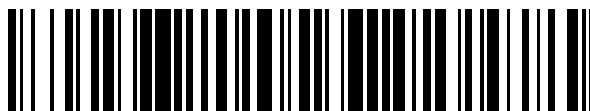


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 575**

51 Int. Cl.:

C12P 13/04	(2006.01)
C12P 13/06	(2006.01)
C12P 13/08	(2006.01)
C12P 13/10	(2006.01)
C12P 13/12	(2006.01)
C12P 13/14	(2006.01)
C12P 13/20	(2006.01)
C12P 13/22	(2006.01)
C12P 13/24	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2007 PCT/EP2007/063738**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2008 WO08077774**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07848062 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2102352**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de productos que contienen diferentes concentraciones de un compuesto preparado por vía fermentativa**

30 Prioridad:

23.12.2006 DE 102006061479

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOLL, MATTHIAS;
STOCKHAMMER, STEFAN;
ALT, HANS CHRISTIAN;
POHLISCH, JOACHIM y
HUTHMACHER, KLAUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 587 575 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 la obtención de productos que contienen diferentes concentraciones de un compuesto preparado por vía fermentativa

5 La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de al menos una sustancia diana, elegida de L-aminoácidos, en productos con contenido de diferentes concentraciones, en donde la o las sustancia dianas es (son) preparadas mediante fermentación.

10 Los alimentos para animales se complementan, en particular, con aminoácidos o vitaminas de manera correspondiente a la demanda de los animales. Para la complementación de alimentos para animales, p. ej., con L-treonina, se emplea hasta ahora una L-treonina cristalina con un contenido en sustancia activa > 98%. La L-treonina preparada mediante fermentación debe ser separada, para el aislamiento de la sustancia pura cristalina de los restantes componentes del caldo de fermentación bruto en complejas etapas de procedimiento y debe ser llevada a cristalización. En este caso debe ser eliminado como desecho un gran número de productos secundarios y los reactivos necesarios para el tratamiento. Un proceso de aislamiento de este tipo está ligado, además de ello, siempre con una pérdida del rendimiento, dado que en las corrientes de desechos no se puede evitar una porción de L-treonina. Para el uso en piensos no se necesita, sin embargo, una pureza elevada del aminoácido. Además, el caldo de fermentación contiene, a menudo, sustancias valiosas nutritivamente eficaces, de modo que parece conveniente transformar el aminoácido preparado por vía fermentativa junto con los otros componentes del caldo de fermentación en un alimento para animales sólido.

20 Procedimientos para la preparación fermentativa de L-aminoácidos y su purificación son conocidos desde hace tiempo. La preparación de L-treonina se describe, p. ej., en el documento US 4.278.765, la de L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina en el documento US 5.605.818 y la del ácido L-aspártico en el documento DE 1268569.

Procedimientos para la preparación de aditivos de alimentos para animales con contenido en aminoácidos sobre una base de caldos de fermentación son conocidos del documento US 4.777.051, del documento EP 0 615 693 B y del documento EP 0 533 039 B.

25 El documento US 4.777.051 da a conocer un procedimiento de secado por pulverización con una etapa de secado adicional dispuesta a continuación. Disoluciones del triptófano y treonina de diferente origen con un contenido en L-aminoácidos de 20 – 60% en peso, referido al contenido total de sólidos, se rocían en una primera etapa para formar un granulado semi-seco con una humedad residual de 5-15%. A continuación, el granulado húmedo se distribuye sobre un secador de cinta transportadora con suelo perforado y se seca finalmente con aire caliente, obteniéndose un producto con una humedad residual de aproximadamente 4% en peso.

30 Conforme al documento EP 0 615 693, la granulación se lleva a cabo asimismo en un procedimiento de secado de dos etapas.

