencillo de los casos, la adición es posible también localmente como chorro concentrado. Alternativamente, en el mezclador se puede disponer en primer lugar el material de revestimiento, para añadir después el producto de valor. Otra posibilidad consiste en la adición de material de revestimiento, en primer lugar sólido, que se funde y reviste el producto de valor a consecuencia de la calefacción de

pared, o debido a la alimentación de energía mecánica.

La invención se describe ahora más detalladamente bajo referencia a las figuras adjuntas. En este caso, las figuras 1 a 4 muestran diversos acondicionamientos de un procedimiento según la invención para la obtención de metionina cristalina, anhidra, y biomasa anhidra, que contiene metionina („metionina de biomasa“).

5 **Ejemplo 1**

a) Obtención fermentativa de metionina

10 Para la obtención de un caldo de fermentación representativo para la purificación de metionina se llevó a cabo una fermentación de laboratorio. La cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) se cultivó en un cultivo previo de 200 ml de medio BHI (Difco/Becton Dickinson Franklin Lakes, USA). En el fermentador Techfors se sobreinoculó el cultivo previo en el medio de cultivo (aproximadamente 14 l).

El medio de fermentación del cultivo principal presentaba la siguiente composición

2 g/l de KH_2PO_4
 2 g/l de K_2HPO_4
 10 g/l de sulfato amónico

15 100 g/l de glucosa
 5 g/l de extracto de levadura
 20 mg/l de canamicina
 1 g/l de KS911 ASM Antischaum
 pH 7,0

20 Se enrasa con agua completamente desalinizada al volumen final deseado

Disolución de sal en trazas 1 ml/l de medio

$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 g/l
$\text{MnSO}_4 \times 4 - 6\text{H}_2\text{O}$	10 g/l
ZnSO_4	2 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	250 g/l
Se ajusta a pH 1 con HCl	

1 ml/l de disolución de protocatecuato (disolución madre 300 mg/10 ml)

Biotina	1 mg/l
Tiamina	1 mg/l
CaCl_2	5 mg/l

25 Tras inoculación del fermentador a través del cultivo previo se mantuvo el fermentador a pH 7 mediante adición de base (25 % de NH_4OH) y se fermentó, hasta que el azúcar se había consumido. Esto se mostró a través de un ascenso del valor de pO_2 , o bien a través del desecho de OTR y CTR.

b) Elaboración del caldo de fermentación

El procedimiento en la elaboración se esboza esquemáticamente en la figura 1.

5 Como sustancia de partida sirve un caldo de fermentación obtenido según el párrafo a). A una temperatura de fermentación entre 30 y 40°C, aproximadamente un 50 % de la metionina contenida se presenta en forma cristalina. El producto de partida posee un contenido en agua de aproximadamente un 86 %, un contenido en metionina aumentado de aproximadamente un 9 % y un contenido en biomasa de aproximadamente un 3 %. Otros productos secundarios de fermentación y sustancias minerales están contenidos en trazas (aproximadamente un 2,5 % en peso) en el caldo de fermentación.

10 Se calientan 20 kg de este caldo de fermentación 15 minutos a 70°C. La metionina se disuelve completamente de este modo. A temperatura constante se centrifuga entonces la biomasa. El exceso (aproximadamente 15 kg) se concentra a continuación a 100°C y a presión normal a un contenido en metionina de un 20 %. El concentrado se enfría entonces con 5K/h a 5°C, mediante lo cual cristaliza una gran parte de metionina. Los cristales se separan a continuación de la papilla de cristalización en un embudo de filtración, se lavan con 4 litros de agua temperada previamente (5°C), y a continuación se secan por soplado a 40°C. Mediante este procedimiento se pudo aislar 1,3 kg de metionina anhidra con una pureza de aproximadamente un 90 %.

15 El residuo de la centrifugación (aproximadamente 5 kg) contiene, además de biomasa anhidra, aproximadamente aún un 6 % de metionina. Mediante secado por pulverizado se puede transformar este residuo en aproximadamente 0,7 kg de polvo anhidro ligeramente amarillento y susceptible de esparcido, con una humedad residual de un 3 %, que contiene aún metionina (aproximadamente un 30 %), además de la biomasa anhidra y otros productos secundarios de fermentación y sales minerales.

20 El secado por pulverizado se efectuó en un secador por pulverización de laboratorio con los siguientes ajustes del aparato:

temperatura de entrada: 200°C,

temperatura de salida: 80-82°C.

