(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 483 990**

(51) Int. CI.:

C12P 13/04 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12P 13/14 (2006.01)
C12P 13/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2006 E 06731671 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 1870476**

(54) Título: **Procedimiento para producir aminoácidos**

(30) Prioridad:

12.04.2005 JP 2005114254

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2014

(73) Titular/es:

KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, OHTEMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO, 100-8185, JP

(72) Inventor/es:

SHIMOSE, TSUYOSHI;
OHASHI, RYOU y
FUJINAGA, KATSUMI

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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 producir aminoácidos

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir aminoácidos.

Técnica de base

Un método bien conocido para la producción de aminoácidos es el método de fermentación que utiliza microorganismos pertenecientes a los géneros Corynebacterium, Brevibacterium, Escherichia, Microbacterium, Serratia, Bacillus y Pseudomonas, y microorganismos similares (publicación no de patente Nº 1).

En relación con el método de fermentación anterior, se han desarrollado diversas técnicas para aumentar la eficiencia de producción. Una de estas técnicas es un procedimiento en el que se induce la cristalización de L-aminoácido en un cultivo ajustando la temperatura y el pH del medio de cultivo o añadiendo un agente tensioactivo al cultivo para mantener la concentración de L-aminoácido en el cultivo por debajo de un cierto nivel, con lo que se puede evitar la inhibición de la producción por acumulación de L-aminoácido a concentración elevada (publicación de patente Nº 1).

También se conoce un procedimiento para la cristalización de ácido L-glutámico (L-Glu) que tiene una solubilidad relativamente baja en el medio de cultivo mediante el uso de un medio ajustado a un pH adecuado para la deposición de L-Glu (publicación de patente Nº 2) y un procedimiento para depositar cristales α de L-fenilalanina (L-Phe) en un cultivo mediante la adición de cristales α de L-Phe al cultivo o cambiando el pH del cultivo a un valor entre 7,8 y 8,3 en la fase en la que la concentración de L-Phe en el cultivo está más allá de la solubilidad de saturación (publicación de patente Nº 3).

Sin embargo, como el cultivo contiene microcristales de aminoácido en los procedimientos anteriores, la separación directa de los cristales y las células microbianas basada en la diferencia en el tamaño de partícula sólo puede dar un rendimiento de aminoácido bajo. Con el fin de aumentar el rendimiento de aminoácido en estos procedimientos, es necesario disolver los cristales de aminoácido acumulado en el cultivo, por ejemplo, mediante la adición de agua al cultivo o calentando el cultivo, y después de que las células microbianas son separadas del cultivo mediante el empleo de un separador centrífugo o de filtración, o similar, debe llevarse a cabo la cristalización por concentración.

Como método para separar directamente los cristales de aminoácido y las células microbianas, se conoce un método que utiliza un ciclón de líquido (publicación de patente Nº 4). Sin embargo, la tasa de recuperación de los cristales de aminoácido por este método no llega al 80%.

Los documentos EP-1 655 734, EP-1 624 069, EP-1 233 068 y EP-1 233 069 describen procedimientos para preparar aminoácidos con adición de cristales de siembra.

Como se describió anteriormente, un procedimiento para la producción de un aminoácido por fermentación en el que el aminoácido se cristaliza en un medio durante el cultivo es excelente, pero aún es necesario un procedimiento más eficiente.

Publicación no de patente Nº 1:

Fermentación de aminoácidos, Gakkai Shuppan Center (1986)

Publicación de patente Nº 1:

Solicitud de patente japonesa publicada no examinada Nº 288/87

Publicación de patente Nº 2:

Solicitud de patente japonesa publicada no examinada Nº 238593/02

Publicación de patente Nº 3:

Patente japonesa Nº 3239905

Publicación de Patente. Nº 4:

Patente japonesa Nº. 2958789

Descripción de la invención.

Problemas a resolver por medio de la invención.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento simple para producir un aminoácido con una elevada eficiencia de producción.

Medios para resolver los problemas.

La presente invención se refiere a los apartados siguientes (1) a (5).

(1) Un procedimiento para producir un aminoácido que comprende:

cultivar un microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en un medio, añadir al medio cristales del aminoácido que tienen un tamaño de partícula medio de 7 a 50 µm en algún momento después de que la concentración del aminoácido en el medio ha alcanzado la solubilidad de saturación y antes de que los cristales de aminoácido se depositen en el medio de forma que la concentración de los cristales del aminoácido se haga de 0,5 g/l o más, cultivar el microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en el medio, permitir que los cristales del aminoácido crezcan y se acumulen en el medio, y recuperar los cristales de aminoácido del cultivo, en donde la recuperación del aminoácido del cultivo se lleva a cabo separando el microorganismo que produce el aminoácido y los cristales acumulados del aminoácido basándose en la diferencia del tamaño de partícula de ellos, o basándose en la diferencia de peso específico entre ellos.