35 El caldo de fermentación se seca por pulverización, después de la separación de una parte de las sustancias constitutivas, para formar un grano fino que, al menos en un 70% en peso, tiene un tamaño máximo de partícula de 100 µm, y el grano fino, así obtenido, se constituye en una segunda etapa para formar un granulado que contiene, al menos en parte, 30% en peso de grano fino.

40 A partir del documento EP 0 809 940 B1 se conoce, asimismo, un procedimiento para la granulación de un aditivo de alimentos para animales sobre la base de un caldo de fermentación. El procedimiento se caracteriza por que el caldo de fermentación se granula en un lecho fluido en una etapa, se compacta y se seca, mientras que en el lecho fluido se incorpora por vía mecánica, para el ajuste de un diámetro deseado del grano y de una densidad aparente deseada, una cantidad de energía suficiente adicionalmente a la energía requerida para la creación del lecho fluido estacionario.

Estos procedimientos tienen en común, que

- 45 a) los microorganismos productores de la sustancia diana deseada se fermentan en un medio adecuado y allí se acumula (accumulated) la sustancia diana,
- b) a continuación, la biomasa formada durante la fermentación se separa en su totalidad o en parte,

- c) la disolución o suspensión, así obtenida, se concentra mediante separación de agua y
- d) a partir de ello, mediante medidas conocidas tales como p. ej., granulación, granulación por pulverización o granulación por constitución se obtiene un producto sólido con contenido en esta sustancia diana.

5 El contenido en sustancia diana del caldo de fermentación se analiza ventajosamente después de finalizada la fermentación, dado que, en virtud de diferentes circunstancias, los rendimientos de los procedimientos de fermentación pueden oscilar. Estas oscilaciones se compensan (estandarización) mediante la adición de sustancia diana en el caso de concentraciones demasiado bajas en el producto o mediante la adición de aditivos inertes en el caso de una concentración elevada. En el caso de estos procedimientos, repercute negativamente sobre los costes de transporte el contenido de sustancias extrañas procedentes de la fermentación en el producto. La ventaja de estos procedimientos estriba en que el producto contiene la cantidad total de la sustancia diana, dado que mediante la separación de las aguas madres no se manifiesta una pérdida de rendimiento tal como la que se necesita en el caso del aislamiento del compuesto diana puro separado por cristalización.

Dado que no contienen partes extrañas, en el caso de los compuestos diana purificados resultan, referidos a la porción de sustancia activa, escasos costes de transporte durante el suministro.

15 Además, en el caso del aislamiento del producto diana cristalino se suprime la necesidad arriba descrita de la estandarización de la concentración en el caldo de fermentación.

Misión de la invención es proporcionar un procedimiento que evite ampliamente o por completo las pérdidas de rendimiento habituales en el tratamiento para dar un producto diana bruto y que posibilite la preparación de un producto sólido y de un producto sólido con una menor proporción de sustancia diana.

20 Objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de productos que contienen al menos una sustancia diana producida de modo fermentativo en varias etapas de procedimiento, en las que

- a) los microorganismos productores de la sustancia diana deseada se fermentan en un medio adecuado y allí se acumula la sustancia diana,
- b) a continuación, se separa por completo la biomasa formada durante la fermentación,
- 25 c) la disolución o suspensión, así obtenida, se concentra mediante la separación de agua y la sustancia diana precipita, en particular se deja que se separe por cristalización,
- d) la sustancia diana precipitada o bien separada por cristalización se separa,
- e) la sustancia diana con contenido en disolución separada, designada como aguas madres I, se transforma en la forma de producto deseada, mientras que
- 30 f) se reduce el contenido en agua de las aguas madres I mediante evaporación y a partir de las aguas madres I concentradas se deja que la sustancia diana se separe por cristalización, los cristales se separan y
- g) éstos se introducen de nuevo directamente en el proceso después de la separación completa de la biomasa a partir del caldo de fermentación empleado, y
- 35 h) las aguas madres II obtenidas después de la separación de la sustancia diana se desechan o se devuelven en su totalidad o en parte a las aguas madres I, elaborándose como sustancias dianas L-aminoácidos producidos de forma fermentativa.

