

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 480**

51 Int. Cl.:

A23K 10/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2016 PCT/KR2016/002586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16148488**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2016 E 16765244 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.03.2021 EP 3272225**

54 Título: **Composición de aditivo para pienso y composición de pienso para animales que lo contiene**

30 Prioridad:

16.03.2015 KR 20150036260

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

27.10.2021

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 04560, KR**

72 Inventor/es:

**HEO, IN KYUNG;
SON, SUNG KWANG;
CHOI, JIN GEUN;
KIM, SO YOUNG;
SHIN, YONG UK;
LEE, JAE HEE;
SUNG, JIN WOO;
LEE, YOUN JAE;
RIM, JIN SEONG y
JUNG, JUN YOUNG**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 870 480 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 de aditivo para pienso y composición de pienso para animales que lo contiene

5 [Campo Técnico]

La presente invención, refiere una composición de aditivo para pienso y una composición de pienso para animales que lo contiene.

10 [Antecedentes]

La metionina es un aminoácido esencial en los mamíferos, y se usa como materia prima para la producción de piensos para animales, aditivos alimentarios, soluciones de infusiones farmacéuticas y fármacos farmacéuticos, etc. La metionina puede producirse por síntesis química o síntesis biológica.

15 En un método para la síntesis química de la metionina, la D, L-metionina, se produce principalmente por hidrólisis de 5- (β -metilmercaptoetil)-hidantoína).

20 Como un ejemplo de un método para síntesis biológica, la patente de Estados Unidos núm. 7745195 B2, describe un método en el que un microorganismo obtenido por mutación de cistationina sintasa produce directamente homocisteína o metionina mediante el uso de H_2S o CH_3SH , sin usar cisteína. Además, la patente coreana núm. 10-0905381, describe un proceso de dos etapas que comprende producir un precursor de L-metionina por fermentación microbiana, y producir L-metionina mediante una reacción de conversión enzimática mediante el uso del precursor de L-metionina producido como un sustrato. El documento US2012/178966A1, describe un método para producir L-metionina por procesamiento enzimático y su uso en piensos.

30 La metionina convencional producida químicamente, existe como una mezcla de D-metionina y L-metionina y, por lo cual, se requiere un costoso proceso de purificación adicional para separar sólo L-metionina de la mezcla. Mientras tanto, la metionina que es producida directamente por microorganismos a través de síntesis biológica tiene la ventaja de ser la forma L de la metionina, pero tiene la desventaja de que se produce en cantidades muy pequeñas, es difícil de producir a gran escala por fermentación, y es también es difícil de obtener como un producto uniforme por fermentación. Por esta razón, los aditivos para pienso convencionales y económicos no podrían contener L-metionina como componente principal.

35 Documentos de la técnica anterior

Documentos de patentes

40 Documento de patente 1: US 7745195 B2 (publicado el 29 de junio de 2010);
Documento de patente 2: KR 10-0905381 B1 (publicado el 30 de junio de 2009).

[Descripción]

45 [Problema Técnico]

50 En consecuencia, los presentes inventores han conducido estudios extensos para superar los problemas descritos anteriormente, y como resultado, han obtenido una gran cantidad de L-metionina mediante la producción de un precursor de L-metionina mediante fermentación microbiana, y la conversión del precursor de L-metionina en L-metionina, por reacción enzimática. Luego, los presentes inventores han desarrollado un proceso de purificación para el producto de la reacción enzimática, y han encontrado que el proceso de purificación desarrollado hace posible obtener una composición que tiene una calidad uniforme y un alto contenido de L-metionina, y que un aditivo para pienso que contiene esta composición, que exhibe excelentes efectos en animales, completando de esta manera la presente invención.

55 Por tanto, un objeto de la presente invención, es para proporcionar una composición de aditivo para pienso, que tiene un alto contenido de L-metionina.

Otro objeto de la presente invención, es para proporcionar una composición de pienso para animales que contiene la composición de aditivo para pienso.

60 [Solución técnica]

65 Para lograr los objetivos anteriores, la presente invención proporciona una composición de aditivo para pienso que comprende de 60 a 99,90 % en peso de L-metionina, de 0,05 a 5 % en peso de L-fenilalanina y 0,01 al 3 % en peso de L-tirosina.

La presente invención también proporciona una composición de pienso para animales, que comprende la composición de aditivo para pienso.