(2) Un procedimiento para producir un aminoácido que comprende:

cultivar un microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en un medio, añadir al medio cristales del aminoácido que tienen un tamaño de partícula medio de 7 a 50 µm en algún momento después de que la concentración del aminoácido en el medio ha alcanzado la solubilidad de saturación y antes de que los cristales de aminoácido se depositen en el medio de forma que el área de la superficie total de los cristales del aminoácido en el medio se hace 0,02 m^2/l o más, cultivar el microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en el medio, permitir que los cristales del aminoácido crezcan y se acumulen en el medio, y recuperar los cristales de aminoácido del cultivo, en donde la recuperación del aminoácido del cultivo se lleva a cabo separando el microorganismo que produce el aminoácido y los cristales acumulados del aminoácido basándose en la diferencia del tamaño de partícula entre ellos, o basándose en la diferencia de peso específico entre ellos.

(3) El procedimiento según los apartados anteriores (1) o (2), en donde los cristales del aminoácido añadidos son aquellos que tienen una superficie específica de 0,06 m^2/cm^3 o más.

(4) El procedimiento según uno cualquiera de los apartados anteriores (1) a (3), en donde los cristales del aminoácido formado y acumulado tienen un tamaño medio de partículas de 15 µm o más.

(5) El procedimiento según uno cualquiera de las apartados anteriores (1) a (4), en donde el aminoácido es la L-glutamina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-tirosina o L-triptófano.

Efecto de la invención.

La presente invención proporciona un procedimiento simple para producir un aminoácido con una eficiencia de producción elevada.

Breve descripción de los dibujos.

La Fig. 1 muestra la relación entre el tamaño medio de partícula, el área de la superficie específica y el área de la superficie total de los cristales del aminoácido añadido y la forma y la tasa de recuperación de los cristales de aminoácido acumulados en el medio. En las fotografías que se muestran en la figura, el lado vertical representa 1.000 µm.

Modos mejores de llevar a cabo la invención.

1. Microorganismos usados en el procedimiento de producción de la presente invención.

Los microorganismos utilizados en el procedimiento de producción de la presente invención no están limitados de forma específica siempre y cuando sean microorganismos que tienen la capacidad de producir un aminoácido, y puedan ser microorganismos aislados de la naturaleza o microorganismos que tienen una productividad de aminoácidos mejorada artificialmente.

Los microorganismos que tienen la productividad de aminoácidos aumentada artificialmente incluyen microorganismos obtenidos usando los métodos siguientes solos o en combinación:

(a) un método en el que al menos uno de los mecanismos que regulan la biosíntesis de un aminoácido se libera parcialmente o se libera completamente;

(b) un método en el que la expresión de al menos una de las enzimas implicadas en la biosíntesis de un aminoácido ha sido mejorada;

(c) un método en el que se incrementa el número de copias de al menos uno de los genes de enzimas implicadas en la biosíntesis de un aminoácido;

(d) un método en el que se debilita o se bloquea al menos una de las rutas metabólicas que se ramifican a partir de la ruta biosintética de un aminoácido a metabolitos distintos del aminoácido; y

(e) un método en el que se elige una cepa celular que tiene una resistencia mayor a un análogo de un aminoácido en comparación con una cepa de tipo silvestre.

Los métodos de los apartados anteriores (a) a (e) se describen específicamente en la bibliografía siguiente: (a), Agric. Biol. Chem., 43, 105-111 (1979), J. Bacteriol., 110, 761-763 (1972), Appl. Microbiol. Biotechnol, 39, 318-323 (1993), etc.; (b), Agric. Biol. Chem., 43, 105-111 (1979), J. Bacteriol, 110, 761-763 (1972), etc.; (c), Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 318-323 (1993), Agric. Biol. Chem., 39, 371-377 (1987), etc.; (d), Appl. Environ. Microbiol., 38, 181-190 (1979), Agric. Biol. Chem., 42, 1773-1778 (1978), etc.; y (e), Agric. Biol. Chem., 36, 1675-1684 (1972), Agric. Biol. Chem., 41, 109-116 (1977), Agric. Biol. Chem., 37, 2013-2023 (1973), Agric. Biol. Chem., 51, 2089-2094 (1987), etc.