Las Figuras 1 y 2 reproducen dos variantes diferentes para el tratamiento de las aguas madres I.

40 De la sustancia diana respectiva queda, en función de las condiciones dadas, un resto disuelto en las aguas madres I separadas.

Su concentración se puede controlar, p. ej., a través de las relaciones conocidas para las distintas sustancias entre temperatura, concentración y comportamiento en disolución. La cantidad de sustancia diana disuelta en las aguas

5 madres debería ajustarse de modo que el producto sólido obtenido a partir de estas aguas madres I presente un contenido en sustancia diana, atractivo para el usuario, de 40 a 85% en peso, preferiblemente de 60 a 85% en peso de la masa seca (secada a 80-90°C). Junto a ello, se obtienen, p. ej., de la etapa e) de la Fig. 1, una sustancia diana pura con un contenido de aprox. 98 a 99% en peso de la masa seca que se transforma, de manera conocida, en un granulado o en una forma de partícula por lo demás deseada. Un procedimiento para la preparación de granulados de L-treonina puros se describe, p. ej., en el documento WO 2005/00675. En el caso de otro procedimiento, se prepara una suspensión de los cristales puros, a partir de la cual se generan a continuación granulados.

10 Las aguas madres I separadas se transforman, en una variante, en un producto que contiene los otros componentes disueltos del caldo de fermentación adicionales, no separados durante la separación de la biomasa junto a la sustancia diana. En este caso, estas aguas madres se concentran mediante evaporación de agua, y la sustancia diana precipita de manera correspondiente al comportamiento en disolución condicionado por sus propiedades físico-químicas. Energéticamente, es más favorable separar en este punto del procedimiento agua, con el fin de no solicitar al subsiguiente proceso de granulación con agua a separar sólo bajo un elevado coste (etapas 6, 7, 8 en la Fig. 1).

15 En una variante, la suspensión que se forma se muele en húmedo y se granula. Sin embargo, también se pueden emplear otros procedimientos para la granulación. El contenido en sustancia diana de este granulado que contiene otros componentes del caldo de fermentación, se puede aumentar al valor deseado en el producto final mediante la adición de la sustancia diana en forma sólida o disuelta, cuando el contenido en las aguas madres I no alcance este valor. La sustancia diana se añade a las aguas madre I preferiblemente antes de su concentración mediante evaporación de agua en la cantidad deseada (en la etapa 6 en la Fig. 1). En este caso, se trata preferiblemente del sólido separado en la separación sólido-líquido (etapa 3).

20 En una variante de acuerdo con la invención, las aguas madres I se concentran asimismo mediante evaporación de agua, pero la sustancia diana precipita preferiblemente mediante cristalización por enfriamiento y se separa de las aguas madres II así resultantes (etapa 8 en la Fig. 2).

25 Éstas se desechan o se devuelven en parte a las aguas madres I. En este caso, se evita que productos secundarios se acumulen de forma perturbadora en el circuito.

30 Los cristales que resultan durante este tratamiento no son adecuados, por lo general, como producto de venta. Se les introduce, en una variante del procedimiento preferida, directamente después de la separación de la biomasa, del caldo de la fermentación, durante o después de la concentración del caldo de fermentación libre entonces de biomasa de nuevo al procedimiento y, de esta forma, se aumenta la concentración de la sustancia diana en este caldo. Conforme a la Fig. 2, el retorno al proceso tiene lugar según la etapa 1 en la etapa 2.

