

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 瑪夏斯 玻依

BOY, MATTHIAS

2. 丹妮拉 克連恩

KLEIN, DANIELA

3. 哈特維格 史齊羅德

SCHROEDER, HARTWIG

國 籍：(中文/英文)

1.-3.均德國 GERMANY

四、聲明事項：

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

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 德國；2003年12月18日；10359668.2

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

為改良此等微生物對於製造特定分子之表現性質，可使用突變形成、篩擇及突變篩擇，或重組去氧核糖核酸(DNA)技術之方法，該等方法經由放大或關閉個別之胺基酸生物合成基因之表現並因此引發胺基酸製造之改良而用於製造胺基酸之菌株(例如，棒桿菌之菌株)之菌株改良。

例如，WO-A-02/10209及德國專利-A-101 36 986敘述藉由發酵，使用製造L-甲硫胺酸之遺傳修飾之棒桿菌狀之細菌而製造L-甲硫胺酸之方法。其中，除了其他以外，提供用於製造L-甲硫胺酸之方法之說明，該方法包含該細菌之發酵、該胺基酸於培養基中或於細菌中之增加及該胺基酸之分離。此外，敘述用於自發酵液體培養基(broth)製造含L-甲硫胺酸之動物飼料添加劑之方法，其包含下列步驟：
a)發酵產生L-甲硫胺酸之微生物；b)濃縮該發酵液體培養基，例如經由蒸發；c)分離出生物量(0-100%)，例如經由離心；及d)乾燥，例如經由冷凍乾燥或噴霧乾燥，噴霧造粒。

Swapan等人於J. Microbial Biotechnology, 4(1), 35-41 (1989)中敘述藉巨大芽孢桿菌(*Bacillus megaterium*)株，突變經由自發酵液體培養基中分離出細胞、調節pH至5、以活性碳及離子交換層析處理，以微生物地製造甲硫胺酸。

德國專利-A-35 33 198揭示，經由使用特殊嗜熱性細菌之發酵而製造L-白胺酸。該發酵係於+60°C連續地進行，連同生物量之保留、含產物之廢培養基之分離、於結晶器中之冷卻(至+2°C)、已結晶出之胺基酸之產生及母液之再

循環至反應器中。此中未敘述甲硫胺酸經由發酵之製造。

對於甲硫胺酸之微生物製造敘述之方法迄今尚未滿足以工業規模製造之需要。對於此之原因係，首先，甲硫胺酸於水性發酵培養基中有限之溶度，其具有在高生物合成輸出時，甲硫胺酸自該發酵液體培養基中沉澱出之效應，及因此使純化困難。另一原因係，於根據先前技藝工作之案例中，產生可觀之廢棄物流，其之處置係與高成本相關。

【發明內容】

因此，本發明之一項目的係，提供用於分離經由發酵而製造之甲硫胺酸之改良方法，該方法係可應用於，特定言之，包含部分為結晶形式之甲硫胺酸之彼等發酵液體培養基。另一目的為提供用於含甲硫胺酸之發酵液體培養基之處理方法，該方法實質上不產生廢棄物流及因此可係特別經濟地實施。

本發明人等已發現，以上目的係經由提供處理方法而令人驚訝地達成，該方法特定地利用甲硫胺酸之溶度性質以分離出生物量。該方法使用結晶作用作為用於經由發酵而製造之L-甲硫胺酸之純化方法。其產生兩種產物以使用作為飼料添加劑(低濃度及高濃度產物)。於較佳之不同形式中，實質上不產生廢棄物流及因此容許於工業規模之特別地經濟之甲硫胺酸製造。

【實施方式】

A)一般定義

"甲硫胺酸"，用於本發明之目的，原則上包括L-及D-甲

硫胺酸、此等異構物之混合物，例如外消旋物類，但較佳係L-甲硫胺酸。

甲硫胺酸於水中於20℃之溶度係約30克/升，及於70℃其係高於90克/升。於發酵液體培養基中於此等條件下，觀察到可比較之數量級之溶度。

用於本發明之目的，方法步驟諸如"濃縮"、"分離"、"洗滌"、"乾燥"，涵蓋於專家技能之領域中存在之所有方法。例如，可採用"濃縮"以意表於大氣壓力下或連同真空之施用蒸發液相。"濃縮"可係，例如，使用熟悉之技術，諸如逆滲透或奈米級過濾(nanofiltration)或習用之裝置(例如落膜式蒸發器、薄膜蒸發器或旋轉蒸發器、或其等之組合)而實施。"分離"可涵蓋，例如，離心、過濾、傾析、或此等方法之組合。"洗滌"可涵蓋，例如，固體之過濾出及倘若於懸浮該過濾殘渣之後係適合的，則單次或重複之洗滌。"乾燥"可涵蓋，例如，冷凍乾燥、噴霧乾燥、噴霧粒化、流體化床乾燥或此等方法之組合。

B)發明之較佳具體實施例

本發明首先係關於一種用於分離經由發酵而製造之甲硫胺酸之方法，該方法包含

- a) 加熱於製造甲硫胺酸之微生物之發酵中製造之含甲硫胺酸之液體部分(該液體部分包含，特定言之，於部分未溶解形式之甲硫胺酸)，至足夠以提高甲硫胺酸於該液相中溶度之溫度，較佳地至致使甲硫胺酸實質上完全進入溶液中之溫度，

- b) 自其獲得甲硫胺酸濃化之液相，及
- c) 結晶出甲硫胺酸，倘若適合，則於濃縮該經濃化之液相之後。

以於液相中之總甲硫胺酸含量為基準，倘若甲硫胺酸係，例如，超過95%溶解，較佳地超過98%溶解，特定言之100%溶解，則甲硫胺酸係"實質上"完全於溶液中。

含甲硫胺酸之"液體部分"通常係自發酵方法獲得之液體培養基及包含，特定言之，於部分未溶解形式之甲硫胺酸及倘若適合，則可具有習用地可存在於發酵液體培養基中之其他固體成分；或自該液體培養基衍生之液體，例如經由適合之預處理而獲得者。"預處理"可在於，例如，經由蒸發之濃縮、或物質之添加。例如，可將含甲硫胺酸之部分、或促進下列之處理步驟或如指示促進產物之用途(例如，飼料添加劑)之佐劑(見以下)加入來自先前處理批次之液體培養基中。

以發酵液體培養基之總重量為基準，未溶解之甲硫胺酸於該(倘若係適合的)經強化之發酵液體培養基中之含量係於約1至10重量%之範圍內，較佳係於約3至8重量%，或者，以總固體含量為基準，於約30至80重量%之範圍內，較佳係於約50至57重量%。

例如，一種本發明之發酵於通常之發酵溫度可產生約96克/升之甲硫胺酸含量，其中約46克/升係於溶液中及約50克/升係未溶解的。

經濃化之液相之甲硫胺酸含量，以其之乾剩餘物為基

準，係於約60至100重量%或約90至100重量%之範圍內，如例如約75至85重量%，或約95至100重量%，每種係以乾質量為基準。

為了使甲硫胺酸實質上進入溶液中，於步驟a)中，視將溶解之產物之數量而定，加熱液體至於約60至120°C之範圍內之溫度，較佳係約70至120°C。倘若適合，則於略為提高之壓力(例如約1至5大氣壓力)操作，可係必要的。

較佳地，於步驟a)中使用之液體部分係含生物量之發酵液體培養基而無進一步之預處理。

步驟b)之甲硫胺酸濃化之液相較佳地係經由自以溶解的甲硫胺酸濃化之經加熱之發酵液體培養基分離出生物量而獲得。為了避免該甲硫胺酸之過早之結晶作用，於生物量分離之期間使用同樣地提高之溫度，較佳地於以上指定之範圍內之溫度。

於本發明之一種較佳具體實施例中

- d) 分離出該結晶之甲硫胺酸，
- e) 倘若適合，則洗滌該已分離出之固體(較佳係結晶)甲硫胺酸及
- f) 倘若適合，則乾燥。

根據另一種較佳方法不同形式，於步驟b)中分離出之生物量係

- g1) 倘若適合地洗滌，則加熱(倘若適合)於該洗滌中使用之液體及

- g3) 乾燥。

倘若，例如，固體甲硫胺酸係存在於該分離出之生物量部分中，則加熱該洗滌液體可變成必要的，及自該生物量部分儘可能地製造甲硫胺酸係需要的。

為了避免廢棄物流，較佳地

g2) 於步驟g1)中產生之洗滌液體係與來自步驟b)之甲硫胺酸濃化之液相組合。

然後，進一步濃縮根據以上程序獲得之步驟b)之含甲硫胺酸之液相，例如經由連同加熱之蒸發及倘若適合則施加真空。於生成之濃縮物中甲硫胺酸之含量，以該濃縮物之總重量為基準，係於約10至40重量%之範圍內。甲硫胺酸較佳係經由冷卻結晶作用而分離出。對於此程序，溶液係冷卻至於0至20℃之範圍內之溫度。於完成結晶作用之後，該固體甲硫胺酸係以冷洗滌液體(例如水)洗滌、及乾燥，倘若適合則以溫和之加熱乾燥。