[Efectos Ventajosos]

5 De acuerdo con la presente invención, se produce una gran cantidad de L-metionina, mediante la producción de un precursor de L-metionina por fermentación microbiana y la conversión del precursor de L-metionina en L-metionina, por una reacción enzimática, y la L-metionina producida, se cristaliza. Por lo cual, la presente invención proporciona ventajosamente una composición de aditivo para pienso que tiene un alto contenido de L-metionina, que puede mejorar la nutrición animal en comparación con los aditivos para pienso convencionales, y una composición de pienso para animales que contiene la composición de aditivo para pienso.

[Modo para llevar a la práctica la invención]

15 En lo adelante, la presente invención se describirá en detalle.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de aditivo para pienso que tiene un alto contenido de L-metionina.

20 La composición que tiene un alto contenido de L-metionina, tiene un contenido aumentado de L-metionina. Específicamente, la composición puede comprender L-metionina, L-fenilalanina y L-tirosina. Además, la composición que tiene un alto contenido de L-metionina, puede comprender además uno o más componentes nutritivos adicionales, con exclusión de L-metionina, L-fenilalanina y L-tirosina. En la presente descripción, los componentes nutritivos pueden incluir, pero no se limitan a, otros aminoácidos (con exclusión de L-metionina, L-fenilalanina y L-tirosina), acetato, y ion.

25 En la presente invención, la composición puede producirse por cualquier método que permita que la composición contenga una gran cantidad de L-metionina. Por ejemplo, la composición puede producirse por la producción de L-metionina, de acuerdo con un método de producción de L-metionina que comprende un proceso de dos etapas descrito en las patentes de la técnica anterior, y cristalizando la L-metionina producida, pero no se limita a ello.

Específicamente, el método de producción de L-metionina que comprende el proceso de dos etapas, se describe en las patentes coreanas núms. 10-0905381, 10-0905381, 10-1136289, 10-1117012, 10-1200179, 10-1250651

35 Más específicamente, el método de producción de L-metionina que comprende el proceso de dos etapas, comprende las etapas de: (1) cultivar una cepa productora de precursores de L-metionina en un medio para producir un precursor de L-metionina; y (2) adicionar un antígeno al precursor de L-metionina producido en la etapa (1), seguido por una reacción enzimática para producir L-metionina.

40 Primero, el precursor de L-metionina puede producirse cultivando un microorganismo mutante o recombinante, que es capaz de producir el mismo, en un medio adecuado. Específicamente, los ejemplos del precursor de L-metionina incluyen, pero no se limitan a, O-acilhomoserina, por ejemplo, O-acetilhomoserina, O-succinilhomoserina, propionil homoserina, acetoacetil homoserina, cumaroil homoserina, malonil homoserina, hidroximetilglutariol homoserina, o pimelilhomoserina. Más específicamente, el precursor de L-metionina puede ser O-acetilhomoserina u O-succinilhomoserina. Incluso más específicamente, el precursor de L-metionina puede ser O-acetilhomoserina.

45 El proceso para cultivar la cepa productora de precursores de L-metionina puede realizarse mediante el uso de un medio adecuado y condiciones de cultivo conocidas en la técnica, y puede ajustarse fácilmente, de acuerdo con el tipo de cepa seleccionada por los expertos en la técnica. Los ejemplos del método de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo y cultivo continuo. Una variedad de métodos de cultivo, se describen, por ejemplo, en "Biochemical Engineering" de James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, págs. 138-176.

50 El medio debe cumplir adecuadamente los requisitos de una cepa específica. Una variedad de medios de cultivo microbianos se describe en, por ejemplo, "Manual of Methods for General Bacteriology", por la Sociedad Estadounidense de Bacteriología, Washington DC, EE. UU., 1981. El medio de cultivo puede contener varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. Los ejemplos de las fuentes de carbono incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético.

55 Estas fuentes de carbono pueden usarse solas o en combinación. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno incluyen, pero no se limitan a, fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz (CSL) y harina de frijoles; y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación. El medio puede contener adicionalmente, como una fuente de fosfato, un dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio y las correspondientes sales que contienen sodio, pero sin limitación. Además, el medio puede contener una sal metálica tal como, pero sin limitarse a, sulfato de

magnesio o sulfato de hierro. Además, pueden adicionarse al medio, aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados, pero no se limitan a ellos. Estos medios o precursores, pueden adicionarse al cultivo de manera discontinua o continua.