35 Las relaciones cuantitativas de las corrientes parciales se pueden explicar en el siguiente ejemplo, en el que tiene lugar la preparación de una sustancia diana pura y de un producto que contiene a esta sustancia diana en un 80% en peso, referido a la masa seca. Después de la separación de la biomasa se obtiene, p. ej., un filtrado que en 100 kg de masa seca contiene 90 kg de la sustancia diana, p. ej., L-treonina, y 10 kg de componentes sólidos del caldo de fermentación. Esto se puede comprobar fácilmente mediante análisis. Las relaciones de disolución en el filtrado se ajustan de manera que de la sustancia diana se separen por cristalización 50 kg. Los restantes 40 kg se encuentran entonces con los 10 kg de producto secundario en las aguas madres. A partir de ello, a través del procedimiento mostrado en la Fig. 1, se puede obtener un producto seco al 80% en peso. Una separación de este tipo de las corrientes cuantitativas que conducen a productos con diferentes contenidos en sustancia diana se designa como disociación del producto.

40 El procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para L-aminoácidos preparables por vía fermentativa que se pueden separar mediante cristalización o precipitación del caldo de fermentación liberado de la biomasa, en particular L-treonina, L-homoserina, L-triptófano, L-valina, L-arginina, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina y L-tirosina, pero en particular, L-treonina. También se puede elaborar de acuerdo con la invención L-lisina producida de forma fermentativa. El procedimiento no está limitado por el género, familia o especie de los microorganismos empleados.

45 Microorganismos productores de las sustancias diana, empleados de acuerdo con la invención, se eligen preferiblemente de los géneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Lactobacillus*, en particular de las cepas *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* o *Aspergillus niger*.

La producción acoplada de acuerdo con la invención, en la que se obtiene una fracción de la sustancia diana en una forma pura, preferiblemente cristalina y en otra fracción que contiene componentes secundarios de la fermentación y la sustancia diana, está ligada con las siguientes ventajas:

- 5 - Prevenición de pérdidas de rendimiento ligadas con la única orientación a la sustancia diana pura mediante el tratamiento insuficiente de las aguas madres.
- Prevenición de elevados costes de transporte que resultan cuando el procedimiento sólo está orientado a la preparación de un producto con contenido de todos los componentes secundarios de la fermentación, en el que para largos canales de comercialización se utiliza preferiblemente la forma de producto cristalina y pura de la producción acoplada.
- 10 - Estandarización sencilla del contenido en sustancia activa en la porción de producto provista de componentes secundarios mediante un control adecuado del proceso (es decir, no es necesaria adición alguna de una sustancia inerte).
- 15 - Costes de energía reducidos en comparación con un procedimiento con la preparación de un único producto que contenga los componentes secundarios de la fermentación, dado que el secado de gran consumo de energía y la granulación sólo se aplica a una corriente parcial en el proceso.

Explicación de las figuras que reproducen a modo de ejemplo el procedimiento:

Fig. 1: Disociación del producto

- 1 separación de la biomasa, preferiblemente mediante ultrafiltración
- 2 concentración por evaporación y separación por cristalización, eventualmente en una etapa
- 20 3 separación sólido-líquido (aguas madres I)
- 4 tratamiento de los cristales separados, p. ej., granulación y secado
- 5 Sustancia diana pura
- 6 concentración por evaporación y separación por cristalización de las aguas madres I separadas
- 7 separación de la suspensión resultante: molienda en húmedo
- 25 8 granulación
- 9 producto 2: que contiene sustancia diana y componentes secundarios del caldo de fermentación

Fig. 2: Obtención de producto cristalino

- 1 separación de la biomasa mediante ultrafiltración
- 30 2 incorporación de los cristales de 9
- 3 concentración por evaporación y separación por cristalización, eventualmente en una etapa
- 4 separación sólido-líquido (aguas madres I)
- 5 tratamiento de los cristales separados, p. ej., mediante granulación y secado
- 6 producto I: sustancia diana pura

