

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 596**

51 Int. Cl.:

G01N 33/84	(2006.01)
C12M 1/34	(2006.01)
C12M 1/36	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
C12P 13/08	(2006.01)
C12P 13/10	(2006.01)
C12P 13/24	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2014 PCT/JP2014/076468**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15050234**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2014 E 14850532 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3053999**

54 Título: **Aparato de control de amoniaco y método de control de amoniaco**

30 Prioridad:

02.10.2013 JP 2013207519

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

TAKESHITA, RYO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 761 596 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

Aparato de control de amoniaco y método de control de amoniaco

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un aparato para controlar amoniaco y a un método para controlar amoniaco para fermentación que son para controlar la concentración de amoniaco de un medio de cultivo contenido en un tanque de cultivo.

10

Técnica anterior

Desde hace mucho tiempo, el amoniaco es una fuente de suministro muy importante de nitrógeno como nutriente indispensable usado para fermentación.

15

Como técnica existente para medir la concentración de amoniaco, existe una técnica de usar un electrodo de iones.

Por ejemplo, en el método descrito en el documento de patente 1, la concentración de amoniaco en un medio de fermentación líquido se controla para que esté a una determinada concentración o inferior, y de ese modo se cultivan bacterias en fermentación a un valor de pH superior. De ese modo se reducen las contraindicaciones que van a añadirse al medio para la producción de una sustancia básica mediante fermentación y como resultado se simplifica significativamente el procedimiento de fabricación.

20

Referencia de la técnica anterior

25

Bibliografía de patentes

Documento de patente 1: publicación de patente internacional WO2006/038695

30 Divulgación de la invención**Objetivo que va a lograrse mediante la invención**

Sin embargo, la técnica convencional anteriormente mencionada tiene un problema ya que es difícil controlar directamente la concentración de amoniaco en el medio de fermentación líquido, es decir, medir o controlar directamente la concentración de amoniaco en un tanque de cultivo durante el cultivo.

35

Concretamente, tiene un problema de que, tal como se muestra en la figura 9 (diagrama de flujo que muestra un ejemplo de procedimiento convencional de control de la concentración de amoniaco), con el fin de conocer la concentración de amoniaco total (concentración total de NH_3 y NH_4^+) en el medio de cultivo, se requiere una serie de operaciones de tomar muestras del medio de cultivo desde el interior del tanque de cultivo (etapa SA-1), mezclar el medio de cultivo muestreado con un líquido de reacción fuertemente alcalino (por ejemplo, NaOH) (etapa SA-2) y medir de manera continua el amoniaco existente que se ha convertido en amoniaco no ionizado (NH_3) fuera del tanque de cultivo (etapa SA-3). Es decir, es difícil realizar de manera estéril la serie de operaciones para la medición con el medio de cultivo muestreado fuera del tanque de cultivo. Además, dado que el medio de cultivo usado para la medición contiene el líquido de reacción fuertemente alcalino (por ejemplo, NaOH), no puede recircularse de vuelta al tanque de cultivo y debe desecharse. Por tanto, una frecuencia de medición superior produce un mayor desperdicio del medio de cultivo, y el número de veces de mediciones reales es limitado (etapa SA-4).

40

45

Además, en el tanque de cultivo, se consume amoniaco de manera continua, pero la tasa de consumo de amoniaco no es constante. Por tanto, también tiene un problema de que, tal como se muestra en la figura 9, aunque la concentración de amoniaco se mida mediante la operación de toma de muestras anteriormente mencionada con un determinado intervalo (etapa SA-5), no puede conocerse la tendencia a corto plazo de la misma, y por tanto no puede controlarse la concentración de amoniaco en el medio de cultivo para que sea constante (etapa SA-6).

50

Además, aunque el amoniaco no ionizado (NH_3) que existe parcialmente en el medio de cultivo se mida con un electrodo de iones en vista de los problemas anteriormente mencionados de la técnica convencional, presenta un problema de que no es fácil verificar los valores medidos para corregir errores que se producen durante el cultivo. Esto se debe a que, con el fin de conocer la concentración de amoniaco actual correcta, es necesario medir la concentración de amoniaco total para un medio de cultivo muestreado que se ha mezclado con un líquido de reacción fuertemente alcalino de modo que el amoniaco en el medio de cultivo se convierte en amoniaco no ionizado (NH_3).

60

Concretamente, esto se debe a que, en la fermentación habitual, el valor de pH del medio de cultivo está dentro de un intervalo de levemente ácido a levemente alcalino (aproximadamente de pH 5 a 9), por tanto una parte o sustancialmente la totalidad del amoniaco que existe en el medio de cultivo existe como ion amonio ionizado (NH_4^+),

65

y por tanto es difícil obtener la concentración de amoníaco total (concentración total de NH_3 y NH_4^+) en el medio de cultivo sólo midiendo la concentración de amoníaco no ionizado (NH_3) con el electrodo de iones anteriormente mencionado. Por tanto, no puede controlarse correctamente la concentración de amoníaco total.