根據另一種方法不同形式，於步驟d)中產生之母液係

d1) 與來自使用製造甲硫胺酸之微生物之另一個發酵批次之含甲硫胺酸之液體部分組合；或

d2) 於根據步驟g3)之乾燥之前，加入自使用製造甲硫胺酸之微生物之同一或另一個發酵批次分離出之生物量中。

根據另一種方法不同形式，於步驟e)中產生之洗滌液體係

e1) 與來自使用製造甲硫胺酸之微生物之另一個發酵批次之含甲硫胺酸之液體部分組合；或

e2) 於根據步驟g3)之乾燥之前，加入自使用製造甲硫胺酸之微生物之同一或另一個發酵批次分離出之生物量中。

再循環母液及洗滌液體，進一步避免廢棄流之產生。

此外，根據本發明，較佳地，根據步驟g3)之乾燥包含噴霧乾燥步驟。

本發明進一步係關於一種經由發酵而製造甲硫胺酸之方法，其中天然或重組體微生物係以就其本身已知之方式發酵及生成之甲硫胺酸係經由以上定義之方法而分離。

於一種較佳具體實施例中，本發明之方法係使用自棒桿菌屬之天然或重組體細菌選出之製造甲硫胺酸之微生物而進行。

本發明進一步係關於根據以上步驟g3)可獲得之乾燥物質用於製造飼料或飼料補充物(飼料添加劑)之用途。

本發明亦係關於發明地分離之甲硫胺酸用於製造食物或飼料或者食物補充物或飼料補充物之用途。

本發明最後係關於經由根據以上定義之方法而可獲得之含甲硫胺酸之乾燥生物量；包含此種類型之生物量之飼料添加劑；及亦除了習用之飼料成分外，亦包含此種飼料添加劑之飼料組合物。

於以下之段落中，敘述本發明之進一步發展。

C)根據本發明使用之宿主細胞

對於本發明之方法，較佳地使用棒桿菌狀之細菌。較佳地，此等係棒桿菌屬之細菌。於棒桿菌屬中，特定言之提

390 73、德國專利-A-102 390 82及德國專利-A-102 228 58
中，該等專利係以提及之方式明確地併入本文中。

為了減少可降低甲硫胺酸含量之酶之活性或數量，熟諳此技藝之士可個別地或組合地實施不同之措施。經由降低對於本發明之蛋白質編碼之基因之轉錄頻率，可降低相關之蛋白質之濃度。此可係由熟諳此技藝之士經由修飾或交換啟動子或調節區域及亦該編碼基因之核糖體結合位置而達成。於該編碼區域之下游，熟諳此技藝之士可修飾終止子或引進導致該轉錄產物之安定性降低之序列。此等方法降低信使核糖核酸(mRNA)之壽命，致使降低相關之蛋白質之表現及因此其之濃度變成可能的。

於表現之酶之含量，融合之序列可導致增加之損壞速率及因此同樣地導致蛋白質之濃度之降低。此外，熟諳此技藝之士，經由該編碼基因之定點之突變形成或未定點之突變形成，可改變活性、基質親和力及基質種別性。酶之活性可係經由於對應之基因中以致使發生酶反應之反應速度之部分或完全降低之方式突變而影響。對於熟諳此技藝之士，此等突變之實例係熟知的(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)。蛋白質之突變型亦可導致酶複合物之降低或抑制之同質多分子聚合作用或異質多分子聚合作用，及因此同樣地導致酶性質之損傷。

Journal of Bacteriology 174: 6076-6086) ,

-對於丙糖-磷酸鹽異構酶編碼之基因 tpi(Eikmanns (1992),
Journal of Bacteriology 174: 6076-6086) ,

-對於絲胺酸 O-乙醯基轉送酶編碼之基因 metA(EP 1 108
790 A2; DNA-SEQ NO. 725) ,

-對於胱硫醚 γ -合酶編碼之基因 metB(EP 1 108 790 A2;
DNA-SEQ NO. 3491) ,

-對於胱硫醚 γ -裂解酶編碼之基因 metC(EP 1 108 790 A2;
DNA-SEQ NO. 3061) ,

-對於胱硫醚合酶編碼之基因 metH(EP 1 108 790 A2; DNA-
SEQ NO. 1663) ,

-對於絲胺酸羥基甲基轉送酶編碼之基因 glyA(EP 1 108 790
A2; DNA-SEQ NO. 1110) ,

-對於 O-乙醯基絲胺酸硫氫基水解酶編碼之基因 metY(EP
1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726) ,

-對於亞甲基四氫葉酸鹽還原酶編碼之基因 metF(EP 1 108
790 A2; DNA-SEQ NO. 2379) ,

-對於磷絲胺酸胺基轉送酶編碼之基因 serC(EP 1 108 790
A2; DNA-SEQ NO. 928) ,

-對於磷絲胺酸磷酸酶編碼之基因 serB(EP 1 108 790 A2;
DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO.
2767) ,

-對於絲胺酸乙醯基-轉送酶編碼之基因 cysE(EP 1 108 790
A2; DNA-SEQ NO. 2818) ,

-對於半胱胺酸合酶編碼之基因 *cysK* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2817) ,

-對於升絲胺酸脫氫酶編碼之基因 *hom* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306) 。

此外，對於甲硫胺酸之本發明製造，以致使對應之蛋白質之活性(與未經突變之蛋白質比較)係經由代謝物而受影響至較低之程度、或不受影響、或者致使增加彼等之特定活性之方式同時突變至少一種之下列基因，可係有利的：

-對於天門冬胺酸鹽激酶編碼之基因 *lysC* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 281) ,

-對於丙酮酸鹽羧化酶編碼之基因 *pyc* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086) ,

-對於升絲胺酸 O-乙醯基轉送酶編碼之基因 *metA* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 725) ,

-對於胱硫醚 γ -合酶編碼之基因 *metB* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3491) ,

-對於胱硫醚 γ -裂解酶編碼之基因 *metC* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3061) ,

-對於胱硫醚合酶編碼之基因 *metH* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1663) ,

-對於絲胺酸羥基甲基轉送酶編碼之基因 *glyA* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1110) ,

-對於 O-乙醯基升絲胺酸硫氫基水解酶編碼之基因 *metY* (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 726) ,

- 對於亞甲基四氫葉酸鹽還原酶編碼之基因 metF (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2379) ,
- 對於磷絲胺酸胺基轉送酶編碼之基因 serC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 928) ,
- 對於磷絲胺酸磷酸酶編碼之基因 serB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 334, DNA-SEQ NO. 467, DNA-SEQ NO. 2767) ,
- 對於絲胺酸乙醯基轉送酶編碼之基因 cysE (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2818) ,
- 對於半胱胺酸合酶編碼之基因 cysK (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2817) ,
- 對於升絲胺酸脫氫酶編碼之基因 hom (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 1306) 。

此外，對於甲硫胺酸之製造，減弱一種或多種之下列基因表現，特定言之，降低或關閉彼等之表現，可係有利的：

- 對於S-腺苷甲硫胺酸合酶編碼之基因 metK(E.C.2.5.1.6) ,
- 對於升絲胺酸激酶編碼之基因 thrB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3453) ,
- 對於蘇胺酸脫水酶編碼之基因 ilvA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2328) ,
- 對於蘇胺酸合酶編碼之基因 thrC (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3486) ,
- 對於中-二胺基庚二酸鹽D-脫氫酶編碼之基因 ddh (EP 1

- 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3494) ,
- 對於磷烯醇丙酮酸鹽羧基激酶編碼之基因 pck (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3157) ,
- 對於葡萄糖-6-磷酸鹽6-異構酶編碼之基因 pgi (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 950) ,
- 對於丙酮酸鹽氧化酶編碼之基因 poxB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 2873) ,
- 對於二氫二(2-吡啶甲酸鹽)合酶編碼之基因 dapA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3476) ,
- 對於二氫二(2-吡啶甲酸鹽)還原酶編碼之基因 dapB (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3477) ,
- 對於二胺基二(2-吡啶甲酸鹽)脫羧酶編碼之基因 lysA (EP 1 108 790 A2; DNA-SEQ NO. 3451) 。

此外，對於甲硫胺酸之製造，以致使對應之蛋白質之酶活性係部分或完全減少之方式突變至少一種之上述基因 metK、thrB、ilvA、thrC、ddh、pck、pgi、poxB、dapA、dapB、lysA，可係有利的。

此外，對於甲硫胺酸之製造，除去另外之不受歡迎之副反應，可係有利的(Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.) Academic Press, London, UK, 1982)。