ES 2 587 575 T3

- 7 concentración por evaporación y separación por cristalización de las aguas madres (I)
 - 8 eventualmente, también separación por cristalización, mediante cristalización por refrigeración
 - 9 separación sólido-líquido
 - 10 retorno de una corriente parcial de las aguas madres II formadas en este caso según 7.
- 5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de productos que contienen al menos una sustancia diana producida de modo fermentativo en varias etapas de procedimiento, en las que
- 5 a) los microorganismos productores de la sustancia diana deseada se fermentan en un medio adecuado y allí se acumula la sustancia diana,
- b) a continuación, se separa por completo la biomasa formada durante la fermentación,
- c) la disolución o suspensión, así obtenida, se concentra mediante la separación de agua y la sustancia diana precipita, en particular se deja que se separe por cristalización,
- d) la sustancia diana precipitada o bien separada por cristalización se separa,
- 10 e) la sustancia diana con contenido en disolución separada, designada como aguas madres I, se transforma en la forma de producto deseada, mientras que
- f) se reduce el contenido en agua de las aguas madres I mediante evaporación y a partir de las aguas madres I concentradas se deja que la sustancia diana se separe por cristalización, los cristales se separan y
- 15 g) éstos se introducen de nuevo directamente en el proceso después de la separación completa de la biomasa a partir del caldo de fermentación empleado, y
- h) las aguas madres II obtenidas después de la separación de la sustancia diana se desechan o se devuelven en su totalidad o en parte a las aguas madres I, elaborándose como sustancias dianas L-aminoácidos producidos de forma fermentativa.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que a las aguas madres I se añade sustancia diana pura.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que en el caso de la sustancia diana se trata de compuestos elegidos del grupo L-treonina, L-homoserina, L-triptófano, L-valina, L-arginina, L-metionina, L-leucina, L-soleucina y L-tirosina.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que
- 25 a) L-treonina se prepara mediante fermentación conforme a la reivindicación 1 a) a 1 d) y se separa,
- b) la L-treonina separada se granula y se obtiene un granulado con un contenido en L-treonina de aprox. 98 a 99% en peso.