5 Pueden adicionarse al medio de manera adecuada durante el cultivo para ajustar el pH del cultivo, compuestos tales como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Además, durante el cultivo, puede usarse un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso para inhibir la generación de burbujas. Además, para mantener el cultivo bajo condiciones aeróbicas, puede inyectarse oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo.

10 La temperatura del cultivo es generalmente de 20 a 45 °C, preferentemente de 25 a 40 °C. El período de cultivo puede continuarse hasta que la producción de precursor de L-metionina alcance el nivel deseado. El período de cultivo es preferentemente de 10 a 160 horas, y con mayor preferencia de 15 a 80 horas.

15 A continuación, pueden producirse L-metionina y ácido orgánico mediante una reacción de conversión enzimática mediante el uso del precursor de L-metionina, producido por la cepa productora del precursor de L-metionina, una fuente de azufre como sustratos, y mediante el uso de una enzima convertidora o una cepa enzima convertidora que lo contiene. La enzima convertidora puede ser una enzima que usa una fuente de azufre como un sustrato. Específicamente, la enzima convertidora puede ser una enzima que tiene actividad de cistationina sintasa, actividad de O-succinilhomoserina sulfhidrilasa o actividad de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa. Más específicamente, la enzima convertidora puede ser una enzima que tiene actividad de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa. La fuente de azufre puede ser un material que proporciona un elemento de azufre. Específicamente, la fuente de azufre puede ser metilmercaptano o su sal. Más específicamente, la fuente de azufre puede ser metilmercaptano.

25 En una modalidad, la L-metionina puede producirse mediante una reacción enzimática mediante el uso de O-succinilhomoserina u O-acetilhomoserina, acumulada por fermentación microbiana, una fuente de azufre (tal como metilmercaptano) como sustratos, y mediante el uso de una enzima tal como cistationina gamma sintasa, O-succinilhomoserina sulfhidrilasa u O-acetilhomoserina sulfhidrilasa. Específicamente, pueden producirse L-metionina y acetato mediante el uso de O-acetilhomoserina y metilmercaptano como sustratos, y mediante el uso de O-acetilhomoserina sulfhidrilasa.

30 Las secuencias de los genes que codifican las enzimas que tienen actividades están fácilmente disponibles en bases de datos, tales como el Centro Nacional de Biotecnología (NCBI) y la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG).

35 La L-metionina producida por el método descrito anteriormente, puede aislarse y purificarse por cristalización, de esta manera proporciona una composición que tiene un alto contenido de L-metionina, de acuerdo con la presente invención.

40 Específicamente, un método para la cristalización de L-metionina puede comprender las etapas de:
 a) concentrar una solución de reacción que contiene metionina, separar los cristales de metionina de la solución concentrada, y luego recuperar las aguas madres; y
 b) producir gránulos a partir de los cristales de metionina separados como semillas, y secar los gránulos producidos para obtener polvo de metionina.

45 De acuerdo con una modificación del método de cristalización, las aguas madres separadas en la etapa a) son:
 a-1) concentradas, cristalizadas y mezcladas con los cristales de metionina separados en la etapa b), seguido por lavado y secado; o
 a-2) concentradas, cristalizadas, disueltas y luego adicionadas a otra solución de reacción que contiene metionina.

50 Además, el método de cristalización puede comprender además, antes de la etapa a), una etapa para ajustar la solución de reacción que contiene metionina a un pH de 4,0 a 5,5, y también puede comprender además, después de la etapa de ajustar el pH, una etapa para filtrar la reacción que contiene metionina a través de carbón activado.

55 En una modalidad, para obtener una composición que tiene un alto contenido de L-metionina, de acuerdo con la presente invención, la solución de reacción que contiene L-metionina, obtenida por la reacción de conversión enzimática, se concentra hasta que la concentración de metionina en la solución de reacción alcanza 150-200 g/L. Alternativamente, la solución de reacción que contiene L-metionina, se titula a un pH de 4,0 a 5,5 por adición de ácido sulfúrico, y luego se concentra. Después de la concentración, los cristales de metionina se separan mediante el uso de un separador de cristales, y se recuperan las aguas madres (ML) restantes. Los cristales de metionina separados se usan como semillas, y las aguas madres se pulverizan y secan sobre las semillas en un granulador para producir polvo, de esta manera se obtiene una composición que tiene un alto contenido de L-metionina. El contenido de L-metionina en la composición que contiene L-metionina obtenida de esta manera puede ser de aproximadamente 60 a 70 % en peso en base al peso total de la composición.