En relación con los métodos para la preparación de microorganismos que tienen la capacidad de formar y acumular un aminoácido usando los anteriores apartados (a) a (e) individualmente o en combinación, se describen muchos ejemplos en Biotechnology 2 ª ed., Vol. 6, Products of Primary Metabolism (VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1996), sección 14a, 14b; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 79, 1-35 (2003); e Hiroshi Soda, et al., Amino Acid Fermentation, Gakkai Shuppan Center (1986). Además, hay diversos informes sobre los métodos específicos para preparar microorganismos que tienen la capacidad de formar y acumular un aminoácido; por ejemplo, la solicitud de patente japonesa publicada no examinada Nº 164297/03; Agric. Biol. Chem., 39, 153-160 (1975); Agric. Biol. Chem., 39, 1149-1153 (1975); solicitud de patente japonesa publicada no examinada Nº 13599/83; J. Gen. Appl. Microbiol, 4, 272-283 (1958); solicitud de patente japonesa publicada no examinada Nº 94985/88; Agric. Biol. Chem., 37, 2013-2023 (1973); documento WO97/15673; solicitud de patente japonesa publicada no examinada Nº 18596/81; solicitud de patente japonesa publicada no examinada Nº 144092/81; y la Publicación Nacional PCT Nº 511086/03. Consultando la bibliografía anterior, se pueden preparar los microorganismos que tienen la capacidad de producir un aminoácido.

Los microorganismos anteriores que tienen la capacidad de producir un aminoácido pueden ser cualquier microorganismo al que se puedan aplicar los métodos anteriores (a) a (e) o cualquier microorganismo que tenga los caracteres genéticos anteriores. Se prefieren los procariotas y más preferidos son las bacterias.

Los ejemplos de procariotas incluyen microorganismos pertenecientes a los géneros Escherichia, Serratia, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Microbacterium, Pseudomonas, Agrobacterium, Alicyclobacillus, Anabaena, Anacystis, Arthrobacter, Azotobacter, Chromatium, Erwinia, Methylobacterium, Phormidium, Rhodobacter, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Scenedesmus , Streptomyces, Synechoccus y Zymomonas. Ejemplos específicos son Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus coagulans, Bacillus licheniformis, Bacillus pumilus, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium immariophilum, Brevibacterium saccharolyticum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium acetoacidophilum, Microbacterium ammoniaphilum, Serratia ficaria, Serratia fonticola, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Agrobacterium radiobacter, Agrobacterium rhizogenes, Agrobacterium rubi, Anabaena cylindrica, Anabaena doliolum, Anabaena flosaquae, Arthrobacter aurescens, Arthrobacter citreus, Arthrobacter globiformis, Arthrobacter hydrocarboglutamicus, Arthrobacter mysorens, Arthrobacter nicotianae, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter protophormiae, Arthrobacter roseoparaffinus, Arthrobacter sulfureus, Arthrobacter ureafaciens, Chromatium buderi, Chromatium tepidum, Chromatium vinosum, Chromatium warmingii, Chromatium fluviatile, Erwinia uredovora, Erwinia carotovora, Erwinia ananas, Erwinia herbicola, Erwinia punctata, Erwinia terreus, Methylobacterium rhodesianum, Methylobacterium extorquens, Phormidium sp. ATCC 29409, Rhodobacter capsulatus, Rhodobacter sphaeroides, Rhodopseudomonas blastica, Rhodopseudomonas marina, Rhodopseudomonas palustris, Rhodospirillum rubrum, Rhodospirillum salexigens, Rhodospirillum salinarum, Streptomyces ambofaciens, Streptomyces aureofaciens, Streptomyces aureus, Streptomyces fungicidicus, Streptomyces griseochromogenes, Streptomyces griseus, Streptomyces lividans, Streptomyces olivogriseus , Streptomyces rameus, Streptomyces tanashiensis, Streptomyces vinaceus y Zymomonas mobilis. Los procariotas preferidos incluyen bacterias pertenecientes a los géneros Escherichia, Serratia, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Pseudomonas y Streptomyces , por ejemplo, las especies anteriormente mencionadas pertenecientes a los géneros Escherichia, Serratia, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Pseudomonas y Streptomyces . Entre las bacterias más preferidas se incluyen Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium ammoniagenes,

Corynebacterium lactofermentum, Corynebacterium flavum, Corynebacterium efficasis, Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Serratia marcescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa, Streptomyces coelicolor y Streptomyces lividans. Particularmente preferidos son Escherichia coli, Corynebacterium glutamicum y Brevibacterium ammoniagenes . Los ejemplos más específicos incluyen las cepas FERM P-4806, ATCC 14751 y ATCC 14752 que tienen la capacidad de producir L-glutamina, las cepas ATCC 13005 y ATCC 19561 que tienen la capacidad de producir L-valina, las cepas FERM BP-4704 y ATCC 21302 que tienen la capacidad de producir L-leucina, las cepas FERM BP-3757 y ATCC 14310 que tienen la capacidad de producir L-isoleucina, las cepas ATCC 13281 y ATCC 21669 que tienen la capacidad de producir L-fenilalanina, la cepa ATCC 21652 que tiene la capacidad de producir L-tirosina, y las cepas DSM 10118, DSM 10121, DSM 10123 y FERM BP-1777 que tienen la capacidad de producir L-triptófano.