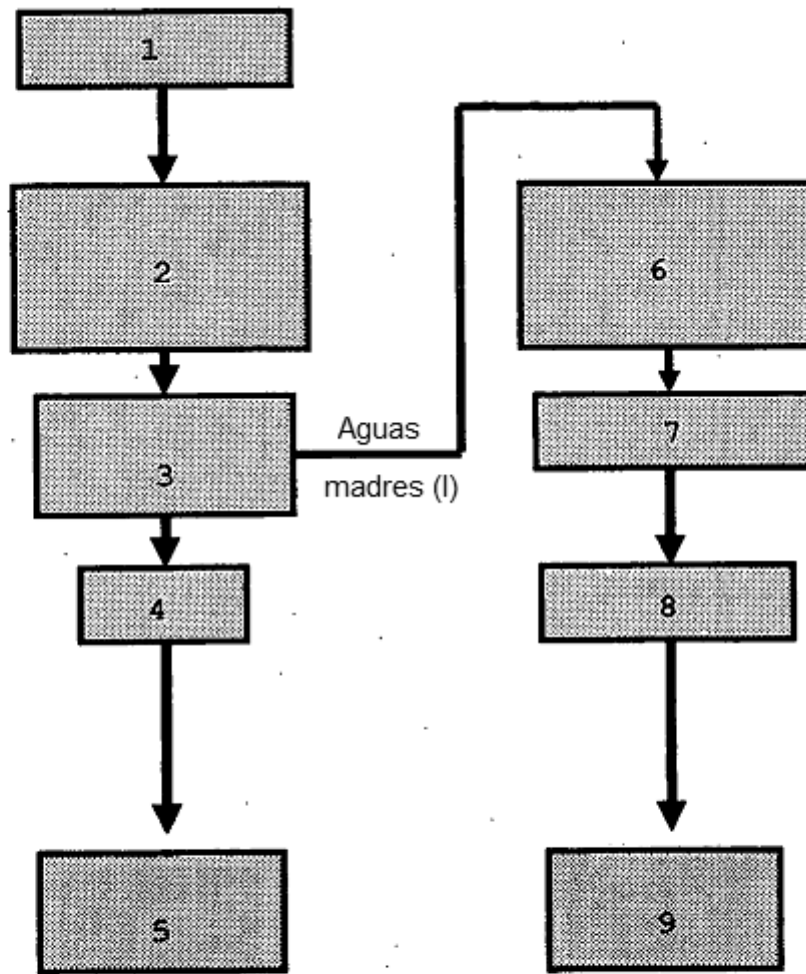


Fig. 1: Disociación del producto

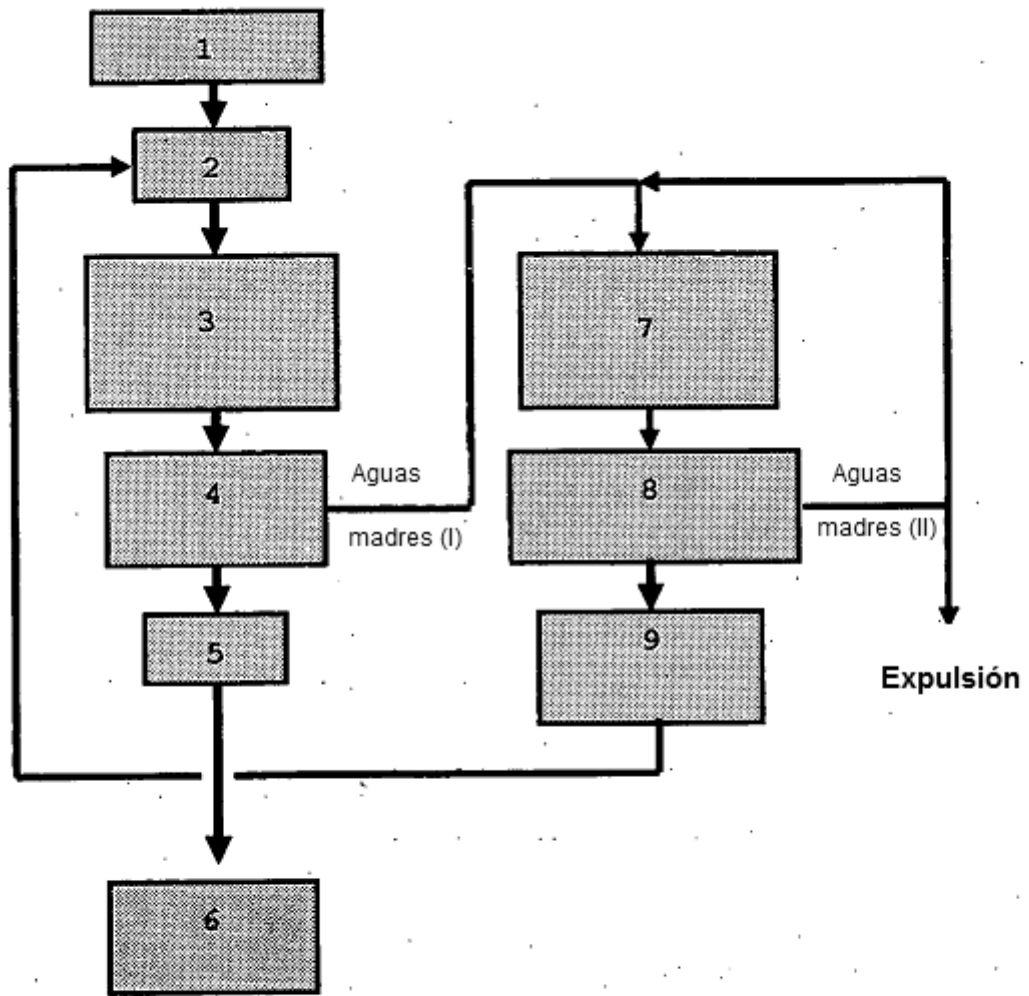


Fig. 2: Producto cristalizado