為了達成過量表現，熟諳此技藝之士可個別地或組合地採用不同之措施。因此，可增加對應之基因之套數之數

目，或者可突變於構築基因之上游之啟動子及調節區域或染色體結合位置。表現卡匣(cassettes)以相同之方式作用，其等係於構築基因之上游組合。經由可誘導之啟動子，於經由發酵而製造L-甲硫胺酸之過程中增加該表現亦係可能的。延長信使核糖核酸之壽命之措施同樣地改良表現。此外，經由抑制酶蛋白質之損壞，同樣地增加酶活性。基因或基因構築可係連同不同數目之套數存在於質體中或整合於染色體中及放大表現。或者，相關基因之過量表現可係經由改變培養基組成或培養條件而進一步達成。

於此方面，熟諳此技藝之士，除了其他以外，於Martin等人(Biotechnology 5, 137-146 (1987))中、於Guerrero等人(Gene 138, 35-41 (1994))中、於Tsuchiya及Morinaga(Bio/Technology 6, 428-430 (1988))中、於Eikmanns等人(Gene 102, 93-98 (1991))中、於歐洲專利0472869中、於美國專利4,601,893中、於Schwarzer及Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991))中、於Remscheid等人(Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994))中、於LaBarre等人(Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993))中、於WO 96/15246中、於Malumbres等人(Gene 134, 15-24 (1993))中、於日本專利-A-10-229891中、於Jensen及Hammer(Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998))中、於Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996))中以及於遺傳學及分子生物學之已知之教科書中找到指示。

D)進行發明之發酵

根據本發明製造之微生物可係連續地或於批式方法(批式培養)中或於進料批式方法、或重複之進料批式方法中分批地培養以用於甲硫胺酸之製造。已知之培養方法之概述可係於由 Chmiel 之教科書 (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Process Biotechnology 1. Introduction to process biotechnology] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) 中或於由 Storhas 之教科書 (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Bioreactors and peripherals] (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)) 中找到。

使用之培養基必須以適合之方式滿足個別之菌株之需要。不同之微生物之培養基之說明係於 the American Society für Bacteriology 之手冊 "Manual of Methods für General Bacteriology" (Washington D. C., USA, 1981) 中提供。

可根據本發明使用之介質通常包含一種或多種之碳來源、氮來源、無機鹽類、維生素及/或痕量元素。

較佳之碳來源係糖類，諸如單醣類、雙醣類或多醣類。很良好之碳來源係，例如，葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、核糖、山梨糖、核酮糖、乳糖、麥芽糖、蔗糖、棉子糖、澱粉或纖維素。糖類亦可係經由複雜之化合物而加入該培養基中，諸如糖蜜、或糖之精製之其他副產物。將多種碳來源之混合物加入，亦可係有利的。其他可能之碳來

源係油類及脂肪類，例如黃豆油、葵花子油、花生油及椰子脂；脂肪酸類，例如軟脂酸、硬脂酸或亞麻油酸；醇類，例如甘油、甲醇或乙醇；及有機酸類，例如乙酸或乳酸。

氮來源通常係有機或無機之氮化合物或包含此等化合物之物質。氮來源之實例包括氮氣或銨鹽類諸如硫酸銨、氯化銨、磷酸銨、碳酸銨或硝酸銨、硝酸鹽類、尿素、胺基酸類或複雜之氮來源諸如穀物浸漬液(corn steep liquor)、黃豆粉、黃豆蛋白質、酵母萃取物、肉萃取物及其他。氮來源可係個別地或如混合物使用。

可存在於培養基中之無機鹽化合物類包括鈣、鎂、鈉、鉍、鉬、鉀、錳、鋅、銅及鐵之氯化物類、磷酸鹽類或硫酸鹽類。

可使用於甲硫胺酸之製造之硫來源係無機硫化合物類，例如硫酸鹽類、亞硫酸鹽類、二硫磺酸鹽類、四硫磺酸鹽類、硫代硫酸鹽、硫化物類，而且亦有機之硫化合物類，諸如硫醇類。

作為磷來源，可使用磷酸、磷酸二氫鉀或磷酸氫二鉀或對應之鈉鹽類。

可將鉗合劑類加入培養基中，以維持金屬離子於溶液中。特別適合之鉗合劑類包括二羥基酚類，諸如兒茶酚或兒茶酚甲酸鹽，或者有機酸類，諸如檸檬酸。

根據本發明使用之發酵培養基通常亦包含其他之生長因子類，諸如維生素類或生長促進劑類，其等包括，例如，

生物素、核黃素、噻胺、葉酸、菸鹼酸、泛酸鹽及吡哆醇。生長因子類及鹽類時常起源自複雜之培養基成分，諸如酵母萃取物、糖蜜、穀物浸漬液及其類似物。此外，可將適合之先質加入培養基中。培養基化合物之精確之組成主要係視分別之實驗而定，及係對於每種特定之案例分別地決定。對於培養基最適化之資訊係自教科書 "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (編輯 P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) pp. 55-73, ISBN 0 19 963577 3) 可獲得。生長培養基亦可係自商業供應商獲得，諸如 Standard 1 (Merck) 或 BHI (Brain heart infusion, DIFCO) 及其類似物

所有之培養基成分係經由加熱(於1.5巴及121℃歷時20分鐘)或經由無菌過濾而殺菌。該等成分可係共同地或者若必要則分別地殺菌。所有之培養基成分可係於培養之開始存在或視需要可係連續地或分批地添加。

培養之溫度通常係15℃至45℃，較佳係25℃至40℃，及於實驗之期間可係維持於常數或改變。培養基之pH應係於5至8.5之範圍內，較佳係約7.0。於培養之期間，用於培養之pH可係經由添加鹼性化合物類，諸如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氨或氨水，或酸性化合物類，諸如磷酸或硫酸而調節。為了控制泡沫發生，可使用防沫劑，例如脂肪酸聚乙二醇酯類。為了維持質體之安定性，可將適合之選擇之物質，例如抗生素類，加入培養基中。為了維持好氧之條件，將氧或含氧之氣體混合物(例如周圍空氣)引進入培養

中。繼續培養，直到已生成最大量之需要產物為止。此種目的通常係於10小時至160小時之內達成。

生成之含甲硫胺酸之發酵液體培養基通常具有7.5至25重量%之乾質量。

此外，倘若發酵至少於末期，但特定言之於至少30%之發酵時間之期間，係於限制糖之條件下進行，則係有利的。即，於此期間內於發酵培養基中可利用之糖之濃度係維持於 ≥ 0 至3克/升，或係降低。

E) 甲硫胺酸之純化

倘若根據本發明於結晶作用之後獲得之甲硫胺酸仍然不具有需要之純度，則其可係進一步純化。對於此目的，該產物係以溶解之形式經歷使用適合樹脂之層析術，需要之產物或雜質係完全或部分保留於層析之樹脂中。倘若需要，則可重複此種層析之步驟，其中使用相同或不同之層析之樹脂。對於適合之層析之樹脂及彼等之最有效用途之選擇，熟諳此技藝之士係精通的。經純化之產物可係經由過濾或超過濾而濃縮，及於產物之安定性係最高之溫度下儲存。

經分離之化合物之認明及純度可係經由已知之技術而決定。此等包括高效能液體層析術(HPLC)、光譜方法、顏色方法、薄層層析術、近紅外線光譜學(NIRS)、酶試驗及微生物之試驗。此等分析方法係概述於下列中：Patek等人(1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova等人(1996) Biotekhnologiya 11 27-32; 及Schmidt等人(1998)

Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Vol. A27, VCH: Weinheim, pp. 89-90, pp. 521-540, pp. 540-547, pp. 559-566, 575-581及 pp. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A.等人(1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 17。

F)乾燥生物量

於完成發酵之後，可直接處理含甲硫胺酸之發酵液體培養基，以產生成品乾燥飼料添加劑。然而，根據本發明之一種較佳具體實施例，首先生物量內容物係，例如經由離心，而自發酵液體培養基完全地或部分地(較佳係完全地)移出，及處理以生成本發明之飼料添加劑。生成之生物量仍然包含某些比率之甲硫胺酸，其倘若需要則可係經由洗滌步驟之中間安排而降低。

本發明之生物量可係經由來自先前技藝就其本身已為吾人所知之各種方法而處理，以產生適合之乾燥產物。特定言之，用於製造之適合之方法係乾燥方法，諸如噴霧乾燥、噴霧粒化、接觸乾燥、流體化床乾燥或冷凍乾燥。適合之方法係，例如，於下列中敘述：O. Krischer, W. Kast, *Trocknungstechnik* [Drying technology] 第一冊，"Die wissenschaftlichen Grundlagen der Trocknungstechnik" [The scientific bases of drying technology], Springer-Verlag

1978; Krischer/Kröll, *Trocknungstechnik* [Drying technology] 第二冊, "Trockner und Trocknungsverfahren" [Dryers and drying methods], Springer-Verlag 1959; K. Kröll, W. Kast, *Trocknungstechnik* 第三冊, "Trocknen und Trockner in der Produktion" [Drying and dryers in production], Springer-Verlag 1989; K. Masters, "Spray Drying Handbook", Longman Scientific & Technical 1991, 725頁; H. Uhlemann, L. Mörl, "Wirbelschicht-Sprühgranulation" [Fluidized-bed spray granulation], Springer-Verlag 2000; Freeze drying: Georg-Wilhelm Oetjen, "Gefriertrocknen" [Freeze drying], VCH 1997; 及亦歐洲專利-A-0 809 940。上述之出版物之揭示係以提及之方式明確地併入本文中。