65 En otra modalidad, para obtener una composición que tiene un alto contenido de L-metionina, de acuerdo con la presente invención, la solución de reacción que contiene L-metionina, obtenida por la reacción de conversión

enzimática, se concentra hasta que la concentración de metionina en la solución de reacción alcanza 150-200 g/L. Alternativamente, la solución de reacción que contiene L-metionina, se titula a un pH de 4,0 a 5,5 por adición de ácido sulfúrico, y luego se concentra. Después de la concentración, los cristales primarios se separan de la solución concentrada por un separador de cristales, y se recuperan las aguas madres restantes. Las aguas madres recuperadas se concentran hasta que la concentración de metionina en ellas alcanza 150-200 g/L, y los cristales secundarios se separan de las aguas madres concentradas. Los cristales primarios y secundarios obtenidos, se mezclan entre sí, se lavan y secan, de esta manera se obtiene una composición que tiene un alto contenido de L-metionina. El contenido de L-metionina en la composición que contiene L-metionina obtenida de esta manera puede ser aproximadamente 80 a 95 % en peso en base al peso total de la composición.

En aún otra modalidad, para obtener una composición que tiene un alto contenido de L-metionina, de acuerdo con la presente invención, la solución de reacción que contiene L-metionina, obtenida mediante la reacción de conversión enzimática, se titula a un pH de 4,0-5,5 por adición de ácido sulfúrico. Luego, se adiciona carbón activado a la solución de reacción en una cantidad de 0,5-2 % en peso, en base al peso de metionina, y la mezcla se agita a 50 °C durante 1-2 horas, y luego se filtra para eliminar el carbón activado e impurezas. El filtrado se concentra hasta que la concentración de metionina en él alcanza 150-200 g/L. Los cristales de metionina primaria se separan del filtrado concentrado por un separador de cristales. Las aguas madres restantes vuelven a concentrarse hasta que la concentración de metionina en ellas alcanza 150-200 g/L, de esta manera se obtienen cristales secundarios. Los segundos cristales obtenidos se disuelven y se adicionan a otra solución de reacción que contiene L-metionina, de esta manera se obtiene una composición que tiene un alto contenido de L-metionina. El contenido de L-metionina en la composición que contiene L-metionina obtenida de esta manera, puede ser aproximadamente 95 a 99,90 % en peso en base al peso total de la composición.

El contenido de L-metionina en la composición de la presente invención, obtenido por separación y purificación como se describió anteriormente, es 60% en peso a 99,90 % en peso en base al peso total de la composición. En una modalidad, la composición puede comprender aproximadamente 60 % en peso a 70 % en peso de L-metionina. En otra modalidad, la composición puede comprender aproximadamente 80 % en peso a 95 % en peso de L-metionina. En aún otra modalidad, la composición puede comprender aproximadamente 95 % en peso a 99,90 % en peso de L-metionina.

Específicamente, la composición de aditivo para pienso que tiene un alto contenido de L-metionina, obtenida por el método de purificación como se describió anteriormente, comprende 60 a 99,90 % en peso de L-metionina, 0,05 a 5 % en peso de L-fenilalanina y 0,01 a 3 % en peso de L-tirosina.

La composición de aditivo para pienso que tiene un alto contenido de L-metionina, comprende además 0,01 a 13 % en peso de otros aminoácidos, con exclusión de L-metionina, L-fenilalanina y L-tirosina, en la que los otros aminoácidos son uno o más seleccionados del grupo que consiste en: glutamato, homoserina y O-acetilhomoserina.

El contenido de glutamato en la composición puede ser 0,01 a 11 % en peso en base al peso total de la composición.

El contenido de homoserina en la composición puede ser 0,01 a 1 % en peso en base al peso total de la composición.

El contenido de O-acetilhomoserina en la composición puede ser 0,01 a 1 % en peso en base al peso total de la composición.

Además, la composición que tiene un alto contenido de L-metionina, puede comprender además 0,01 a 20 % en peso de ion.

Además, la composición que tiene un alto contenido de L-metionina puede comprender además, más de 0 % en peso, pero menos de 2 % en peso de acetato.