- 5 La presente invención se logró en vista de los problemas anteriores, y un objetivo de la presente invención es proporcionar un aparato para controlar amoníaco y un método para controlar amoníaco que permitan el cultivo controlando de manera continua y arbitraria la concentración de amoníaco en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo para fermentación.

10 Medios para lograr el objetivo

Con el fin de lograr el objetivo mencionado anteriormente, la presente invención proporciona el siguiente método y aparato.

- 15 (1) Un método de control de amoníaco para fermentación, que es para controlar la concentración de amoníaco de un medio de cultivo contenido en un tanque de cultivo, en el que la concentración de amoníaco en el tanque de cultivo se controla usando un aparato de control de amoníaco que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoníaco que suministra amoníaco al tanque de cultivo, un sensor de amoníaco que responde a amoníaco no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y una parte de control conectada al dispositivo de alimentación de amoníaco y al sensor de amoníaco, y método que comprende las siguientes etapas realizadas por la parte de control: una etapa de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado de calcular la concentración de amoníaco no ionizado del medio de cultivo sustituyendo la señal del sensor de amoníaco en una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoníaco no ionizado del medio de cultivo y la señal del sensor de amoníaco, y una etapa de instrucción de suministro de amoníaco de instruir al dispositivo de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoníaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada, en el que el aparato de control de amoníaco está además conectado a un sensor de pH para medir un valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control: una etapa de cálculo de concentración de amoníaco total de calcular la concentración de amoníaco total a partir de la concentración de amoníaco no ionizado calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado y un valor de pH medido con el sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoníaco que representa una razón existente de concentración de amoníaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo a cada valor de pH, y en el que, en la etapa de instrucción de suministro de amoníaco, se usa la concentración de amoníaco total en lugar de la concentración de amoníaco no ionizado.

- 35 (2) El método de control de amoníaco tal como se mencionó anteriormente, que comprende además la etapa de creación de curva de calibración de crear la curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoníaco no ionizado en el medio de cultivo y la señal del sensor de amoníaco.

- 40 (3) El método de control de amoníaco tal como se mencionó anteriormente, que comprende proporcionar un sensor de amoníaco externo fuera del tanque de cultivo para medir la concentración de amoníaco no ionizado, y obtener una señal a partir del sensor de amoníaco externo midiendo la concentración de amoníaco no ionizado de un medio de cultivo, que, tras recogerse a partir del tanque de cultivo, se vuelve lo suficientemente alcalino como para convertir ion amonio en amoníaco no ionizado con el sensor de amoníaco externo, como señal para verificación, y método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control: una etapa de verificación de verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoníaco no ionizado calculada a partir de la señal para verificación basándose en la curva de calibración representa la concentración de amoníaco total calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoníaco total.

- 50 (4) El método de control de amoníaco tal como se mencionó anteriormente, en el que el aparato de control de amoníaco está conectado al sensor de amoníaco externo, y método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control: una etapa de introducción de señal para verificación de introducir la señal a partir del sensor de amoníaco externo, como señal para verificación.

- 55 (5) Un método para producir una sustancia objetivo mediante fermentación que comprende cultivar un microorganismo que tiene una capacidad para producir la sustancia objetivo en un tanque de cultivo que contiene un medio de cultivo, y recoger la sustancia objetivo a partir del cultivo, en el que el microorganismo se cultiva controlando la concentración de amoníaco del medio de cultivo mediante un método de control de amoníaco, en el que la concentración de amoníaco en el tanque de cultivo se controla usando un aparato de control de amoníaco que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoníaco que suministra amoníaco al tanque de cultivo, un sensor de amoníaco que responde a amoníaco no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y una parte de control conectada al dispositivo de alimentación de amoníaco y al sensor de amoníaco, y método que comprende las siguientes etapas realizadas por la parte de control: una etapa de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado de calcular la concentración de amoníaco no ionizado del medio de cultivo sustituyendo la señal del sensor de amoníaco en una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoníaco no ionizado del medio de cultivo y la señal del sensor de amoníaco, y una etapa de instrucción de

suministro de amoniaco de instruir al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada, en el que el aparato de control de amoniaco está además conectado a un sensor de pH para medir un valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control: una etapa de cálculo de concentración de amoniaco total de calcular la concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado y un valor de pH medido con el sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniaco que representa una razón existente de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo a cada valor de pH, y en el que, en la etapa de instrucción de suministro de amoniaco, se usa la concentración de amoniaco total en lugar de la concentración de amoniaco no ionizado.

(6) El método de producción tal como se mencionó anteriormente, en el que dicho método de control de amoniaco comprende además la etapa de creación de curva de calibración de crear la curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado en el medio de cultivo y la señal del sensor de amoniaco.