Las cepas anteriores designadas por Nos. FERM, Nos. ATCC y Nos. DSM están disponibles de International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japón), American Type Culture Collection (EE.UU.) y Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Alemania), respectivamente.

2. Procedimiento para producir un aminoácido de la presente invención.

Los procedimientos para la producción de aminoácidos de la presente invención incluyen: (1) un procedimiento para producir un aminoácido según la reivindicación 1ª, que comprende añadir al medio cristales del aminoácido que tienen un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm de manera que la concentración de los cristales del aminoácido se haga de 0,5 g/l o más, cultivar el microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido del 1 anterior en el medio, permitir que se formen y se acumulen los cristales de aminoácido en el medio, y recuperar los cristales del aminoácido a partir del cultivo; y (2) un procedimiento para producir un aminoácido según la reivindicación 2ª, que comprende añadir al medio cristales del aminoácido que tienen un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm de forma que el área de la superficie total de los cristales del aminoácido en el medio se haga de 0,02 m^2/l o más, cultivar el microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido del 1 anterior en el medio, permitir que se formen y se acumulen cristales de aminoácido en el medio, y recuperar los cristales del aminoácido a partir del cultivo.

El cultivo del microorganismo en el medio anterior se puede llevar a cabo de la misma manera que en el método convencional usado para cultivar un microorganismo, excepto por la adición de cristales del aminoácido.

Esto es, se puede utilizar uno cualquiera de los medios naturales y de los medios sintéticos, si se trata de un medio adecuado para el cultivo eficiente del microorganismo que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, etc., que pueden ser asimiladas por el microorganismo, preferiblemente un medio líquido.

Como fuentes de carbono se pueden utilizar fuentes de carbono que puedan ser asimiladas por el microorganismo. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas incluyen carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas que los contienen, almidón e hidrolizado de almidón; ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido propiónico; y alcoholes tales como etanol y propanol.

Como fuentes de nitrógeno puede utilizarse amoníaco, sales de amonio de ácidos orgánicos o inorgánicos tales como cloruro amónico, sulfato amónico, acetato amónico y fosfato amónico, y otros compuestos que contienen nitrógeno, así como peptona, extracto de carne, extracto de levadura, licor de maceración del maíz (*corn steep liquor*), hidrolizado de caseína, torta de soja, torta de soja hidrolizada, y varias células microbianas fermentadas y productos digeridos de las mismas.

Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen dihidrogenofosfato potásico, hidrogenofosfato dipotásico, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y carbonato de calcio.

En cuanto a los cristales del aminoácido que ha de ser añadido en el procedimiento anterior (1), no hay restricción en la cantidad, el tipo de aminoácido, el tipo de forma cristalina, etc. de los cristales con tal de que sean cristales de un aminoácido que tienen un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm que puede dar un medio que tiene una concentración de cristales de 0,5 g/l o más. El tamaño de partícula medio de los cristales del aminoácido que se ha de añadir es de 7 a 50 µm, en particular preferiblemente de 10 a 35 µm, y lo más preferiblemente de 11 a 13 µm.

La cantidad de los cristales del aminoácido es tal que la concentración de los cristales del aminoácido en el medio después de la adición de los mismos se hace 0,5 g/l o más, preferiblemente de 2 a 30 g/l, más preferiblemente de 3 a 25 g/l, aún más preferiblemente de 4 a 22 g/l, particularmente preferible de 5 a 20 g/l, y lo más preferiblemente 5,5 a 16,5 g/l.

En cuanto a la combinación del anterior tamaño de partícula medio de los cristales del aminoácido que ha de ser añadido y la cantidad de adición de los mismos, no hay ninguna restricción siempre y cuando sea una combinación de un tamaño de partícula medio de 7 a 50 µm y una cantidad que da un medio que tiene una concentración de

cristales de 0,5 g/l o más. Esto es, la combinación es un tamaño de partícula medio de 7 a 50 µm y una cantidad que da un medio que tiene una concentración de cristales de 0,5 g/l o más, preferiblemente un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm y una cantidad que da un medio que tiene una concentración de cristales de 4 a 22 g/l, de forma particularmente preferible un tamaño medio de partículas de 10 a 35 µm y una cantidad que da un medio que tiene una concentración de cristales de 5 a 20 g/l, y lo más preferiblemente un tamaño de partícula medio de 11 a 13 µm y una cantidad que da un medio que tiene una concentración de cristales de 5,5 a 16,5 g/l.