特別較佳地，本發明之乾燥步驟係經由噴霧乾燥(例如以整合之流體化床之噴霧乾燥)、或經由噴霧粒化而進行。

倘若需要，則乾燥可係於適合於飼料用途之適合之載體材料之存在下進行，由於其之結果，特定言之，可改良自由流動之能力及因此產物品質。

適合於飼料用途及可使用之載體材料係習用之惰性載體。"惰性"載體對於存在於添加劑中之食物佐劑應不顯示任何負面之交互作用，及對於在飼料添加劑中作為助劑之用途必須係安全的。可提及之適合之載體材料之實例係：天然或合成來源之無機或有機之化合物。適合之低分子量無機載體之實例係鹽類，諸如氯化鈉、碳酸鈣、硫酸鈉及

硫酸鎂，或矽酸。適合之有機載體之實例係，特定言之，糖類，例如葡萄糖、果糖、蔗糖及亦糊精類及澱粉產物。可提及之高分子量有機載體之實例係：澱粉及纖維素配製品類，諸如，特定言之，玉米澱粉、穀物粉末(例如小麥、裸麥、大麥及燕麥粉、或其等之混合物、或粗小麥麩粉(wheat semolina bran))。以乾燥為基準，載體材料可係以約5至85重量%之數量存在於配製品中，例如約10至30重量%、約20至40重量%或約50至85重量%。

於後文中，某些較佳乾燥技術係以通常形式概要地處理。

噴霧乾燥可係經由首先泵送該仍然濕潤之生物量至於噴霧塔中之霧化器而進行。該霧化係，例如，經由壓力噴嘴(單一成分噴嘴)、雙成分噴嘴或離心霧化器而進行。液滴係經由流動進入該噴霧乾燥器中之熱空氣流而乾燥。當使用離心霧化器時，乾燥較佳係以同向流動進行。當使用噴嘴時，乾燥亦可係以反向流動或交叉流動進行。該經乾燥之粉末可係於該塔排出或其係連同該空氣流帶出及於旋風器及/或過濾器中分離。視產物及程序而定，可需要後-乾燥，其可係於連結於該噴霧乾燥器之內部之流體化床中或於外部之流體化床中進行。

於本發明之乾燥方法之不同形式中，於乾燥步驟，特定言之噴霧乾燥，之下游提供連續或分批之流體化床黏聚。為了此目的，於方法之開始，以粉末狀材料(例如經由噴霧乾燥而獲得之粉末狀添加劑)進料至流體化床乾燥器。

該材料係，例如，經由進料經預熱之空氣而流體化。將液相(例如另外之生物量或含黏合劑之溶液)噴霧於流體化床上，及結果已進料之粉末係以此種溶液潤濕及，經由其之黏著之性質，逐漸地黏聚。於同時，連續地或半連續地，以循環之方式於時間之間隔，自該流體化床排出次數量之黏聚物。該排出物係，例如使用篩網而分級。於此種程序中產生之粗材料可係粉碎及連續地再循環至流體化床。微細粉末，例如來自排出空氣過濾器系統，同樣地可係連續地再循環。

另一種較佳之方法不同形式包含噴霧乾燥生物量以產生粉末，結合該經噴霧乾燥之粉末之隨後黏聚。此可係分批地或連續地進行。較佳者係連續之程序。此種類型之方法可係使用習用之噴霧乾燥工廠而進行。然而，有利地，該程序係於如FSD(流體化噴霧乾燥器)、SBD(噴霧床乾燥器)或MSD(多階段乾燥器)已為吾人所知之裝置中進行。

用於本發明之乾燥產物之連續製造之流體化噴霧乾燥器(FSD)乾燥工廠特定言之可係根據下列之路徑操作：濕生物量係通過進料管路而引進入該FSD乾燥器之頂部中及使用霧化器而霧化。乾燥係經由以同向流動引進空氣而進行。空氣係通過加熱器而預熱。經噴霧乾燥之粉末收集於在該FSD乾燥器之底部中之整合之流體化床中及係於該處使用噴霧裝置(該噴霧裝置使用，例如，壓縮空氣)而連同黏合劑溶液噴霧，及使用引進之空氣而流體化。用於此目的之空氣係預熱及經由進料管路而於該整合之流體化床之

氣體分配器下方進料。然後，生成之預黏聚物流動進入下游外部流體化床中。經預熱之空氣係自下方經由另外之進料管路而引進入此外部流體化床中。於該流體化床中進料之預黏聚物係使用另外之噴霧裝置使用壓縮空氣(例如連同黏合劑溶液)而再噴霧，及黏聚以生成最後產物。成品黏聚物係自流體化床排出及可係如以上敘述進一步處理。

噴霧之液體之組成及數量係視噴霧進入之溶液之黏著性質、達成之黏聚物尺寸及方法條件而定。

於該經噴霧之生物量之黏著性質不足夠以確保該等粒子於噴霧之後安定地黏結一起之案例中，黏合劑另外之使用係有利的。此避免黏聚物於乾燥之後再崩解。於此等案例中，將可溶解或可分散於水性介質中之黏合劑噴霧進入流體化床中，係較佳的。可提及之適合之黏合劑之實例係碳水化合物類(例如葡萄糖、蔗糖、糊精及其他)、糖醇類(例如甘露糖醇)之溶液、或聚合物溶液，例如羥基丙基甲基纖維素(HPMC)、聚乙烯吡咯啉酮(PVP)、經乙氧基化之纖維素(EC)、乙基纖維素或丙基纖維素之溶液。由於噴霧進入之黏合劑之數量及黏著性質之適合選擇之結果，因此生成不同尺寸及強度之黏聚物。

倘若黏合劑係如分別之溶液噴霧，則以溶液之總重量為基準，溶液之黏合劑含量係於約1至30重量%之範圍內。於此種案例中存在之黏合劑同樣地係溶解於水性介質中，較佳係無菌之去礦質水。習用之添加劑，例如緩衝劑或溶解化劑，同樣地可存在。

根據本發明，黏合劑於最後產物中之含量係0至約20重量%，例如約1至6重量%。最適之數量亦係選擇之黏合劑之類型之函數。確保對於產物之負面效應係避免，係必要的。

G)調配物

i)飼料添加劑及飼料組合物

本發明之含甲硫胺酸之飼料添加劑較佳係於微細地分割之自由流動粉末之形式、或於經粒化之形式。顆粒可係，例如於5至200微米之尺寸範圍內，例如10至150微米、20至100微米或30至80微米，但不受其限制。

本發明之添加劑之體密度可係，例如，於約100至600克/升之範圍內，例如150至400克/升、或200至350克/升，但不受其限制。

本發明之添加劑之甲硫胺酸含量根據製造之方法而變動。

根據本發明可獲得之甲硫胺酸晶體具有大於60重量%之甲硫胺酸含量，例如約70至98重量%，較佳係約80至95重量%，特別較佳係約87至95重量%。鹽類(來自發酵液體培養基之剩餘物)之含量可係於約0至20重量%之範圍內，特定言之約5至15重量%。其他發酵次要成分可係以約0至20重量%之數量存在，特定言之約5至15重量%。

本發明之甲硫胺酸生物量具有大於3重量%之甲硫胺酸含量，例如約5至40重量%，或約10至35重量%。鹽類之含量可係於約0至30重量%之範圍內，諸如約5至25重量%。

其他次要之發酵成分可係以約0至20重量%之含量存在，諸如約5至15重量%。

以添加劑之總重量為基準，成品添加劑之剩餘之水分含量較佳係於低於約3-5重量%之範圍內。以上之重量百分率係以乾產物之總重量為基準(較佳地無剩餘之水分)。

除了上述之成分以外，本發明之調配物，如已於以上述及，可包含另外之佐劑，其等可係於生物量之處理之前、之期間或之後加入。可提及之實例係防腐劑、抗生素、抗微生物添加劑、抗氧化劑、鉗合劑、生理上無害之鹽類、調味劑類、顏料類及其類似物。亦可存在與營養相關之佐劑，例如維生素類(例如維生素A、B₁、B₂、B₆、B₁₂、C、D₃、及/或E、K₃、葉酸、菸鹼酸、泛酸)、牛磺酸、羧酸類及其之鹽類(例如三羧酸類，諸如檸檬酸鹽、異檸檬酸鹽、反-/順-烏頭酸鹽及/或升檸檬酸鹽)、酶類、類胡蘿蔔素、礦物質類(例如P、Ca、Mg及/或Fe)、及痕量元素類(諸如Se、Cr、Zn、Mn)、蛋白質、碳水化合物、脂肪、胺基酸。此外，可存在丙酮酸、L-肉鹼、硫辛酸、輔酶Q10、胺基羧酸類(例如肌酸、血嘧啶酸)、肌醇、黃酮類化合物類、甜菜鹼、對胺基苯甲酸。