(7) El método de producción tal como se mencionó anteriormente, en el que dicho método de control de amoniaco comprende proporcionar un sensor de amoniaco externo fuera del tanque de cultivo para medir la concentración de amoniaco no ionizado, y obtener una señal a partir del sensor de amoniaco externo midiendo la concentración de amoniaco no ionizado de un medio de cultivo, que, tras recogerse a partir del tanque de cultivo, se vuelve lo suficientemente alcalino como para convertir ion amonio en amoniaco no ionizado con el sensor de amoniaco externo, como señal para verificación, y método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control: una etapa de verificación de verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoniaco no ionizado calculada a partir de la señal para verificación basándose en la curva de calibración representa la concentración de amoniaco total calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoniaco total.

(8) El método de producción tal como se mencionó anteriormente, en el que el aparato de control de amoniaco está conectado al sensor de amoniaco externo, y en el que dicho método de control de amoniaco comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control: una etapa de introducción de señal para verificación de introducir la señal a partir del sensor de amoniaco externo, como señal para verificación.

(9) El método de producción tal como se mencionó anteriormente, en el que la sustancia objetivo es un L-aminoácido, un ácido orgánico, un ácido nucleico, un alcohol o una proteína.

(10) El método de producción tal como se mencionó anteriormente, en el que la sustancia objetivo es un aminoácido básico seleccionado del grupo que consiste en L-lisina, L-arginina y L-histidina.

(11) El método de producción tal como se mencionó anteriormente, que comprende reducir la cantidad de iones sulfato y/o iones cloruro usados como contraiones del aminoácido básico ajustando la concentración de amoniaco total del medio de cultivo para que esté dentro de un determinado intervalo de concentración durante al menos una parte del procedimiento de cultivo total.

(12) Un aparato de control de amoniaco que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoniaco adaptado para suministrar amoniaco a un tanque de cultivo para fermentación, un sensor de amoniaco, y una parte de control, en el que: el sensor de amoniaco está adaptado para responder a amoniaco no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, la parte de control está conectada al dispositivo de alimentación de amoniaco y al sensor de amoniaco, la parte de control está configurada para crear una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y una señal a partir del sensor de amoniaco, configurada para calcular la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo sustituyendo la señal del sensor de amoniaco en la curva de calibración, y configurada para instruir al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada, que está conectado además a un sensor de pH adaptado para medir el valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y en el que la parte de control está configurada además para calcular la concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada y el valor de pH medido con el sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniaco que representa una razón existente de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo a cada valor de pH, y se usa la concentración de amoniaco total en lugar de la concentración de amoniaco no ionizado.

(13) El aparato de control de amoniaco tal como se mencionó anteriormente, en el que la parte de control está configurada además para verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoniaco no ionizado calculada a partir de una señal para verificación basándose en la curva de calibración representa la concentración de amoniaco total calculada mediante los medios de cálculo de concentración de amoniaco total, y la señal para verificación es: una señal obtenida con un sensor de amoniaco externo proporcionado fuera del tanque de cultivo para medir la concentración de amoniaco no ionizado preparando el sensor de amoniaco externo, y medir la concentración de amoniaco no ionizado de un medio de cultivo, que, tras recogerse a partir del tanque de cultivo, se

vuelve lo suficientemente alcalino como para convertir ion amonio en amoniaco no ionizado con el sensor de amoniaco externo.

5 (14) El aparato de control de amoniaco tal como se mencionó anteriormente, que está conectado al sensor de amoniaco externo, y en el que la parte de control está adaptada además para introducir la señal a partir del sensor de amoniaco externo, como señal para verificación.

10 (15) El aparato de control de amoniaco tal como se mencionó anteriormente, que está configurado para el control en tiempo real de amoniaco en un medio de cultivo.

15 (16) Un método para producir una sustancia objetivo mediante fermentación que comprende cultivar un microorganismo que tiene una capacidad para producir la sustancia objetivo en un tanque de cultivo que contiene un medio de cultivo para producir y acumular la sustancia objetivo en el medio de cultivo, en el que la concentración de amoniaco total del medio de cultivo se ajusta para que esté dentro de un determinado intervalo de concentración durante al menos una parte del procedimiento de cultivo total usando el aparato de control de amoniaco tal como se mencionó anteriormente.

Efecto de la invención

20 Según la presente invención, se crea una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado en el tanque de cultivo y la señal a partir del sensor de amoniaco (por ejemplo, tensión eléctrica), se calcula la concentración de amoniaco no ionizado en el tanque de cultivo con una señal a partir del sensor de amoniaco basándose en la curva de calibración, y se instruye al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una determinada concentración. Por tanto, la presente invención tiene efectos de que se permiten operaciones estériles para una serie de operaciones para la medición en un tanque de cultivo, y el cultivo puede realizarse controlando de manera continua y arbitraria la concentración de amoniaco en el medio de cultivo sin desperdiciar el medio de cultivo.