Los cristales del aminoácido se añaden en algún momento después de que la concentración de aminoácido en el medio alcance la solubilidad de saturación y antes de que los cristales de aminoácido se depositen en el medio, más preferentemente en algún momento en el que el medio está sobresaturado con el aminoácido y antes de que los cristales de aminoácido se depositen en el medio. En lo anterior, "antes de que los cristales de aminoácido se depositen en el medio" se refiere preferiblemente al período durante el cual la presencia de cristales de aminoácido no se observa en absoluto en el medio; sin embargo, la deposición de una pequeña cantidad de cristales de aminoácido es permisible siempre y cuando el efecto de la presente invención se pueda conseguir en relación con la tasa de recuperación de cristales.

Cuando se añaden los cristales del aminoácido a un medio sobresaturado con el aminoácido, la cantidad de cristales que se han de añadir es de 0,5 g/l o más, preferiblemente de 2 a 30 g/l, más preferiblemente de 3 a 25 g/l , aún más preferiblemente de 4 a 22 g/l, de una forma particularmente preferible de 5 a 20 g/l, lo más preferiblemente de 5,5 a 16,5 g/l basado en la cantidad de medio en el momento de la adición.

Cuando se añaden los cristales del aminoácido a un medio sobresaturado con el aminoácido, la combinación del tamaño medio de partículas de los cristales del aminoácido que se han de añadir y cantidad de adición de los mismos son como sigue: la combinación es un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm y una cantidad de 0,5 g/l o más basada en la cantidad de medio en el momento de la adición, más preferiblemente un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm y una cantidad de 4 a 22 g/l, de forma particularmente preferible un tamaño medio de partículas de 10 a 35 µm y una cantidad de 5 a 20 g/l, y más preferiblemente un tamaño medio de partículas de 11 a 13 µm y una cantidad de 5,5 a 16,5 g/l.

En cuanto a los cristales del aminoácido que ha de ser añadido en el procedimiento anterior (2), no hay restricción en la cantidad, el tipo de aminoácido, el tipo de forma cristalina, etc., de los cristales siempre y cuando el área de la superficie total de los cristales de aminoácido en el medio se haga de 0,02 m^2/l o más. Los cristales que se han de añadir son cristales tales que el área superficial total de los cristales en el medio después de la adición se hace 0,02 m^2/l o más, preferiblemente de 0,08 a 70 m^2/l, más preferiblemente de 0,2 a 23 m^2/l, más preferiblemente de 0,4 a 15 m^2/l, de una forma particularmente preferible de 0,7 a 9,3 m^2/l, lo más preferiblemente de 2,0 a 7,0 m^2/l.

Los cristales del aminoácido que ha de ser añadido en el procedimiento anterior (2) incluyen cristales que tienen un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm y que dan un medio que tiene una concentración de cristales de 0,5 g/l o más, preferiblemente que tiene un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm y que da un medio que tiene una concentración de cristales de 4 a 22 g/l, de forma particularmente preferible que tiene un tamaño medio de partículas de 10 a 35 µm y que da un medio que tiene una concentración de cristales de 5 a 20 g/l, y lo más preferiblemente que tiene un tamaño medio de partículas de 11 a 13 µm y que da un medio que tiene una concentración de cristales de 5,5 a 16,5 g/l.

El momento para la adición de los cristales del aminoácido al medio es el mismo que en el procedimiento anterior (1).

Cuando se añaden los cristales del aminoácido a un medio sobresaturado con el aminoácido, los cristales de aminoácido que se han de añadir son unos cristales tales que el área de la superficie total de los cristales calculada sobre la base de la cantidad de medio en el momento de la adición es 0,02 m^2/l o más, preferiblemente de 0,08 a 70 m^2/l, más preferiblemente de 0,2 a 23 m^2/l, aún más preferiblemente de 0,4 a 15 m^2/l, de un modo particularmente preferible de 0,7 a 9,3 m^2/l, lo más preferiblemente de 2,0 a 7,0 m^2/l.

Específicamente, los ejemplos de los cristales del aminoácido incluyen cristales que tienen un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm cuya cantidad basada en la cantidad del medio en el momento de la adición es de 0,5 g/l o más, preferiblemente cristales que tienen un tamaño medio de partículas de 7 a 50 µm cuya cantidad basada en la cantidad del medio en el momento de la adición es de 4 a 22 g/l, de una forma particularmente preferible cristales que tienen un tamaño medio de partículas de 10 a 35 µm cuya cantidad basada en la cantidad del medio en el momento de la adición es de 5 a 20 g/l, y lo más preferiblemente cristales que tienen un tamaño medio de partículas de 11 a 13 µm cuya cantidad basada de la cantidad del medio en el momento de la adición es 5,5 a 16,5 g/l.