本發明之含甲硫胺酸之飼料添加劑可係組合入商業上習用之動物飼料調配物中，然後其可係飼育於，例如牛、豬、羊、家禽及其類似動物。用於此目的，本發明之添加劑係與習用之動物飼料成分混合及倘若適合，則加工成最後之形式，例如形成小球。習用之動物飼料成分係，例

如，玉米、大麥、樹薯、燕麥、黃豆、乾魚粉、粗小麥麩粉、黃豆油、白堊、礦物質類、痕量元素類、胺基酸類及維生素類。

ii) 食物及飼料補充物

發明地製造之甲硫胺酸係使用作為於食物或飼料中之佐劑或作為於食物補充物或飼料補充物中之佐劑，例如多種維生素配製物中之佐劑。用於此目的，發明地製造之產物可係以需要之數量及以就其本身而論已知之方法組合入習用之食物及飼料或食物補充物及飼料補充物中。於此種案例中，視用途而定，甲硫胺酸可係以不同之有利之數量存在。

iii) 經塗布之調配物

倘若適合，則上述之發明之調配物可另外具有塗層。於此種案例中，彼等係以包含至少一種自下列選出之化合物之塗料組合物最後加工：

- 聚(伸烷基二醇)類，特定言之聚(乙二醇)類，例如具有約400至15,000之數目平均分子量者，例如400至10,000；
- 聚(氧化烯烴)聚合物類或共聚物類，例如具有約4,000至20,000之數目平均分子量者，特定言之聚氧乙烯與聚氧丙烯之嵌段共聚物類；
- 經取代之聚苯乙烯類、順丁烯二酸衍生物類及苯乙烯-順丁烯二酸共聚物類；
- 乙烯型聚合物類，特定言之聚乙烯吡咯酮類，例如

具有約7,000至1,000,000之數目平均分子量者；單獨地或於與其他化合物(諸如纖維素醚類或澱粉類)組合；

- 乙烯吡咯啉酮/乙酸乙烯酯共聚物類，例如具有約30,000至100,000之數目平均分子量者；
- 聚(乙烯醇)類，例如具有約10,000至200,000之數目平均分子量者，及聚(酞酸乙烯酯)類；
- 羥基丙基甲基纖維素類，例如具有約6,000至80,000之數目平均分子量者；
- (甲基)丙烯酸烷基酯聚合物類及共聚物類，例如具有約100,000至1,000,000之數目平均分子量者，特定言之丙烯酸乙酯/甲基丙烯酸甲酯共聚物類及甲基丙烯酸酯/丙烯酸乙酯共聚物類；
- 聚(乙酸乙烯酯)類，例如具有約250,000至700,000之數目平均分子量者，倘若適合，則以聚乙烯吡咯啉酮安定化；
- 聚烯烴類，特定言之聚乙烯類；
- 芳族聚合物類，例如木質素類；
- 聚(丙烯酸)類；
- 聚丙烯醯胺類；
- 聚氰基丙烯酸酯類；
- 苯氧基乙酸-甲醛樹脂類；
- 纖維素衍生物類，諸如乙基纖維素、乙基甲基纖維素、甲基纖維素、羥基丙基纖維素、羥基丙基甲基纖維素、

- 維素、羧基甲基纖維素、纖維素乙酸酯酞酸酯；
- 動物、蔬菜或合成之脂肪類及經修飾之脂肪類，例如聚乙二醇類、脂肪醇類、經乙氧化之脂肪醇類、高碳脂肪酸類；高碳脂肪酸類之單-、二-及三甘油酯類，例如單硬脂酸甘油酯、烷基芳基乙氧基酸酯類及椰子基單乙醇胺鹽類(cocomonoethanolamides)；
 - 動物及植物蠟類或經化學修飾之動物及植物蠟類，諸如蜂蠟、堪地里拉蠟(candelilla wax)、棕櫚蠟、褐煤酯蠟及米芽油蠟、鯨蠟、羊毛脂、荷荷葩蠟、沙索蠟(sasol wax)；
 - 動物及植物蛋白質類，例如明膠、明膠衍生物類、明膠取代物類、酪蛋白、乳清、角蛋白、黃豆蛋白；玉米蛋白及小麥蛋白；
 - 單-及二糖類、寡糖類、多糖類，例如玻璃醛酸、黏稠性多糖(pullulan)、elsinan、澱粉類、經修飾之澱粉類、及亦果膠類、海藻酸鹽類、聚葡萄糖胺糖、鹿角菜苷；
 - 植物油類、例如葵花子油、薊油、棉子油、黃豆油、玉米胚芽油、橄欖油、菜子油、亞麻仁油、椰子油、棕櫚仁油；合成或半合成之油類，例如中等鏈三甘油酯類或礦物油類；動物油類，例如鯊魚油、沙丁魚油及鯨魚油類；
 - 經硬化(經氫化或經部分氫化)之油類/脂肪類，例如屬於以上提及者，特定言之經氫化之棕櫚油、經氫化之

亞麻仁油、經氫化之黃豆油；

- 噴漆塗料類，例如萜烯類，特定言之蟲膠、妥路香膠、祕魯香膠、山達脂、及聚矽氧樹脂類；
- 脂肪酸類，飽和及亦單不飽和及多不飽和之 C_6 至 C_{24} -羧酸類；
- 矽石類

及其等之混合物。

倘若適合，則於塗布之前將塑化劑類或乳化劑類加入脂肪類或蠟類中以改良膜之撓性，可係有利的。

塗料，倘若適合，則係連同添加劑以就其本身而論已知之方法，通常經由用於作滴狀添加之裝置或經由噴霧於已進料於混合器中之有價值之產物上而塗布。此裝置之實例係噴管(lances)、灑水龍頭、單一流體或多流體噴嘴、或旋轉滴下或霧化裝置。於最簡單之案例中，如濃縮之噴出物局部地作添加，亦係可能的。或者，首先可將塗布材料進料入混合器中，俾能於其後將有價值之產物加入。另一種可能性係，最初固體塗布材料之添加，其由於壁加熱、或由於輸入之機械能，熔解及塗布有價值之產物。

本發明現在將係參考附隨之圖而較詳細地說明。

實例1：

a) 甲硫胺酸經由發酵之製造

為了製造用於甲硫胺酸之純化之代表性發酵液體培養基，進行實驗室之發酵。麩胺酸棒桿菌菌株 ATCC13032 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) 係於

Techfors 發酵器中之 200 毫升之 BHI 培養基 (Difco/Becton Dickinson Franklin Lakes, USA) 之初步培養中生長，然後將該初步培養接種入培養基(約 14 升)中。

主要培養之發酵培養基具有下列之組成

2 克/升之 KH_2PO_4

2 克/升之 K_2HPO_4

10 克/升之硫酸銨

100 克/升之葡萄糖

5 克/升之酵母萃取物

20 毫克/升之康納黴素(kanamycin)

1 克/升之 KS911 ASM 防沫劑

pH 7.0

以去礦質水補充至需要之最後體積

痕量鹽溶液 1 毫升/升之培養基

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 克/升
$\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$	10 克/升
ZnSO_4	2 克/升
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250 克/升
使用 HCl 調節至 pH 1	

1 毫升/升之兒茶酚甲酸鹽溶液(儲備溶液 300 毫克/10 毫升)

生物素 1 毫克/升

噻胺 1 毫克/升

CaCl_2 5毫克/升。

於發酵器已用初步培養接種之後，發酵器係經由加入鹼(25% NH_4OH)而維持於pH 7及發酵直到糖係已消耗掉為止。此係經由於 pO_2 值中之增加或經由於操作溫度範圍(OTR)及臨界溫度範圍(CTR)中之降低而顯示。

b)發酵液體培養基之處理

用於處理之程序係於圖1中圖解地概述。

根據段落a)製造之發酵液體培養基係充當開始材料。於30至40°C之間之發酵溫度，約50%之存在之甲硫胺酸係於結晶形式。該開始產物具有約86%之水含量，約9%之經強化之甲硫胺酸含量及約3%之生物量含量。其他之發酵副產物及礦物質係以痕量(約2.5重量%)存在於發酵液體培養基中。

於70°C加熱20公斤之此種發酵液體培養基歷時15分鐘。結果，該甲硫胺酸完全進入溶液中。然後於固定溫度，離心分離出生物量。然後於100°C及大氣壓力濃縮上清液(約15公斤)至20%之甲硫胺酸含量。然後以5凱氏溫度/小時(K/h)之速率冷卻該濃縮物至5°C，由於其之結果，大部分之甲硫胺酸結晶出。然後晶體係於真空過濾器上自晶體糖糊分離出，以4升之先前於5°C平衡之水洗滌然後以於40°C之氮吹乾。經由此種程序，1.3公斤之乾燥甲硫胺酸係以約90%之純度分離出。