30 Además, según la presente invención, se calcula la concentración de amoniaco no ionizado en el tanque de cultivo, se mide el valor de pH en el tanque de cultivo con un sensor de pH, se calcula la concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada y el valor de pH medido basándose en una curva de disociación de amoniaco almacenada en una parte de almacenamiento, y, cuando la concentración de amoniaco total calculada es inferior a una concentración predeterminada, se instruye al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo. Por tanto, la presente invención tiene efectos de que la concentración de amoniaco total (concentración total de NH_3 y NH_4^+) del medio de cultivo puede medirse directamente a partir del valor de pH y la concentración de amoniaco no ionizado (NH_3) basándose en la curva de disociación de amoniaco, y de ese modo puede realizarse el cultivo controlando adicionalmente de manera correcta la concentración de amoniaco.

40 Además, según la presente invención, investigando la concentración de amoniaco total de un medio de cultivo, que se ha recogido a partir del tanque de cultivo y suspendido en un líquido de reacción fuertemente alcalino de modo que se convierte ion amonio en amoniaco no ionizado, usando un aparato de medición de amoniaco común externo; y calculando la concentración de amoniaco no ionizado en el medio de cultivo sustituyendo el valor de concentración de amoniaco total anterior en la ecuación de disociación de amoniaco y usando un valor de pH del medio de cultivo almacenado en la etapa de medición de valor de pH anteriormente mencionada, puede verificarse con el mismo la curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado y la salida del sensor (tensión eléctrica). Por tanto, pueden corregirse errores generados durante el cultivo. La invención se define, en su sentido más amplio, mediante las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1A es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procedimiento del control de la concentración de amoniaco.

La figura 1B es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procedimiento del control de la concentración de amoniaco según la presente invención.

60 La figura 2 es un diagrama de configuración teórico que muestra la configuración básica de la presente invención.

La figura 3 es un gráfico que muestra un ejemplo de la curva de disociación de amoniaco usada para la presente invención.

65 La figura 4 es un diagrama de bloques lógico que muestra un ejemplo de la configuración del aparato 100 de control de amoniaco según la presente invención.

La figura 5 es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procesamiento operativo básico realizado con el aparato 100 de control de amoniaco según una realización de la presente invención.

5 La figura 6 es un diagrama de flujo que muestra detalles de un ejemplo del procedimiento realizado con el aparato 100 de control de amoniaco según una realización de la presente invención.

La figura 7 muestra resultados de control de concentración de amoniaco obtenidos en la producción de arginina (Arg) realizada usando el aparato del ejemplo.

10 La figura 8 muestra la acumulación de Arg en la producción de Arg realizada usando el aparato del ejemplo.

La figura 9 es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procedimiento de control de la concentración de amoniaco convencional.

15 **Modos para llevar a cabo la invención**

A continuación en el presente documento, se explicarán en detalle realizaciones del aparato de control de amoniaco y método de control de amoniaco de la presente invención con referencia a los dibujos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estas realizaciones.

20 [Descripción general de la invención]

25 A continuación en el presente documento, se explicará una descripción general de la presente invención con referencia a las figuras 1A, 1B, 2 y 3, y después se explicará en detalle la configuración, el procedimiento, etc., de la presente invención. La figura 1A es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procedimiento del control de la concentración de amoniaco, la figura 1B es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procedimiento del control de la concentración de amoniaco según la presente invención, la figura 2 es un diagrama de configuración teórico que muestra la configuración básica del aparato de la presente invención, y la figura 3 es un gráfico que muestra un ejemplo de la curva de disociación de amoniaco usada para la presente invención.

30 El método de la presente invención es un método de control de amoniaco para controlar la concentración de amoniaco en un tanque de cultivo usando un aparato de control de amoniaco que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco al tanque de cultivo, un sensor de amoniaco que responde a amoniaco no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y una parte de control conectada al dispositivo de alimentación de amoniaco y al sensor de amoniaco. Tal como se muestra en la figura 1A, el método comprende realizar un procedimiento con el aparato de control de amoniaco basándose en la entrada de una señal a partir del sensor de amoniaco que responde a amoniaco no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y emitir una instrucción para el dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco al tanque de cultivo. El término "conectado" es suficiente para estar funcionalmente conectado, y puede estar conectado mediante un sistema cableado o inalámbrico.

El método de la presente invención comprende las siguientes etapas realizadas por la parte de control:

45 una etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado de calcular la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo sustituyendo la señal del sensor de amoniaco en una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y una señal a partir del sensor de amoniaco, y

50 una etapa de instrucción de suministro de amoniaco de instruir al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada.

55 El método puede comprender además una etapa de creación de curva de calibración de crear una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y una señal a partir del sensor de amoniaco. En cuanto a la curva de calibración, puede crearse proporcionando disoluciones de amoniaco a concentraciones conocidas y sumergiendo un electrodo en las disoluciones para trazar gráficamente tensiones mostradas por el electrodo.