Como gas de calefacción se emplearon 60 m³/h. El gas de tobera se pulverizó con una presión de 2 bar a través de una tobera de 1,2 mm.

25 **Ejemplo 2**

30 Partiendo del mismo material inicial se modifica el procedimiento en el sentido de separar la biomasa por medio de centrifugación, y lavar la biomasa separada a continuación con 5 l de agua (figura 2). Tras centrifugación se añade el exceso producido al exceso de la primera separación de biomasa. El exceso total se concentra a 100°C y presión normal a un contenido en metionina de un 16 %. Mediante enfriamiento del concentrado con 5 K/h a 5°C se separa por cristalización la metionina. Los cristales se separan en un embudo de filtración, se lavan con 4,5 litros de agua temperada previamente (5°C), y a continuación se secan con nitrógeno a 40°C. Mediante este procedimiento se aumenta la cantidad de metionina anhidra a aproximadamente 1,5 kg. La pureza del cristalizado aislado es además aproximadamente un 90 %.

35 El residuo de biomasa separada y lavada se transforma en aproximadamente 0,5 kg de producto anhidro mediante secado por pulverización.

El producto obtenido de este modo, que contenía aún metionina (aproximadamente un 10 %), además de biomasa anhidra y otros productos secundarios de fermentación, era susceptible de esparcido.

Ejemplo 3

40 Partiendo del mismo material inicial se modifica el procedimiento del ejemplo 2 adicionalmente en el sentido de añadir las aguas madre y las aguas de lavado, que se producen en la separación de metionina cristalina, en una siguiente carga de nuevo al caldo de fermentación que contiene metionina (figura 3).

45 En el procedimiento, análogo por lo demás al ejemplo 2, se obtienen en la fermentación aproximadamente 1,5 kg de metionina anhidra de la cristalización con una pureza de aproximadamente un 90 %, y aproximadamente 0,5 kg de producto a partir de la biomasa desecada por pulverización con un contenido en metionina de aproximadamente un 10 %.

Ejemplo 4

Partiendo del mismo material inicial se modifica el procedimiento del ejemplo 2 adicionalmente en el sentido de añadir las aguas madre y las aguas de lavado, que se producen en la separación de metionina cristalina, a la

corriente de biomasa antes del secado por pulverización (figura 4).

5 En el procedimiento, análogo por lo demás al ejemplo 2, se produce aproximadamente 1,1 kg de biomasa que contiene metionina, que contiene aún metionina (aproximadamente un 30 %), además de biomasa anhidra y otros productos secundarios de fermentación y sales minerales. La cantidad de metionina anhidra asciende a 1,5 kg con una pureza de aproximadamente un 90 %.

Ejemplo 5

10 También es concebible una variante de procedimiento en la que una parte de aguas madre y de aguas de lavado se añaden al caldo de fermentación antes de la separación de biomasa tras la cristalización de metionina, y la otra corriente parcial se añade a la corriente de biomasa antes del secado por pulverización (combinación de ejemplo 3 y 4).

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para el aislamiento de metionina obtenida mediante fermentación,
- 5 a) calentándose un caldo de fermentación que contiene metionina, que se produce en la fermentación de un microorganismo productor de metionina, a una temperatura en el intervalo de 60 a 120°C, que es suficiente para aumentar la solubilidad de metionina en la fase líquida,
- b) obteniéndose a partir de la misma una fase líquida enriquecida en metionina, al separarse la biomasa del caldo de fermentación concentrado, y
- c) separándose por cristalización metionina, en caso dado tras concentración de la fase líquida concentrada, lavándose,
- 10 g1) en caso dado lavándose, en caso dado, siendo calentado el líquido empleado para el lavado, y
- g3) secándose la biomasa separada en la etapa b).
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, seleccionándose en la etapa a) condiciones que son suficientes para disolver esencialmente por completo metionina.
- 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, calentándose a una temperatura en el intervalo de 70 a 100°C.
- 15 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes,
- d) separándose la metionina cristalizada,
- e) lavándose en caso dado la metionina sólida separada, y
- f) en caso dado secándose.
- 20 5.- Procedimiento según la reivindicación 1,
- reuniéndose g2) el líquido de lavado que se produce en la etapa g1) con la fase líquida enriquecida en metionina de la etapa b).
- 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5,
- 25 d1) reuniéndose con la fracción líquida que contiene metionina de otra carga de fermentación, con un microorganismo productor de metionina; o
- d2) añadiéndose a la biomasa separada de la misma u otra carga de fermentación, con un microorganismo productor de metionina antes del secado según la etapa g3),
- las aguas madre producidas en la etapa d).
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6,
- 30 e1) reuniéndose con la fracción líquida que contiene metionina de otra carga de fermentación, con un microorganismo productor de metionina; o
- e2) añadiéndose a la biomasa separada de la misma u otra carga de fermentación, con un microorganismo productor de metionina antes del secado según la etapa g3),
- el líquido de lavado producido en la etapa e).
- 35 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el secado según la etapa g3) un paso de secado por pulverización.
- 9.- Procedimiento para la obtención por fermentación de metionina, fermentándose un microorganismo natural o recombinante, y aislándose la metionina formada conforme a un procedimiento según una de las reivindicaciones