離心之剩餘物(約5公斤)，除了乾燥之生物量以外，亦包含約6%甲硫胺酸。經由噴霧乾燥，可轉變此種剩餘物

成為約0.7公斤之具有3%之剩餘水分之略為帶黃色並且自由流動之乾燥粉末，其，除了乾燥之生物量及其他發酵副產物及礦物鹽類以外，亦包含甲硫胺酸(約30%)。

噴霧乾燥係於實驗室噴霧乾燥器中使用下列之儀器設定而進行：

入口溫度：200℃，

出口溫度：80-82℃。

使用之加熱氣體係60米³/小時之氮。噴嘴氣體係以2巴之壓力通過1.2毫米噴嘴噴霧。

實例2：

自相同之開始材料開始，方法係修飾至生物量係經由離心而分離出、然後該分離出之生物量係以5升之水洗滌之程度(圖2)。於離心之後，將生成之上清液加入第一次生物量分離之上清液中。於100℃及大氣壓力濃縮整個上清液至16%之甲硫胺酸含量。經由以5凱氏溫度/小時之速率冷卻該濃縮物至5℃，甲硫胺酸係結晶出。晶體係於真空過濾器的上分離出，以4.5升之先前於5℃平衡之水洗滌然後以於40℃之氮乾燥。經由此種程序，乾燥甲硫胺酸之數量係增加至約1.5公斤。分離之晶體之純度再次係約90%。

經分離出並經洗滌之生物量之剩餘物係經由噴霧乾燥而轉變成約0.5公斤之乾燥產物。

如此製造之產物(其，除了乾燥之生物量及其他發酵副產物及礦物鹽類以外，亦包含甲硫胺酸(約10%))係自由流動的。

實例3：

自相同之開始材料開始，實例2之方法係另外修飾至當分離出結晶甲硫胺酸時產生之母液及洗滌水係於下一批次中加入含甲硫胺酸之發酵液體培養基中之程度(圖3)。

以於其他方面相似於實例2之程序，以約90%之純度自結晶作用獲得於發酵中約1.5公斤之乾燥甲硫胺酸、及自具有約10%之甲硫胺酸含量之經噴霧乾燥之生物量獲得約0.5公斤之產物。

實例4：

自相同之開始材料開始，實例2之方法係另外修飾至當分離出結晶甲硫胺酸時產生之母液及洗滌水係加入於噴霧乾燥之前之生物量流中之程度(圖4)。

以於其他方面相似於實例2之程序，製造約1.1公斤之含甲硫胺酸之生物量，其，除了乾燥之生物量及其他發酵副產物及礦物鹽類以外，亦包含甲硫胺酸(約30%)。乾燥甲硫胺酸之數量係1.5公斤，具有約90%之純度。

實例5：

亦可擬想一種方法不同形式，其中將一部分之母液及一部分之洗滌水，於甲硫胺酸之結晶作用之後，加入於生物量分離之前之發酵器液體培養基中，及將其他之次流加入於噴霧乾燥之前之生物量流中(實例3與實例4之組合)。

【圖式簡單說明】

圖1至4顯示，用於製造結晶乾燥甲硫胺酸及乾燥含甲硫胺酸之生物量("生物量甲硫胺酸")之本發明之方法之不同

發展。

圖1顯示用於發酵之處理之程序。

圖2顯示用於發酵之處理之經修飾之程序，其中生物量係經由離心而分離出及該分離出之生物量然後係以水洗滌。

圖3顯示用於發酵之處理之經修飾之程序，其中當分離出結晶甲硫胺酸時產生之母液及洗滌液係於下一批次中加入含甲硫胺酸之發酵液體培養基中。

圖4顯示用於發酵之處理之經修飾之程序，其中當分離出結晶甲硫胺酸時產生之母液及洗滌液係於噴霧乾燥之前加入生物量流中。

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種藉由發酵製造甲硫胺酸之方法，一種分離所生成甲硫胺酸之方法，分離中所產生含甲硫胺酸之生物量，其用於製造飼料或飼料補充物之用途，及亦關於該經分離之甲硫胺酸用於製造食物或飼料或食物補充物或飼料補充物之用途。