60 En la etapa de creación de curva de calibración, se crea una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y la señal del sensor de amoniaco. Esta creación puede comprender leer una curva de calibración a partir de una parte de almacenamiento proporcionada en el aparato de control de amoniaco, o introducir una curva de calibración desde el exterior.

65 El sensor de amoniaco responde a amoniaco no disociado y es habitualmente un sensor que comprende una membrana de selección de amoniaco y un electrodo interno. La señal del sensor de amoniaco no está particularmente limitada siempre que sea una señal generada en respuesta a amoniaco no ionizado, y habitualmente

se usa una tensión de un electrodo interno. Sin embargo, puede convertirse en otra característica eléctrica usando un circuito eléctrico. Además, una característica eléctrica tal como la tensión puede usarse como señal analógica original o como señal numérica obtenida mediante conversión de analógico a digital.

5 Puede crearse una curva de calibración investigando previamente la relación entre una señal de este tipo y la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo. Una curva de calibración creada tal como se describió anteriormente puede almacenarse en una parte de almacenamiento. La forma del almacenamiento no está particularmente limitada, y la curva de calibración puede almacenarse en forma de una tabla, o puede almacenarse una ecuación aritmética que representa una curva de calibración.

10 En la etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado, la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo se calcula sustituyendo la señal del sensor de amoniaco en la curva de calibración. Cuando la curva de calibración se almacena en forma de una tabla, el cálculo mediante sustitución en la curva de calibración puede realizarse leyendo un valor registrado en la posición correspondiente al valor sustituido de la señal. Cuando la curva de calibración se almacena como una ecuación aritmética, puede realizarse mediante cálculo sustituyendo el valor introducido de la señal en la ecuación.

15 En la etapa de instrucción de suministro de amoniaco, cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada, se instruye al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo.

20 El dispositivo de alimentación de amoniaco no está particularmente limitado, siempre que pueda controlar el suministro de amoniaco al tanque de cultivo basándose en una instrucción generada en la etapa de instrucción de suministro de amoniaco. Por ejemplo, el dispositivo de alimentación de amoniaco está constituido de modo que, en respuesta a la instrucción generada en la etapa de instrucción de suministro de amoniaco, se abre una válvula electromagnética de línea de gas de amoniaco para suministrar amoniaco.

25 El amoniaco puede ser amoniaco gaseoso o amoniaco acuoso. También puede suministrarse amoniaco en forma de una disolución acuosa de un compuesto que genera ion amonio cuando se disuelve, tal como sulfato de amonio. La tasa de suministro de amoniaco suministrado por el dispositivo de alimentación de amoniaco se selecciona de modo que la concentración de amoniaco no debe cambiar rápidamente, teniendo en cuenta el tamaño del tanque de cultivo, la frecuencia de instrucciones generadas en la etapa de instrucción de suministro de amoniaco, y así sucesivamente. La concentración de amoniaco total se controla habitualmente para que sea de 1 a 350 mM, de manera más deseable de 2,5 a 300 mM, de manera todavía más deseable de 2,5 a 200 mM, de manera todavía más deseable de 3 a 100 mM, de manera todavía más deseable de 3 a 50 mM en cuanto al amoniaco.

30 Una realización de la instrucción puede ser una salida de una señal eléctrica que hace funcionar directamente unos medios tales como una válvula del dispositivo de alimentación de amoniaco implicado en el control del suministro de amoniaco, o cuando el dispositivo de alimentación de amoniaco tiene una función de comunicación, puede ser una salida de una señal de comunicación para controlar una válvula o similar mediante la función de comunicación.

35 El aparato de control de amoniaco de la presente invención está conectado además a un sensor de pH para medir un valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo. El método de la presente invención comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control:

40 una etapa de cálculo de concentración de amoniaco total de calcular la concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado y el valor de pH a partir del sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniaco que representa razones existentes de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo a cada valor de pH, y

45 en la etapa de instrucción de suministro de amoniaco, se usa la concentración de amoniaco total en lugar de la concentración de amoniaco no ionizado.

50 La relación de las razones existentes de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo a cada valor de pH puede calcularse de manera teórica o medirse realmente. Basándose en esta relación, puede crearse la curva de disociación.

55 La curva de disociación creada tal como se describió anteriormente se almacena en la parte de almacenamiento. Una realización del almacenamiento no está particularmente limitada, y la curva de disociación puede almacenarse en forma de una tabla bidimensional, o puede almacenarse una ecuación aritmética que representa la curva de disociación. Además, puede almacenarse junto con la curva de calibración que va a almacenarse en la etapa de almacenamiento de curva de calibración en forma de una tabla, o puede crearse y almacenarse una ecuación aritmética que representa la curva de disociación en combinación con la curva de calibración.