precedentes.

10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, siendo seleccionado el microorganismo productor de metionina entre bacterias naturales o recombinantes de la especie *Corynebacterium*.

11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, aislándose L-metionina.

5 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, empleándose el producto anhidro de la etapa g3) en un paso adicional para la obtención de un pienso o un complemento para pienso.

13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, empleándose la metionina aislada en un paso adicional para la obtención de un producto alimenticio o pienso, o complemento de producto alimenticio o pienso que contiene L-metionina.

10 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, empleándose biomasa y metionina en un paso adicional para la obtención de un aditivo de alimentación.

15.- Procedimiento según la reivindicación 14, empleándose el aditivo de alimentación en un paso adicional para la obtención de una composición de pienso.

Fig. 1

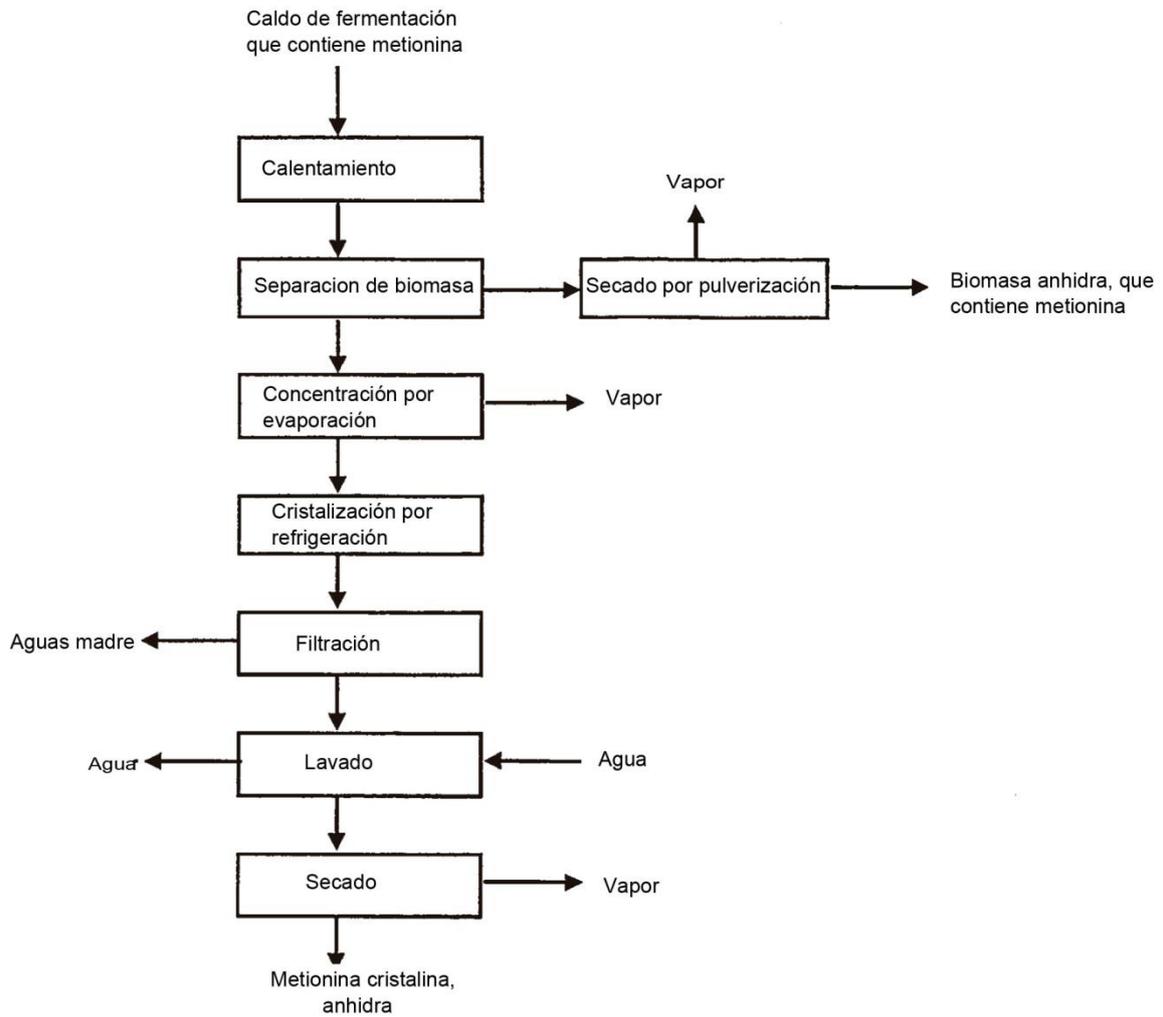


Fig. 2

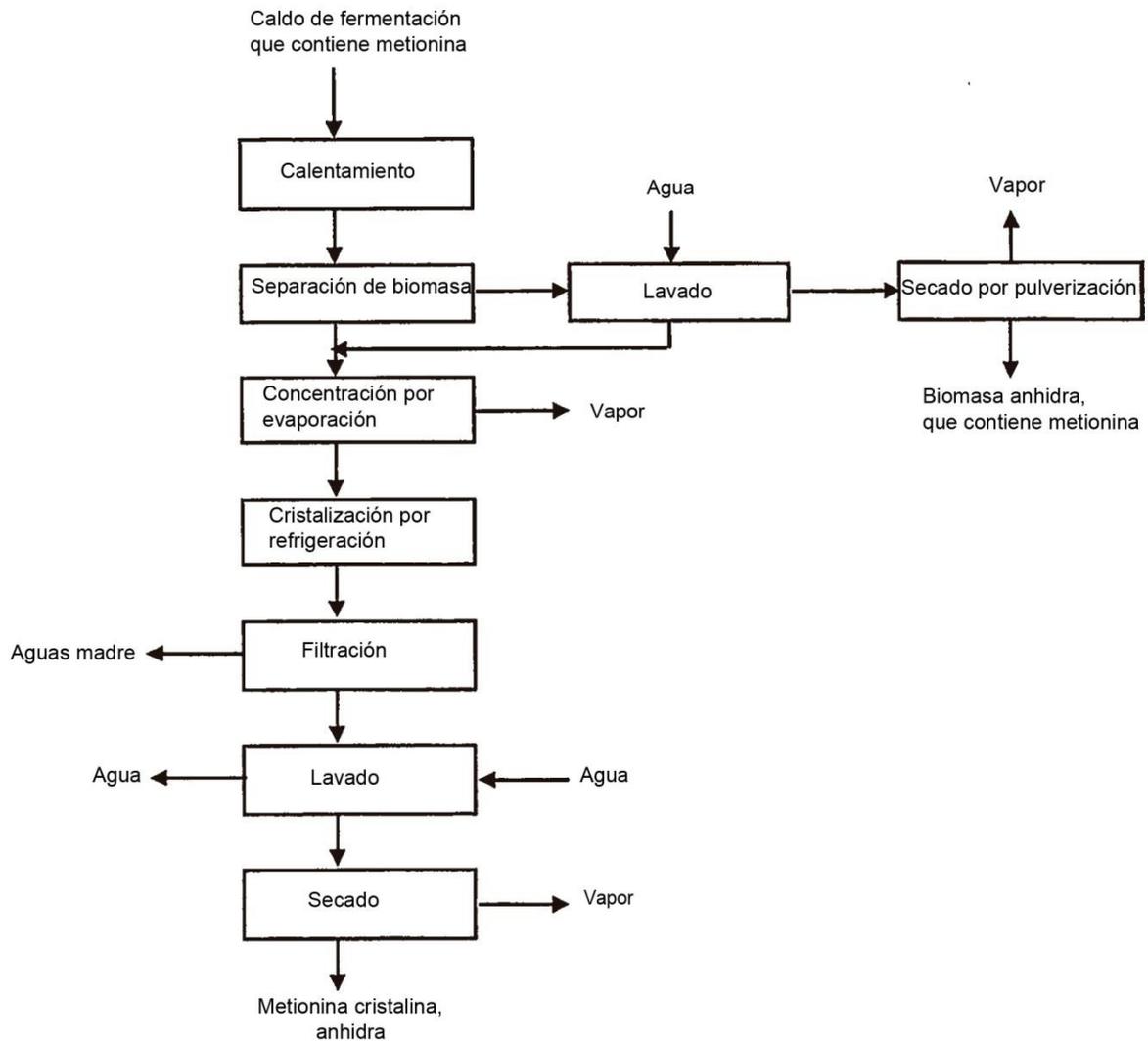


Fig. 3

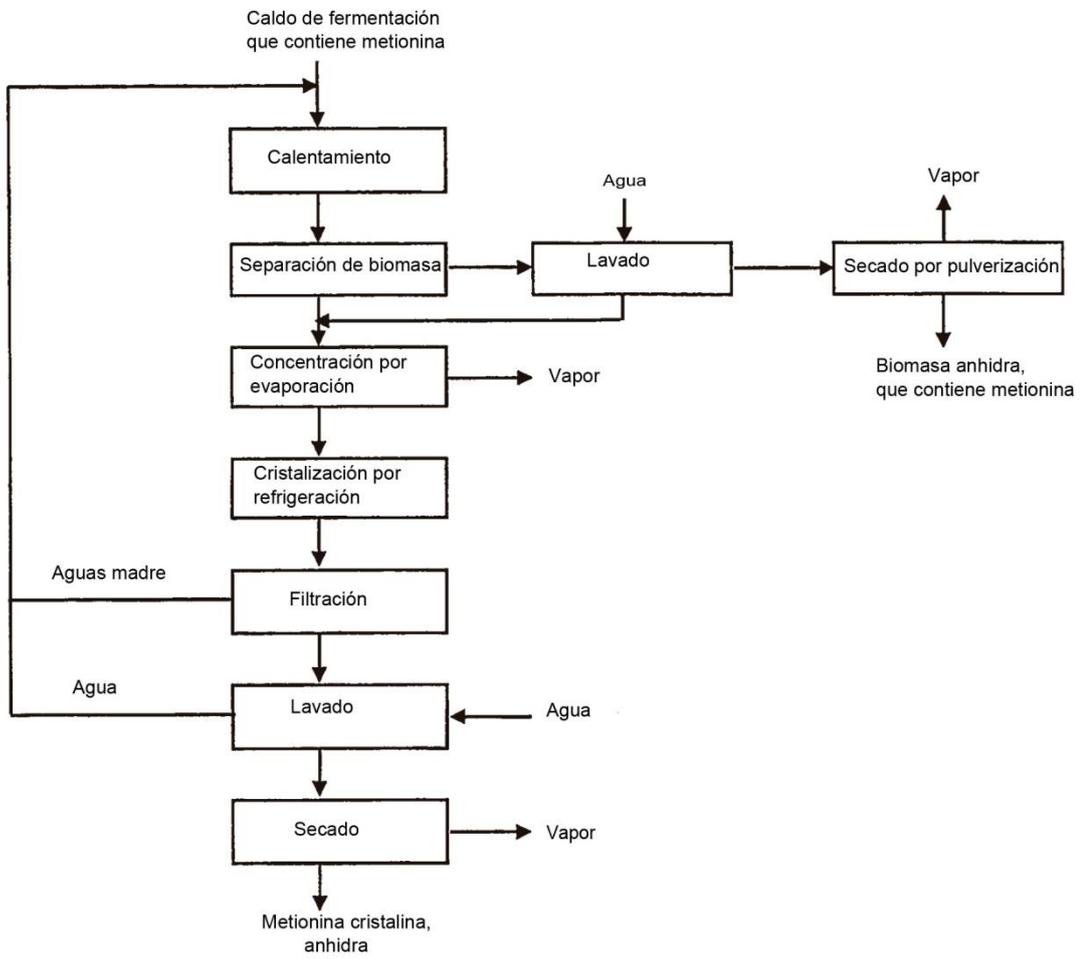


Fig. 4