La composición de aditivo para pienso que tiene un alto contenido de L-metionina, de acuerdo con la presente invención puede obtenerse mediante la separación y la purificación de L-metionina por cristalización como se describió anteriormente, pero no se limita a ello. Aunque no se describió anteriormente, los expertos en la técnica apreciarán que la composición de aditivo para pienso, de acuerdo con la presente invención puede comprender además otros componentes nutritivos.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición de pienso para animales, que comprende la composición de aditivo para pienso.

El contenido de la composición de aditivo para pienso en la composición de pienso para animales, puede determinarse por los expertos en la técnica, y puede ajustarse a un nivel adecuado en dependencia del tipo, edad y condición del animal al que se va a aplicar la composición. Específicamente, la composición de aditivo para pienso, comprende una cantidad de 0,01 a 0,5 % en peso en base al peso total de la composición de pienso para animales.

La composición de aditivo para pienso que tiene un alto contenido de L-metionina, de acuerdo con la presente invención puede incorporarse a una composición de pienso para animales convencional, y puede alimentar a, por ejemplo, ganado, cerdos, ovejas, aves de corral y similares. Para ello, la composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención puede mezclarse con componentes de pienso para animales convencionales, y, si es necesario, puede formularse como comprimidos.

Los componentes alimentarios para animales convencionales incluyen, por ejemplo, maíz, cebada, avena, soja, harina de pescado, salvado, aceite de soja, minerales, oligoelementos, aminoácidos y vitaminas.

A continuación, la presente invención se describirá con detalles adicionales con referencia a los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Fermentación de la cepa productora de precursores de L-metionina

En este ejemplo, se realizó un cultivo en un fermentador para producir un precursor de L-metionina. Para producir una gran cantidad de un precursor de metionina (O-acetilhomoserina) mediante el uso de la cepa de *E. coli* KCCM-10568 (Patente Coreana Núm. 10-0905381), que es una cepa productora de O-acetilhomoserina, como una cepa productora de precursores de metionina, se realizó un cultivo en un fermentador de 5-L. Específicamente, la cepa se inoculó en un medio de placa LB que contiene un antibiótico y se cultivó durante la noche a 31 °C. Luego, la colonia única se inoculó en 10 mL de un medio LB que contiene antibiótico, y se cultivó a 31 °C durante 5 horas. A continuación, el cultivo se diluyó 100 veces en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, que contiene 200 mL de medio de siembra precursor de metionina, seguido por cultivo a 31 °C y 200 rpm durante 3-10 horas. A continuación, el cultivo se inoculó en un fermentador de 5-L y se cultivó por fermentación alimentada discontinua durante 50-100 horas. La composición del medio de fermentación para el cultivo principal se muestra en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1: Composición del medio de fermentación para la producción de precursor de metionina

| Composición | Medio de siembra | Medio principal | Medio de alimentación |
|---|------------------|-----------------|-----------------------|
| Glucosa (g/L) | 10,1 | 40 | 600 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L) | 0,5 | 4,2 | |
| Extracto de levadura (g/L) | 10 | 3,2 | |
| KH ₂ PO ₄ | 3 | 3 | 8 |
| Sulfato de amonio (g/L) | | 6,3 | |
| NH ₄ Cl (g/L) | 1 | | |
| NaCl (g/L) | 0,5 | | |
| Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (g/L) | 5,07 | | |
| DL-metionina (g/L) | | 0,5 | 0,5 |
| L-isoleucina (g/L) | 0,05 | 0,5 | 0,5 |
| L-Treonina (g/L) | | 0,5 | 0,5 |

Ejemplo 2: Reacción de conversión de metionina

El producto de fermentación producido en el Ejemplo 1, se filtró mediante filtración por membrana para separar un medio que contiene O-acetilhomoserina de las células. El líquido que pasó a través de la membrana de 0,1 µm, es decir, el líquido restante después de la separación de las células, se denominó permeado y el lodo celular se denominó retenido.

Se adicionó agua desionizada al retenido para recuperar la O-acetilhomoserina restante en el retenido.

Al permeado, se adicionó metilmercaptano y O-acetilhomoserina sulfhidrilasa o O-acetilhomoserina sulfhidrilasa derivada de *Rhodobacter sphaeroides* (Patente Coreana Núm. 10-1250651), como una enzima para la conversión en L-metionina, seguido por una reacción de conversión enzimática mediante el uso de una enzima que tiene actividad O-acetilhomoserina sulfhidrilasa, o una cepa que contiene la enzima.