60 La curva de disociación de amoniaco se explicará con referencia a la figura 3. En la figura 3, el eje vertical indica la

razón existente (%) de amoníaco no ionizado (NH_3) e ion amonio (NH_4^+) en el tanque de cultivo, y el eje horizontal indica el valor de pH en el tanque de cultivo. Las curvas mostradas en el gráfico de la figura 3 son las curvas de disociación de amoníaco no ionizado (NH_3) e ion amonio (NH_4^+) a diversos valores de pH. Tal como se muestra en la figura 3, existen amoníaco no ionizado (NH_3) e ion amonio (NH_4^+) en cantidades sustancialmente equivalentes a aproximadamente pH 9, y cuando el valor de pH se vuelve superior, el amoníaco no ionizado (NH_3) aumenta mientras que el ion amonio (NH_4^+) disminuye. El amoníaco no ionizado y el ion amonio son lo mismo que el amoníaco no disociado (NH_3) y el amoníaco disociado (NH_4^+), respectivamente.

Tal como se describió anteriormente, en la fermentación habitual, el valor de pH del medio de cultivo está dentro de un intervalo de levemente ácido a levemente alcalino (aproximadamente de pH 5 a 9), por tanto la mayor parte del amoníaco que existe en el medio de cultivo existe como ion amonio (NH_4^+), y por tanto convencionalmente ha sido imposible obtener la concentración de amoníaco total (concentración total de NH_3 y NH_4^+) en el medio de cultivo midiendo únicamente la concentración de amoníaco no ionizado (NH_3). Sin embargo, según la presente invención, se crea previamente la curva de disociación de amoníaco para el medio de cultivo que va a usarse como procesamiento previo, y por tanto la concentración de amoníaco total (concentración total de NH_3 y NH_4^+) puede calcularse a partir de la concentración de amoníaco no ionizado (NH_3) basándose en la curva de disociación de amoníaco.

En la etapa de cálculo de concentración de amoníaco total, se calcula la concentración de amoníaco total a partir de la concentración de amoníaco no ionizado calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado y un valor de pH medido con el sensor de pH basándose en la curva de disociación de amoníaco. Cuando la curva de disociación de amoníaco se almacena en forma de una tabla, el cálculo a partir de la concentración de amoníaco no ionizado y el valor de pH basándose en la curva de disociación de amoníaco puede realizarse leyendo un valor registrado en una dirección correspondiente a la concentración de amoníaco no ionizado y el valor de pH introducidos. Cuando se almacena una ecuación aritmética, el cálculo puede realizarse mediante cálculo sustituyendo los valores introducidos en la ecuación.

En los siguientes puntos (1) a (3) se muestra un ejemplo del cálculo de la concentración de amoníaco total.

(1) En primer lugar, sustituyendo la tensión del sensor de amoníaco en el tanque de cultivo (por ejemplo, 0,5 V) en la ecuación aritmética que representa la curva de calibración, se calcula la concentración de amoníaco no ionizado (por ejemplo, 30 mM).

(2) Después, sustituyendo el valor de pH en el tanque de cultivo medido con el sensor de pH (por ejemplo, pH 6) en la ecuación aritmética que representa la curva de disociación, se estima la razón existente de amoníaco no ionizado (por ejemplo, el 40%).

(3) Usando la razón existente estimada de amoníaco no ionizado (por ejemplo, el 40%) y la concentración de amoníaco no ionizado calculada en (1) (por ejemplo, 30 mM), se realiza el cálculo, por ejemplo, de la siguiente manera: "30 mM x (100/40) = 75 mM", para calcular la concentración de amoníaco total (75 mM en este caso).

En la etapa de instrucción de suministro de amoníaco, cuando la concentración de amoníaco no ionizado es inferior a una concentración predeterminada, se instruye al dispositivo de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque de cultivo. Alternativamente, cuando la concentración de amoníaco total es inferior a una concentración predeterminada, puede instruirse al dispositivo de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque de cultivo.

El aparato de control de amoníaco puede estar conectado además a un sensor de amoníaco externo proporcionado fuera del tanque de cultivo. Midiendo una tensión del sensor de amoníaco externo para un medio de cultivo que se ha recogido a partir del tanque de cultivo y suspendido en un líquido de reacción fuertemente alcalino de modo que se convierte el ion amonio en el amoníaco no ionizado, puede verificarse la curva de calibración de modo que la concentración de amoníaco no ionizado calculada sustituyendo la tensión medida en la curva de calibración representa la concentración de amoníaco total calculada.

La función de calcular automáticamente la concentración de amoníaco total basándose en la curva de disociación de amoníaco usando un valor de pH realmente medido del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo puede usarse únicamente para la verificación, y la concentración de amoníaco real en el tanque de cultivo puede controlarse basándose en la concentración de amoníaco no ionizado (NH_3).