En lo anterior, la cantidad de medio en el cultivo puede medirse mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, la cantidad de medio puede medirse separando el medio y la materia insoluble, tal como las células microbianas, centrifugando el cultivo, midiendo el volumen de la materia insoluble sedimentada, y después restando el volumen medido de la cantidad del cultivo.

Además, los cristales del aminoácido que se ha de añadir en los procedimientos anteriores (1) y (2) incluyen cristales que tienen un área de superficie específica media de 0,06 m^2/cm^3 o más, preferiblemente de 0,07 a 7,2 m^2/cm^3, más preferiblemente 0,07 a 1,43 m^2/cm^3, aún más preferiblemente de 0,1 a 1,0 m^2/cm^3, de forma particularmente preferible de 0,14 a 0,72 m^2/cm^3.

El aminoácido que ha de ser añadido en los procedimientos anteriores (1) y (2) puede ser cualquier aminoácido que pueda ser producido por un microorganismo, pero es preferiblemente un aminoácido elegido entre el grupo que consiste en L-glutamina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano, más preferiblemente un aminoácido elegido entre el grupo que consiste en L-glutamina, L-valina y L-leucina, aún más preferiblemente L-glutamina. Sin embargo, los cristales α de L-fenilalanina pueden ser excluidos de los cristales del aminoácido que ha de ser añadido en el procedimiento de la presente invención.

Los cristales del aminoácido que se han de añadir al medio en la presente invención se pueden obtener como productos disponibles comercialmente o usando métodos conocidos tales como el método de fermentación y el método de purificación. Los cristales se pueden obtener también preparando cristales del aminoácido que tienen un tamaño de partícula medio deseado mediante la trituración de cristales de aminoácidos disponibles comercialmente o cristales de aminoácidos obtenidos por los métodos anteriormente conocidos usando molinos disponibles comercialmente, por ejemplo M4 Jiyu Mill (Nara Machinery Co., Ltd.), atomizador TAP-20 (Tokyo Atomizer Mfg Co., Ltd.) y Air Classifying Mill (Hosokawa Micron Powder Systems).

Por ejemplo, se pueden obtener cristales del aminoácido que tienen un tamaño medio de partículas de aproximadamente 45 µm por trituración de cristales de aminoácido que tienen un tamaño medio de partículas de aproximadamente 110 µm que se obtienen por un método de fermentación conocido y un método de purificación utilizando el aparato M4 Jiyu Mill bajo las siguientes condiciones: tamiz, Φ 1,0 mm; rotación, 4.500 rpm; velocidad, aprox. 400 kg/h. Además, se pueden obtener los cristales de aminoácido que tienen un tamaño medio de partículas de aproximadamente 11 µm por trituración de los cristales obtenidos por el tratamiento de trituración anterior bajo las siguientes condiciones: tamiz, Φ 0,3 mm; rotación, 6.000 rpm; velocidad, aprox. 200 kg/h.

El área de la superficie específica de los cristales del aminoácido se puede medir usando analizadores disponibles comercialmente, por ejemplo, SK LASER MICRON SIZER LMS-24 (analizador de distribución de partículas por difracción de láser y método de dispersión, producido por Seishin Enterprise Co., Ltd.). En la medida de la superficie específica de los cristales del aminoácido, es preferible calcular el área de superficie específica suponiendo que los cristales son esféricos y de una forma similar.

El área de la superficie total de los cristales del aminoácido puede calcularse a partir del área de la superficie específica de los cristales y la cantidad de adición de los mismos.

El cultivo se lleva a cabo normalmente en condiciones aerobias, por ejemplo, mediante cultivo en agitación o cultivo sumergido con agitación centrífuga bajo aireación. La temperatura de cultivo es preferiblemente de 15 a 40 °C, y el periodo de cultivo es normalmente de 5 horas a 7 días. El pH se mantiene entre 3,0 y 9,0 durante el cultivo. El ajuste del pH se lleva a cabo mediante el uso de un ácido orgánico o inorgánico, una solución alcalina, urea, carbonato de calcio, amoniaco, etc.

Si es necesario, se pueden añadir al medio antibióticos tales como ampicilina y tetraciclina durante el cultivo.

Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector de expresión que comprende un promotor inducible, puede añadirse al medio un inductor, si es necesario. Por ejemplo, en el caso de un microorganismo transformado con un vector de expresión que comprende el promotor lac, se puede añadir al medio isopropil-β-D-tiogalactopiranósido o similares; y en el caso de un microorganismo transformado con un vector de expresión que comprende el promotor trp, se puede añadir ácido indolacrílico o similar.