Durante la reacción, se midió la concentración de la O-acetilhomoserina restante, y se llevó a cabo la reacción de conversión enzimática durante 6 horas por suministro de metilmercaptano. Cuando no se midió la concentración de O-acetilhomoserina, se terminó la reacción.

5 Ejemplo 3: Proceso de cristalización de L-metionina

Para obtener una composición que tiene un alto contenido de L-metionina, se cristalizó la solución de reacción que contiene metionina preparada en el Ejemplo 2. Mediante el uso del método de cristalización descrito en este ejemplo, se pudo obtener una composición que contiene 60,00 % en peso a 99,90 % en peso de metionina.

10

(1) Método de cristalización A

La solución de reacción que contiene metionina obtenida en el Ejemplo 2, se concentró hasta que la concentración de metionina en la solución de reacción alcanzó 150 a 200 g/L. Los cristales de metionina se separaron de la solución concentrada por un separador de cristales, y se recuperó las aguas madres restantes. (ML). Los cristales de metionina separados se usaron como semillas, y las aguas madres se rociaron y secaron sobre las semillas en un granulador, de esta manera se obtiene una composición en polvo que contiene metionina.

15

Los componentes y sus contenidos en la composición que contiene metionina obtenida de acuerdo con este método se muestran en la Tabla 2 más abajo.

20

Tabla 2

| Componentes | Contenido (% en peso) |
|--------------------|-----------------------|
| L-metionina | 60-70 |
| Acetato | 0-1 |
| Ion | 13-19 |
| Fenilalanina | 0,05-4,5 |
| Tirosina | 0,02-2,5 |
| Glutamato | 0,5-11 |
| Homoserina | 0,05-1 |
| O-acetilhomoserina | 0,1-1 |

25

30

35

40

(2) Método de cristalización B

La solución de reacción que contiene metionina obtenida en el Ejemplo 2, se concentró o tituló a un pH de 4,0 a 5,5 por la adición de ácido sulfúrico, y luego se concentró. La solución de reacción se concentró hasta que la concentración de metionina en ella alcanzó 150-200 g/L. Los cristales primarios se separaron por un separador de cristales y se recuperaron las aguas madres restantes. Las aguas madres, de las que se han separado los cristales primarios, se concentraron hasta que la concentración de metionina en ellas alcanzó 150-200 g/L, de esta manera se obtienen cristales secundarios. Los cristales primarios y los cristales secundarios se mezclaron entre sí, se lavaron y secaron, de esta manera se obtiene una composición en polvo que contiene metionina.

45

50

Los componentes y sus contenidos en la composición que contiene metionina obtenida de acuerdo con este método se muestran en la Tabla 3 a más abajo.

Tabla 3

| Componentes | Contenido (% en peso) |
|--------------------|-----------------------|
| L-metionina | 80-95 |
| Acetato | 0-1 |
| Ion | 0,5-5,5 |
| Fenilalanina | 0,05-4 |
| Tirosina | 0,01-2 |
| Glutamato | 0,05-5,5 |
| Homoserina | 0,05-1 |
| O-acetilhomoserina | 0,1-1 |

(3) Método de cristalización B

La solución de reacción que contiene metionina obtenida en el Ejemplo 2, se tituló a un pH de 4,0 a 5,5 por la adición de ácido sulfúrico. Luego, se adicionó carbón activado a la solución de reacción en una cantidad de 0,5-2 % en peso, en base al peso de metionina, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 1-2 horas, y luego se filtró para eliminar el carbón activado e impurezas. El filtrado se concentró hasta que la concentración de metionina en él alcanzó 150-200 g/L. Los cristales de metionina se separaron del filtrado concentrado por un separador de cristales. Las aguas madres restantes después de la separación de los cristales, se volvieron a concentrar para obtener cristales secundarios. Los segundos cristales obtenidos se disolvieron y adicionaron a otra solución de reacción que contiene L-metionina, que se ha titulado a un pH de 4,0 a 5,5, después de lo cual la solución de reacción resultante se sometió a los procedimientos descritos anteriormente.

Los componentes y sus contenidos en la composición que contiene metionina obtenida de acuerdo con este método se muestran en la Tabla 4 más abajo.