Además, según la presente invención, cuando se realiza la verificación, la curva de calibración puede verificarse de modo que la concentración de amoníaco no ionizado calculada sustituyendo la tensión medida mediante el sensor de amoníaco externo para un medio de cultivo muestreado que se ha suspendido en un líquido de reacción fuertemente alcalino (por ejemplo, NaOH) de modo que el amoníaco en el medio de cultivo se convierte en amoníaco no ionizado en la curva de calibración, representa la concentración de amoníaco total calculada mediante el cálculo de concentración de amoníaco total.

En términos generales, el aparato de la presente invención tiene la siguiente configuración básica. Es decir, el aparato de control de amoniaco que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco a un tanque de cultivo, un sensor de amoniaco que responde a amoniaco no disociado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y una parte de control conectada al dispositivo de alimentación de amoniaco y al sensor de amoniaco. El dispositivo de alimentación de amoniaco puede estar adaptado para suministrar amoniaco a un tanque de cultivo. El sensor de amoniaco adaptado para responder a amoniaco no disociado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo. Tal como se muestra en la figura 2, el aparato de control de amoniaco de la presente invención puede estar configurado para conectarse a un dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco a un tanque de cultivo, y un sensor de amoniaco que responde a amoniaco no ionizado en medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y comprender una parte de almacenamiento y una parte de control. El término "conectado" es suficiente para estar funcionalmente conectado, y puede estar conectado mediante un sistema cableado o inalámbrico.

La parte de control comprende:

unos medios de creación de curva de calibración para crear una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y una señal a partir del sensor de amoniaco,

unos medios de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado para calcular la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo a partir de la señal del sensor de amoniaco basándose en la curva de calibración, y

unos medios de instrucción de suministro de amoniaco para instruir al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado es inferior a una concentración predeterminada.

La parte de control puede comprender:

una parte de almacenamiento configurada para almacenar una curva de calibración predeterminada. La parte de control comprende:

unos medios de creación de curva de calibración configurados para crear una curva de calibración que representa la relación entre concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y una señal a partir del sensor de amoniaco,

unos medios de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado configurados para calcular concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo a partir de la señal del sensor de amoniaco basándose en la curva de calibración, y

unos medios de instrucción de suministro de amoniaco configurados para instruir al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada.

El aparato de la presente invención comprende además unos medios de cálculo de concentración de amoniaco total para calcular la concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada con los medios de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado y el valor de pH a partir del sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniaco que representa razones existentes de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo a cada valor de pH.

Los medios de cálculo de concentración de amoniaco total están configurados para calcular concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada mediante los medios de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado y el valor de pH a partir del sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniaco que representa una razón existente de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo a cada valor de pH.

Los componentes de estos medios son los mismos que los explicados para las etapas del método de la presente invención.

La parte de control puede comprender además:

unos medios de verificación configurados para verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoniaco no ionizado calculada a partir de una señal para verificación basándose en la curva de calibración representa la concentración de amoniaco total calculada mediante los medios de cálculo de concentración de amoniaco total, y

en la que los medios de verificación están configurados para usar una señal para verificación que puede ser:

una señal obtenida con un sensor de amoniaco externo proporcionado fuera del tanque de cultivo para medir la concentración de amoniaco no ionizado, y

5 obtenerse midiendo la concentración de amoniaco no ionizado de un medio de cultivo, que, tras recogerse a partir del tanque de cultivo, se vuelve lo suficientemente alcalino como para convertir ion amonio en amoniaco no ionizado con el sensor de amoniaco externo.

10 La parte de control puede estar adaptada además para introducir la señal a partir del sensor de amoniaco externo, como señal para verificación.

El aparato de control de amoniaco puede estar configurado para mantener la concentración de amoniaco total de un medio de cultivo dentro de un intervalo predeterminado.

15 El aparato de control de amoniaco puede comprender además una interfaz de usuario.

El aparato de control de amoniaco puede estar configurado para el control en tiempo real de amoniaco en un medio de cultivo, preferiblemente para el control *in situ* en tiempo real de amoniaco en un medio de cultivo.

20 El aparato de control de amoniaco puede estar adaptado para controlar amoniaco en un medio de cultivo de uno o más tanques de cultivo, opcionalmente de 1 a 10 tanques de cultivo.

El aparato de control de amoniaco puede estar adaptado para controlar amoniaco en el medio de cultivo a intervalos de 5 minutos o menos, preferiblemente 1 segundo o menos.

25 El aparato de control de amoniaco puede estar adaptado para verificar la curva de calibración a intervalos de 12 horas o menos, preferiblemente 8 horas o menos.

30 El aparato de control de amoniaco puede estar adaptado para controlar amoniaco durante al menos una parte del periodo de cultivo o la totalidad del periodo de cultivo.

35 El tiempo real o tiempo real *in situ* usados en el presente documento significan controlar la concentración de amoniaco en un tiempo predeterminado, es decir, medir la concentración de amoniaco en el tanque de cultivo y suministrar amoniaco al medio dentro de un tiempo predeterminado. Por ejemplo, en cuanto al tiempo para medir amoniaco, puede adaptarse para medir a intervalos de 5 minutos o menos, 3 minutos o menos, 1 minuto o menos o 30 segundos o menos. En cuanto al tiempo para suministrar amoniaco, puede adaptarse para suministrar en 1 minuto o menos, 30 segundos o menos, 10 segundos o menos, 5 segundos o menos o 1 segundo o menos.