六、英文發明摘要：

十一、圖式：

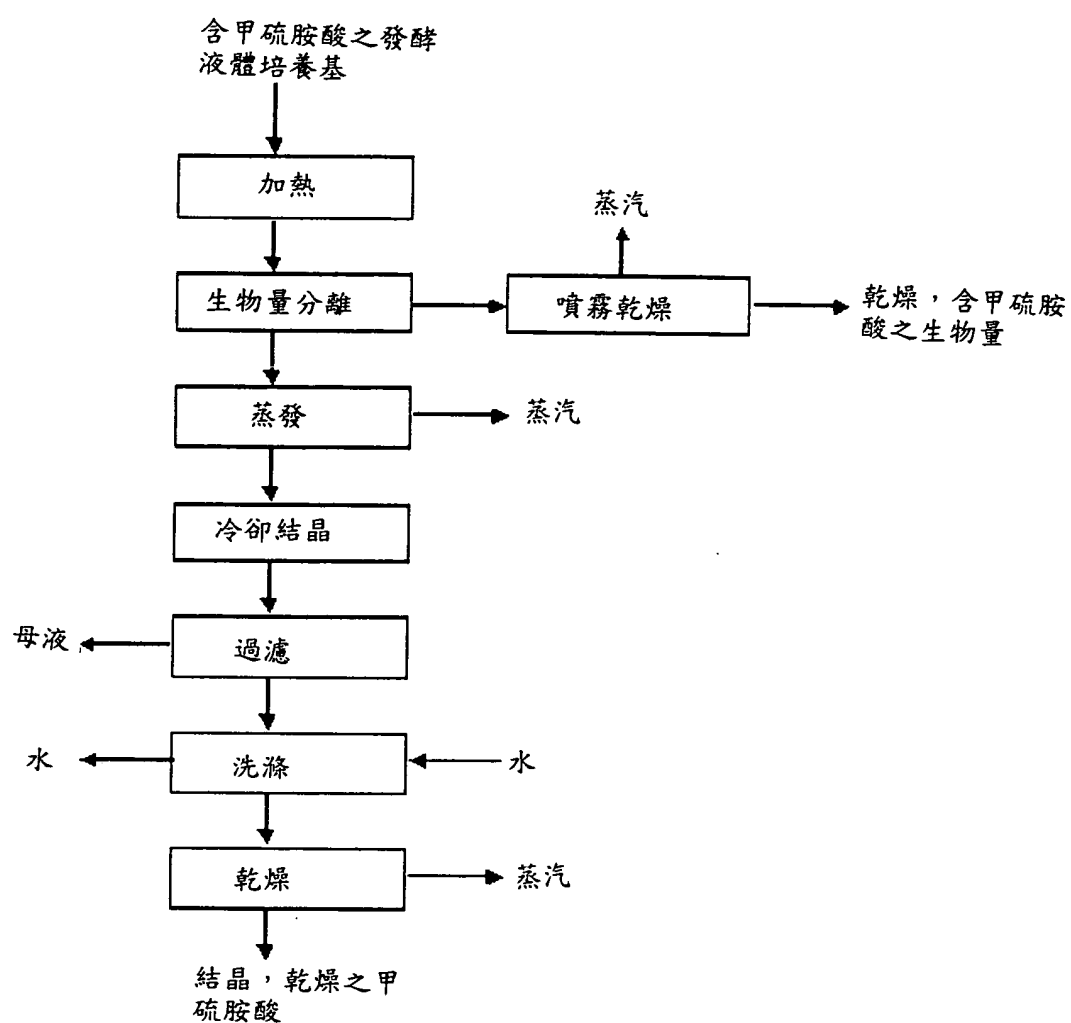


圖 1

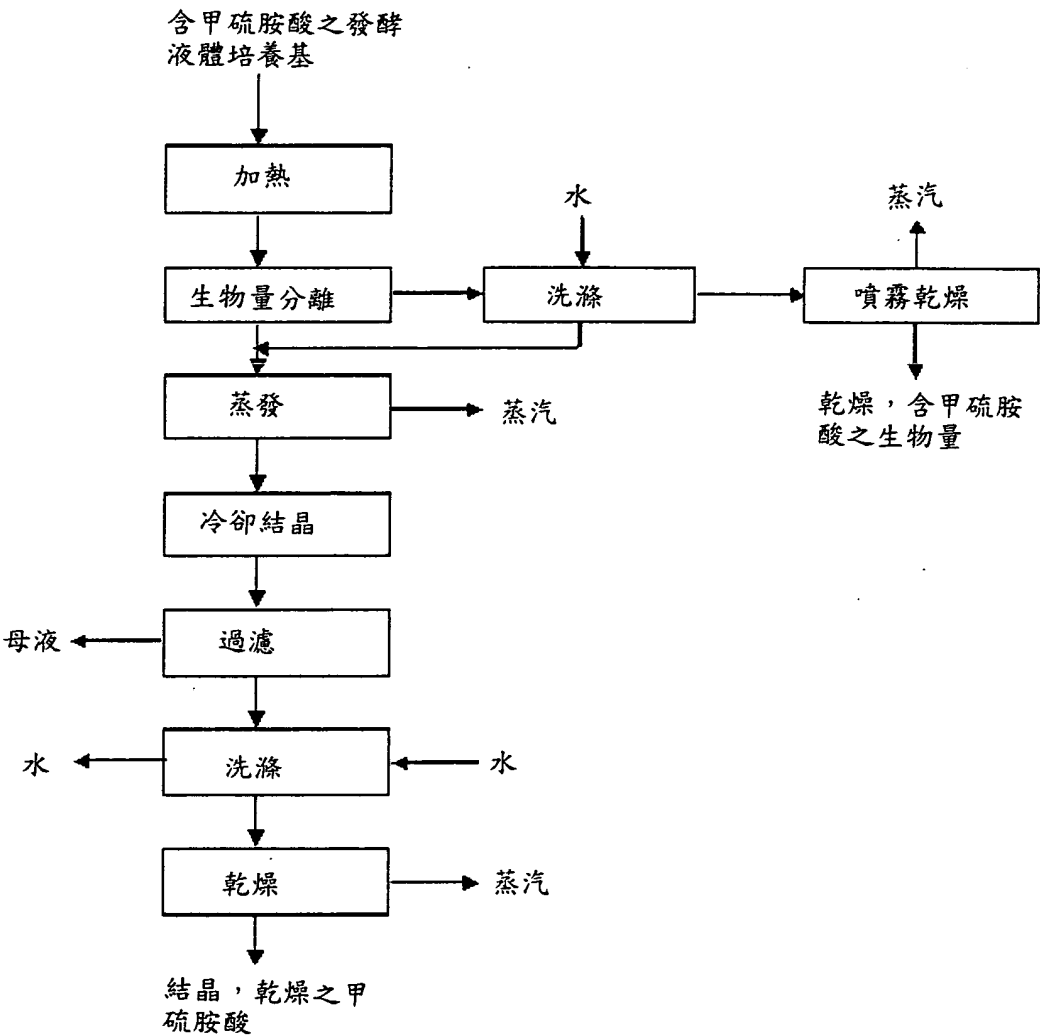


圖 2

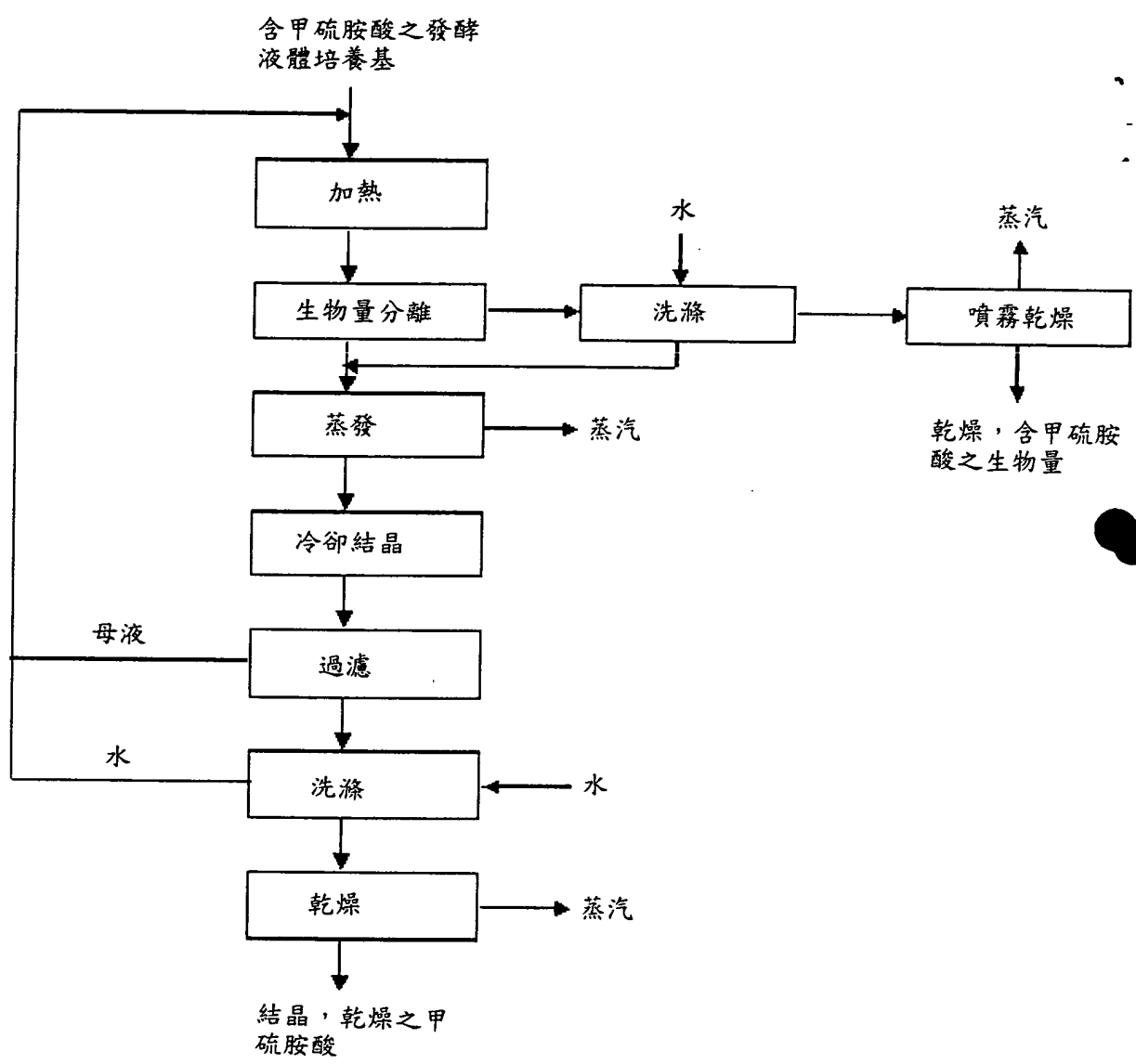


圖 3

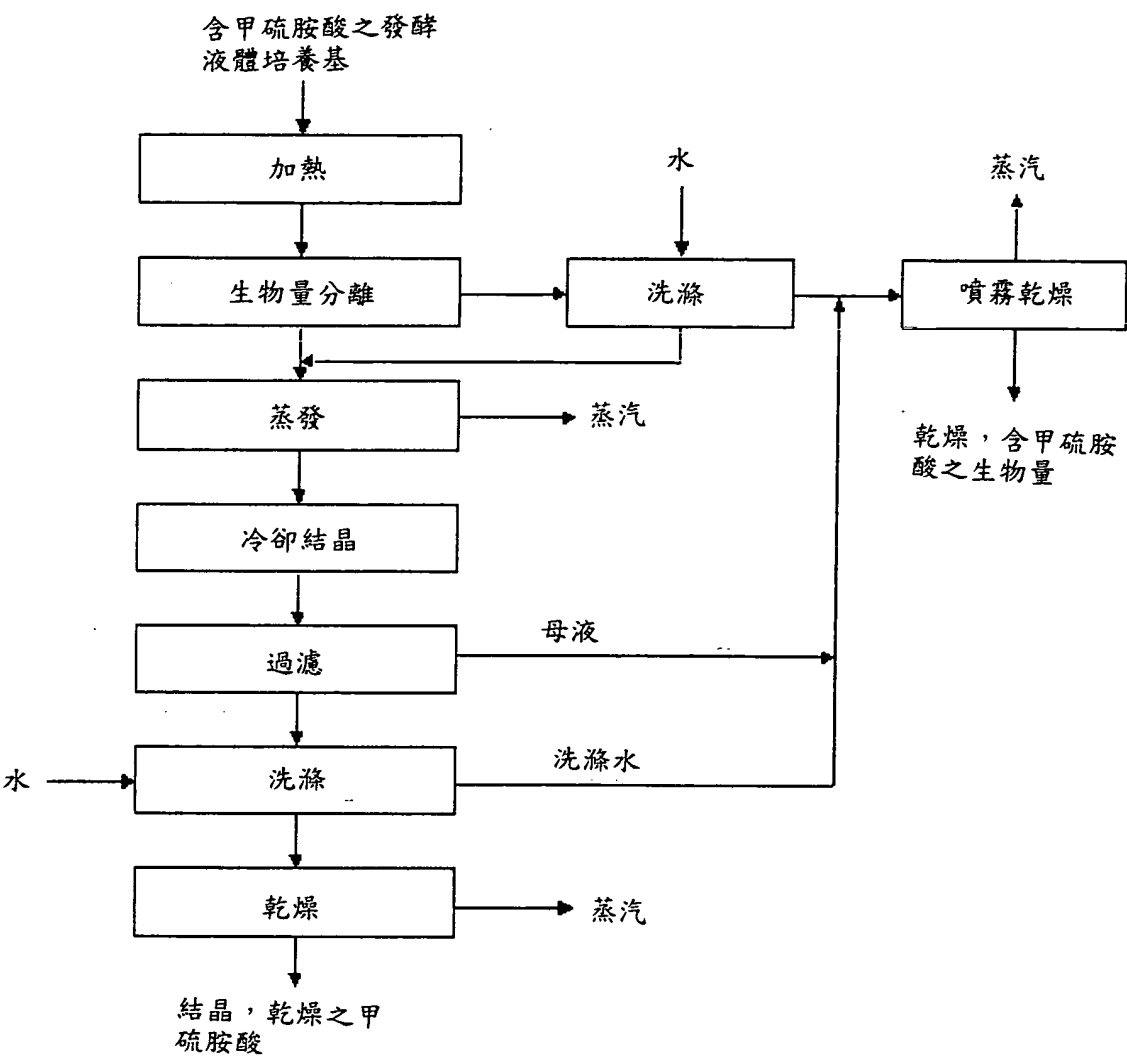


圖 4

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

公告本

97年12月3日修(更)正聲明

發明專利說明書

中文說明書替換頁(97年12月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：093139533

※ 申請日期：97.12.17

※IPC 分類：C12P 13/12 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

甲硫胺酸之製造

PRODUCTION OF METHIONINE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商贏創德固賽有限責任公司