Tabla 4

| Componentes | Contenido (% en peso) |
|--------------------|-----------------------|
| L-metionina | 95,00-99,90 |
| Acetato | 0-1 |
| Ion | 0,01-0,2 |
| Fenilalanina | 0,05-1 |
| Tirosina | 0,01-1 |
| Glutamato | 0,01-1 |
| Homoserina | 0,01-0,8 |
| O-acetilhomoserina | 0,0-0,5 |

Ejemplo 4: Examen del efecto de la composición que contiene metionina

Para examinar el efecto de la composición que contiene metionina obtenida en el Ejemplo 3, se realizó un experimento de alimentación. En este Ejemplo, se usó la composición que tiene un alto contenido de L-metionina (en lo sucesivo denominada L-Met), obtenida por el método de cristalización C descrito en el Ejemplo 3. Como control, se usó una composición que contiene D,L-metionina (producida por un proceso químico y que tiene una pureza del 99,99 % o superior; en lo sucesivo denominada D,L-Met).

(1) Efecto de la composición que contiene L-metionina en gallinas ponedoras de 25 semanas de edad

Las gallinas ponedoras se trataron con L-Met y D, L-Met para examinar el efecto de la composición que contiene L-metionina sobre los huevos.

Diseño experimental

- Gallinas ponedoras de 25 semanas de edad;
- Se adicionó L-Met o D,L-Met a una dieta basal (BD) en cantidades de 0,1 % en peso y 0,2 % en peso.

Tabla 5: Composición de la dieta basal

| Componentes | Contenido (%) |
|------------------|---------------|
| Maíz | 50 |
| Trigo | 7 |
| Salvado de trigo | 3 |
| Harina de soja | 26 |
| Otros | 14 |

Tabla 6: Resultados

| Unidad % | | Velocidad de producción de huevos (%) | Peso del huevo (g/huevo) | Masa de huevo (g/día/ave) |
|--|-------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| BD | | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| L-Met | 0,1 % | 103,6 | 104,1 | 107,8 |
| | 0,2 % | 104,9 | 104,4 | 109,7 |
| DL-Met | 0,1 % | 101,9 | 102,7 | 104,6 |
| | 0,2 % | 104,6 | 102,7 | 107,4 |
| Porcentaje de L-Met con relación al porcentaje de DL-Met | 0,1 % | 101,6 | 101,3 | 103,1 |
| | 0,2 % | 100,3 | 101,7 | 102,1 |

Como puede verse en los resultados de la Tabla 6 más abajo, el grupo de control tratado con D,L-Met y el grupo tratado con L-Met, mostraron todos mejores efectos sobre los huevos en comparación con el grupo tratado con la dieta basal. La comparación entre el grupo tratado con L-Met y el grupo tratado con D,L-Met, indicó que la velocidad de producción de huevos y el peso del huevo del grupo tratado con L-Met aumentaron en aproximadamente 1 % y la masa de los huevos del grupo tratados con L-Met, se incrementó en aproximadamente un 2-3 %.

Esto sugiere que la adición de L-Met, resulta en efectos positivos en las gallinas ponedoras en comparación con la adición de D,L-Met.

(2) Efecto de la composición que contiene L-metionina en lechones

Para examinar el efecto de la composición que contiene L-metionina en lechones, los lechones se trataron con L-Met y D, L-Met, y luego se comparó la ganancia diaria promedio entre el grupo tratado con L-Met y el grupo tratado con D,L-Met.

Diseño experimental

- Lechones;
- Se adicionó L-Met o D,L-Met a una dieta basal (BD) en cantidades de 0,05 % en peso y 0,11 % en peso.

Tabla 7: Composición de la dieta basal

| Componentes | Contenido (%) |
|--------------------|---------------|
| Maíz | 60,7 |
| SBM | 3,0 |
| Proteína de plasma | 11,0 |
| Suero seco | 20,0 |
| Grasa | 1,0 |
| Arena | |
| Maicena | 0,5 |
| otros | 3,8 |

Tabla 8: Resultados

| ADG (kg/día) | Dieta basal | DL-Met adicionado (%) | | L-Met adicionado (%) | |
|--------------|-------------|-----------------------|-------|----------------------|-------|
| | | 0,05 | 0,11 | 0,05 | 0,11 |
| 0-7 días | 100,0 | 151,6 | 159,1 | 171,1 | 201,9 |
| 14-21 días | 100,0 | 120,6 | 126,9 | 125,3 | 132,2 |

* ADG: ganancia diaria promedio.