El aminoácido acumulado en el medio en los procedimientos anteriores puede ser cualquier aminoácido capaz de ser producido por un microorganismo, y es preferiblemente un aminoácido elegido entre el grupo que consiste en L-glutamina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano, más preferiblemente un aminoácido elegido entre el grupo que consiste en L-glutamina, L-valina y L-leucina, aún más preferiblemente L-glutamina.

Los cristales del aminoácido acumulado en el medio en los procedimientos anteriores incluyen cristales que tienen un tamaño medio de partícula de 15 µm o más, preferiblemente 20 µm o más, más preferiblemente 30 µm o más, aún más preferiblemente 40 µm o más, de forma particularmente preferible 50 µm o más, lo más preferiblemente 60 o más.

En los procedimientos de la presente invención, la recuperación de los cristales del aminoácido en el cultivo se puede llevar a cabo por cualquier método ordinario para la purificación de aminoácidos. Preferiblemente, los cristales del aminoácido se separan y se purifican separando directamente los cristales y las células microbianas en el cultivo

después de terminar el cultivo mediante la utilización de la diferencia del tamaño de partícula y del peso específico entre ellos.

La anterior separación y purificación de cristales del aminoácido utilizando la diferencia de tamaño de partícula y de peso específico pueden llevarse a cabo por métodos conocidos tales como el método de clasificación gravitacional y el método de clasificación centrífuga. Se prefiere el método de clasificación centrífuga, en particular el que usa una centrífuga de tipo decantador.

Por los métodos de recuperación descritos anteriormente se pueden obtener cristales del aminoácido suficientemente purificados con una tasa de recuperación elevada. Si es necesario, los cristales se pueden purificar más intensamente por métodos ordinarios usando carbón activo, resinas de intercambio iónico, etc., o por medios tales como la extracción con un disolvente orgánico, la cristalización, cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

Ciertas realizaciones de la presente invención se ilustran en los ejemplos que siguen. Estos ejemplos no deben considerarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1.

Producción de cristales de L-glutamina (1).

Se cultivó Corynebacterium glutamicum ATCC 14752 en un medio de producción (250 g/l de glucosa, 30 g/l de NH_4Cl, 1,0 g/l de K_2HPO_4 , 1,0 g/l de KH_2PO_4, 0,5 g/l de $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 20 mg/l de $FeSO_4$, 2 mg/l de $MnSO4 \cdot 4\ H_2O$, 10 µg/l de biotina y 1 mg/ l de hidrocloruro de tiamina, pH 6,8) en un fermentador de jarro de 500 l con un ajuste apropiado del pH y de la temperatura. Después de iniciarse el cultivo, en un momento después de que la concentración de L-glutamina en el medio alcanzó la solubilidad de saturación y antes de que los cristales de L-glutamina se depositasen en el medio, se añadieron al medio cristales de L-glutamina que tienen un tamaño medio de partículas de 40 µm de modo que la concentración de cristales se hizo 16,5 g/l. Después se continuó el cultivo, creciendo así cristales de L-glutamina en el medio. El cultivo se terminó aproximadamente 96 horas después del comienzo de la misma, con lo que se obtuvieron 210 l de un cultivo que contiene 90 g/l de L-glutamina. Los cristales de L-glutamina (6,2 kg) se obtuvieron a partir del cultivo por separación usando un decantador (PTM006, Tomoe Engineering Co., Ltd.). El tamaño medio de partículas de los cristales obtenidos fue de 62 µm. La tasa de recuperación de los cristales depositados en el medio mediante el uso del decantador fue del 98,9%.

Ejemplo 2.

Producción de cristales de L-glutamina (2).

El cultivo se llevó a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 1, excepto que los cristales de L-glutamina que tienen el tamaño medio de partículas que se muestra en la Fig. 1 fueron utilizados como cristales que se añaden al medio, y se obtuvieron cristales de L-glutamina. El área de la superficie específica de cristales de L-glutamina se midió usando SK LASER MICRON SIZER LMS-24 (analizador de distribución de partículas por difracción de láser y método de dispersión, producido por Seishin Enterprise Co., Ltd.). En la medida del área de la superficie específica de los cristales de L-glutamina, el cálculo se realizó suponiendo que los cristales son esféricos y tienen una forma similar.

La Fig. 1 muestra la forma de los cristales de L-glutamina añadidos y los cristales de L-glutamina obtenidos por fermentación, y la tasa de recuperación, contenido seco, etc., de los cristales de L-glutamina.