EVONIK DEGUSSA GMBH

代表人：(中文/英文)

(1) 渥夫格 偉伯

WEBER, WOLFGANG

(2) 馬丁 費德門

FELDMANN, MARTIN

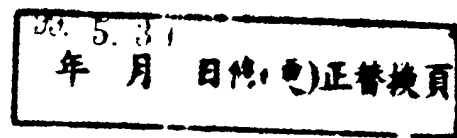
住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國伊森市45128雷寧郝斯街1-11號

RELLINGHAUSER STRASSE 1-11, 45128 ESSEN, GERMANY

國 籍：(中文/英文)

德國 GERMANY



九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種藉由發酵製造甲硫胺酸之方法，一種分離所生成甲硫胺酸之方法，分離中獲得之含甲硫胺酸之生物量，其用於製造飼料或飼料補充物之用途，及亦關於該經分離之甲硫胺酸用於製造食物或飼料或者食物或飼料補充物之用途。

【先前技術】

甲硫胺酸係使用於各種部門中，包括食品、飼料、化粧品及製藥工業。

迄今，僅用於D,L-甲硫胺酸之化學製造方法係已具有工業上重要性。用於此種合成之開始材料係硫化氫、甲硫醇、丙烯醛、氫氰酸或甲基氫硫基丙醛(見 Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1985)，第A2冊，第71頁)。

甲硫胺酸亦藉天然之細胞代謝方法而製造。其在工業規模之製造藉由細菌培養而快速進行，已發展該細菌培養以製造及分泌大量之需要之物質。特別適合於此種目的之微生物係非致病性之棒桿菌狀之細菌。

已知，甲硫胺酸可係經由發酵棒桿菌狀之細菌(特定言之麴胺酸棒桿菌(*Corynebacterium glutamicum*))之菌株而製造。由於高度重要性，因此連續地進行對於改良該製造方法之研究。對於該方法之改良可關於，例如，發酵步驟、營養培養基之組成、或微生物本身之本質表現性質。

及麩胺酸棒桿菌種，其係以其製造L-胺基酸之能力之特殊性而為吾人所知。

可提及之適合之菌株之實例係：

屬於棒桿菌屬者：

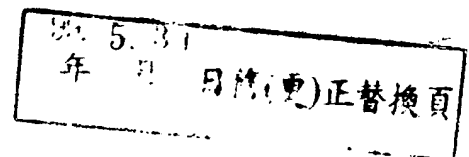
麩胺酸棒桿菌 ATCC 13032、嗜乙醯麩胺酸棒桿菌 (*Corynebacterium acetoglutamicum*) ATCC 15806、嗜乙醯乙酸棒桿菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC 13870、嗜胺基棒桿菌 (*Corynebacterium thermoaminogenes*) FERM BP-1539、棲糖蜜棒桿菌 (*Corynebacterium melassecola*) ATCC 17965、麩胺酸棒桿菌 KFCC10065、或麩胺酸棒桿菌 ATCC 21608；

或屬於短桿菌屬者：

提及黃色短桿菌 (*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067；乳酸發酵短桿菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869及叉開短桿菌 (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020；

(KFCC = Korean Federation of Culture Collection; ATCC = American Type Culture Collection; FERM BP = Collection of the National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Japan)

該等細菌菌株可係以適合之方式未經修飾或經遺傳學地修飾地使用。例如，可使用微生物，例如，其中該甲硫胺酸生物合成途徑之基因之表現係放大者，致使於細胞中存在較多之甲硫胺酸。或者，或另外地，關閉或減弱牽涉於降解甲硫胺酸之代謝途徑之基因之表現，亦係可能的。用於改良甲硫胺酸製造之適合之策略係自先前技藝而已為吾人所知及係敘述，例如，於 WO-A-02/10209、德國專利-A-102 170 58、德國專利-A-102 393 08、德國專利-A-102



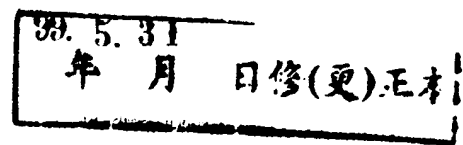
以此種方式修飾之基因可係存在於質體中，或較佳地整合於染色體中。於此種案例中，尚未以此種方式修飾之原來基因可仍然另外地存在，但較佳地可係交換為經修飾之基因。

為了降低於棒桿菌狀之細菌中測量之酶之活性，表現對於功能之相等物編碼之基因，諸如人工製造之突變型或來自其他生物之天然同源物，可係足夠的。於此種案例中，原來基因可仍然另外地存在，但較佳地可係交換為經修飾或同源之基因。

此外，放大甲硫胺酸生物合成途徑、半胱胺酸代謝途徑、天門冬胺鹽半醛合成、醣解、補復作用、戊糖磷酸代謝、檸檬酸循環或胺基酸輸出之一種或多種酶，對於甲硫胺酸之細菌之製造可係有利的。

例如，對於甲硫胺酸之製造，可放大一種或多種之下列基因表現：

- 對於天門冬胺酸鹽激酶編碼之基因 *lysC* (EP 1 108 790 A2；去氧核糖核酸-序列號 (DNA-SEQ NO.) 281)，
- 對於天門冬胺酸鹽半醛編碼之基因 *asd* (EP 1 108 790 A2；DNA-SEQ NO. 282)，
- 對於甘油醛-3-磷酸鹽脫氫酶編碼之基因 *gap* (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174: 6076-6086)，
- 對於3-磷甘油酸鹽激酶編碼之基因 *pgk* (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174: 6076-6086)，
- 對於丙酮酸鹽羧化酶編碼之基因 *pyc* (Eikmanns (1992),



十、申請專利範圍：

1. 一種製備甲硫胺酸之方法，包含
 - a) 於適合製造甲硫胺酸之條件下培養製造甲硫胺酸之微生物，
 - b) 加熱培養物至60°C至120°C一段時間使足以將任何已結晶之甲硫胺酸溶解，及
 - c) 將溫度維持於60°C至120°C並從微生物分離出發酵液體培養基。
2. 如請求項1之方法，其中步驟b)之加熱係進行至約70至100°C之溫度。
3. 如請求項1之方法，其中該微生物係天然或重組微生物。
4. 如請求項3之方法，其中該微生物係棒桿菌屬之天然或重組細菌。
5. 如請求項3之方法，其係製出L-甲硫胺酸。
6. 如請求項1之方法，進一步包含濃縮該發酵液體培養基且之後從該濃縮該發酵液體培養基結晶出甲硫胺酸。
7. 如請求項1之方法，其中含微生物部分中甲硫胺酸之含量範圍從大於3重量%至約40重量%。
8. 如請求項1之方法，進一步包含
 - d) 從發酵液體培養基結晶出甲硫胺酸。
9. 如請求項8之方法，進一步包含
 - e) 分離出結晶之甲硫胺酸以產生母液，
 - f) 洗滌已分離之結晶甲硫胺酸以產生洗滌液，及

g)乾燥結晶之甲硫胺酸。

10. 如請求項9之方法，其中步驟e)製得之母液與另一發酵批次之含甲硫胺酸液體部分結合。
11. 如請求項9之方法，其中步驟f)製得之洗滌液與另一發酵批次之含甲硫胺酸液體部分結合。
12. 如請求項9之方法，進一步包含從相同或另一發酵批次分離出微生物，且將步驟e)製得之母液加入該分離出之微生物。
13. 如請求項9之方法，進一步包含從相同或另一發酵批次分離出微生物，且將步驟f)製得之洗滌液加入該分離出之微生物。
14. 如請求項1之方法，進一步包含洗滌該微生物以產生廢洗滌液，並將廢洗滌液加入步驟c)之發酵液體培養基。
15. 如請求項14之方法，進一步包含乾燥該經洗滌之微生物。
16. 如請求項15之方法，其中乾燥包含噴霧乾燥。