Como puede verse en los resultados de la Tabla 8 anterior, la comparación de la ganancia diaria promedio entre el grupo de lechones tratados con la dieta basal, y el grupo de lechones tratados con D,L-Met o L-Met indicó que la ganancia diaria promedio se incrementó en aproximadamente hasta un 60 % en el grupo tratado con D,L-Met, y aproximadamente hasta un 100 % en el grupo tratado con L-Met. Además, la comparación de la ganancia diaria promedio entre el grupo tratado con D,L-Met y el grupo tratado con L-Met indicó que la ganancia diaria promedio del grupo tratado con L-Met, fue aproximadamente un 5-40 % mayor que la del grupo tratado con D,L-Met.

(3) Efecto de la composición que contiene L-metionina en pollos de engorde.

Para examinar el efecto de la composición que contiene L-metionina en pollos de engorde, los pollos de engorde se trataron con L-Met y D,L-Met, y luego la relación entre ganancia y pienso (relación G: F) se comparó entre los pollos de engorde.

Diseño experimental

- Pollos de engorde de 1 día (ross308);
- Se adicionó L-Met o D, L-Met a una dieta basal (BD) en cantidades de 0,1 % en peso, 0,2 % en peso y 0,3 % en peso.

Tabla 9: Composición de la dieta basal

| Componentes | Contenido (%) |
|----------------|---------------|
| Maíz amarillo | 59 |
| Harina de soja | 34 |
| Otros | 7 |

Tabla 10: Resultados

| 5 | Ganancia: pienso | BD (%) | DL-Met adicionado (%) | | | L-Met adicionado (%) | | | Porcentaje de L-Met con relación al porcentaje de DL-Met | | |
|----|---------------------|-----------|--------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|--|-------|-------|
| | | | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,3 |
| 10 | 0-7 días | 100,0 | 102,0 | 101,2 | 102,0 | 102,8 | 106,1 | 106,1 | 100,8 | 104,8 | 104,0 |
| | 7-14 días | 100,0 | 111,9 | 112,7 | 114,1 | 113,9 | 114,8 | 115,8 | 101,8 | 101,9 | 101,5 |
| | 14-21 días | 100,0 | 116,1 | 118,1 | 118,6 | 116,7 | 122,1 | 124,7 | 100,6 | 103,4 | 105,2 |
| 15 | 0-21 días | 100,0 | 112,8 | 113,9 | 114,7 | 113,9 | 117,4 | 119,2 | 101,0 | 103,1 | 103,9 |

20 Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 10 anterior, la relación entre ganancia y pienso aumentó en todos los grupos tratados con la mezcla de la dieta basal con L-Met o DL-Met. La comparación de la relación entre ganancia y pienso entre el grupo tratado con L-Met y el grupo tratado con D,L-Met indicó que el grupo tratado con L-Met mostró un alto aumento en la relación entre ganancia y pienso de 0,5 % a 5 % durante todo el período del experimento, y también mostró un alto aumento en la relación entre ganancia y pienso de aproximadamente 1-4 % incluso en la última etapa del experimento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de aditivo para pienso que consiste en 60 a 99,90 % en peso de L-metionina, 0,05 a 5 % en peso de L-fenilalanina, 0,01 a 3 % en peso de L-tirosina, 0,01 a 20 % en peso de ion, más de 0 % en peso pero menos de 2 % en peso de acetato, y 0,01 a 13 % en peso de otros aminoácidos con exclusión de L-metionina, L-fenilalanina y L-tirosina, en donde los otros aminoácidos son uno o más seleccionados del grupo que consiste en glutamato, homoserina y O-acetilhomoserina.
- 10 2. La composición de aditivo para pienso de la reivindicación 1, en donde los otros aminoácidos incluyen glutamato, y el contenido del glutamato en la composición es 0,01 a 11 % en peso en base al peso total de la composición.
- 15 3. La composición de aditivo para pienso de la reivindicación 1, en donde los otros aminoácidos incluyen homoserina, y un contenido de la homoserina en la composición es 0,01 a 1 % en peso en base al peso total de la composición.
- 20 4. La composición de aditivo para pienso de la reivindicación 1, en donde los otros aminoácidos incluyen O-acetilhomoserina, y un contenido de la O-acetilhomoserina en la composición es 0,01 a 1 % en peso en base al peso total de la composición.
5. Una composición de pienso para animales que comprende 0,01 a 0,5 % en peso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.