Se puede observar a partir de la Fig. 1 que cuando no se añadieron cristales al medio, se redujo la tasa de recuperación de cristales por centrifugación debido a la deposición de microcristales en el medio, y que la adición de cristales que tienen un tamaño de partícula menor tiende a aumentar la tasa de recuperación de cristales. En los casos en que se añaden los cristales, los cristales de aminoácido obtenidos en el medio al finalizar el cultivo tenían un tamaño medio de partícula de 30 µm o más. Además, se encontró que el contenido de los cristales obtenidos separando los cristales producidos usando un decantador y después secando los cristales separados por deshidratación utilizando una centrifugadora de cesta (contenido seco), mejoró por la adición de cristales que tienen una superficie total más grande.

Los resultados anteriores han revelado que de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, en la producción fermentativa de varios aminoácidos entre los que se incluye la L-glutamina, el tamaño de partícula de los cristales del aminoácido depositados en el medio durante el cultivo puede controlarse mediante la adición de cristales del aminoácido al medio para mantener el grado de sobresaturación del aminoácido en el medio por debajo de un cierto nivel y para permitir que esté presente en el medio un número adecuado de cristales del aminoácido como cristales de siembra, esto es, ajustando el tamaño medio de partícula y la cantidad o el área de la superficie total de los cristales de aminoácido que ha de ser añadido al medio, y, como resultado, se pueden obtener cristales del aminoácido que son separables fácilmente de las células microbianas con una elevada tasa de recuperación.

Aplicabilidad industrial.

De acuerdo con la presente invención, se pueden producir aminoácidos de manera eficiente y sencilla.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un aminoácido, que comprende:

cultivar un microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en un medio,

añadir al medio cristales del aminoácido que tienen un tamaño de partícula medio de 7 a 50 µm en algún momento después de que la concentración del aminoácido en el medio ha alcanzado la solubilidad de saturación y antes de que los cristales del aminoácido se depositen en el medio de forma que la concentración de los cristales del aminoácido se haga 0,5 g/l o más,

cultivar el microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en el medio,

permitir que los cristales del aminoácido crezcan y se acumulen en el medio, y

recuperar del cultivo los cristales del aminoácido,

en donde la recuperación del aminoácido del cultivo se lleva a cabo separando el microorganismo que produce el aminoácido y los cristales acumulados del aminoácido basándose en la diferencia de tamaño de partícula entre ellos, o basándose en la diferencia de peso específico entre ellos.

2. Un procedimiento para producir un aminoácido, que comprende:

cultivar un microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en un medio,

añadir al medio cristales del aminoácido que tienen un tamaño de partícula medio de 7 a 50 µm en algún momento después de que la concentración del aminoácido en el medio ha alcanzado la solubilidad de saturación y antes de que los cristales del aminoácido se depositen en el medio de forma que el área de la superficie total de los cristales del aminoácido en el medio se haga 0,02 m^2/l o más,

cultivar el microorganismo que tiene la capacidad de producir el aminoácido en el medio,

permitir que los cristales del aminoácido crezcan y se acumulen en el medio, y

recuperar los cristales de aminoácido del cultivo,

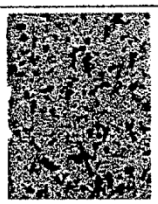
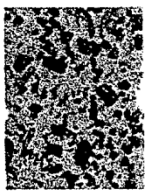
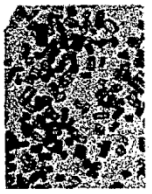
en donde la recuperación del aminoácido del cultivo se lleva a cabo separando el microorganismo que produce el aminoácido y los cristales acumulados del aminoácido basándose en la diferencia de tamaño de partícula entre ellos, o basándose en la diferencia de peso específico entre ellos.

3. El procedimiento según las reivindicaciones 1ª o 2ª, en donde los cristales del aminoácido añadido son aquellos que tienen un área de superficie específica de 0,06 m^2/cm^3 o más.

4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en donde los cristales del aminoácido formados y acumulados tienen un tamaño de partícula medio de 15 µm o más.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en donde el aminoácido es L-glutamina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-fenilalanina, L-tirosina o L-triptófano.

Figura 1

	①	②	③	④	Control
Tamaño de partícula de los cristales añadidos (μm)	30	45	70	110	—
Cantidad de adición (g/l)	5.5	5.5	5.5	5.5	—
Fotografía de los cristales añadidos					—
Area de la superficie específica de los cristales añadidos (m^2/cm^3)	0.24	0.16	0.10	0.07	—
Area de la superficie total de los cristales añadidos (m^2/L)	0.86	0.57	0.36	0.25	—
Fotografía del cultivo después de terminar el cultivo					
Tasa de recuperación de cristales (%)	92.1	92.6	87.1	82.1	33.4
Contenido seco (%)	98.6	98.3	96.3	96.5	83.9
Cantidad células secas (%)	1.5	1.1	2.5	2.2	10.7