40 En cuanto al tiempo del control entero, puede adaptarse para controlar a intervalos de 5 minutos o menos, 3 minutos o menos, 1 minuto o menos, 30 segundos o menos o 1 segundo o menos.

45 El tiempo e intervalo pueden seleccionarse dependiendo de una tasa de cambio de la concentración de amoniaco no ionizado o la concentración de amoniaco total que puede producirse en el medio de cultivo en el tanque de cultivo durante el cultivo. Por ejemplo, puede adaptarse para permitir que el cambio en la concentración de amoniaco no ionizado en el medio de cultivo durante el cultivo sea de 0,5 mM o menos, 0,2 mM o menos, 0,1 mM o menos en el intervalo de medición, o adaptarse para permitir que el cambio en la concentración de amoniaco total en el medio de cultivo durante el cultivo sea de 80 mM o menos, 20 mM o menos, 10 mM o menos en el intervalo de medición.

50 A continuación en el presente documento, se explicará un ejemplo de la configuración del aparato de control de amoniaco.

[Configuración del aparato 100 de control de amoniaco]

55 La figura 4 es un diagrama de bloques lógico que muestra un ejemplo de la configuración del aparato 100 de control de amoniaco al que se aplica la presente invención, y sólo muestra conceptualmente una parte de la configuración relacionada con la presente invención.

60 Tal como se muestra en la figura 4, el aparato 100 de control de amoniaco de la presente invención está conectado al tanque 200 de cultivo, al dispositivo 300 de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco al tanque 200 de cultivo, al sensor 10 de amoniaco que se inserta en el tanque 200 de cultivo y mide una tensión de salida, y al sensor 20 de pH que se inserta en el tanque 200 de cultivo y mide el valor de pH. Además, el aparato 100 de control de amoniaco comprende una parte 102 de control, tal como CPU, que controla de manera integral todo el aparato 100 de control de amoniaco, una parte 104 de salida de control que está conectada al dispositivo 300 de alimentación de amoniaco, etc., una parte 108 de entrada de señal que está conectada al sensor 10 de amoniaco, un sensor 12 de amoniaco externo, el sensor 20 de pH, etc., y una parte 106 de almacenamiento que almacena diversas clases de bases de datos, tablas, y así sucesivamente, y estas partes están conectadas en comunicación

mediante canales de comunicación arbitrarios.

En la figura 4, el dispositivo 300 de alimentación de amoniaco comprende al menos un tanque 30 de amoniaco que contiene amoniaco en su interior, una válvula 32 que ajusta la cantidad de amoniaco suministrada a partir del tanque 30 de amoniaco, y un conmutador 31 que controla la apertura y el cierre de la válvula 32. Este dispositivo 300 de alimentación de amoniaco tiene una función de suministrar amoniaco al tanque 200 de cultivo según instrucciones enviadas a partir del aparato 100 de control de amoniaco.

En la figura 4, el tanque 200 de cultivo contiene el medio de cultivo en su interior y está conectado al aparato 100 de control de amoniaco mediante el sensor 10 de amoniaco y el sensor 20 de pH, que están insertados en el tanque 200 de cultivo. Además, el tanque 200 de cultivo está conectado al dispositivo 300 de alimentación de amoniaco mediante un tubo para suministrar amoniaco a partir del tanque 30 de amoniaco o similar. La figura 4 muestra el tanque 200 de cultivo conectado a un vaso de precipitados para tomar muestras o similares dentro del cual está insertado el sensor 12 de amoniaco externo mediante un tubo para recoger una muestra del medio de cultivo como ejemplo. Sin embargo, el tanque 200 de cultivo puede no estar conectado necesariamente a un vaso de precipitados de este tipo, y un usuario puede recoger una muestra a partir del tanque 200 de cultivo, y el sensor 12 de amoniaco externo puede usarse para un vaso de precipitados o similar al que se mueve la muestra.

En la figura 4, la parte 106 de almacenamiento del aparato 100 de control de amoniaco que almacena diversas clases de bases de datos, tablas, archivos (archivo 106a de curva de disociación de amoniaco a archivo 106e de concentración de amoniaco total) comprende unos medios de almacenamiento tales como unidad de disco fija, y almacena diversas clases de programas, tablas, archivos, bases de datos y así sucesivamente usados para diversos procesamientos.

Entre estos componentes de la parte 106 de almacenamiento, el archivo 106a de curva de disociación de amoniaco son unos medios de almacenamiento de curva de disociación de amoniaco que almacenan la curva de disociación de amoniaco que muestra razones existentes de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el tanque 200 de cultivo a cada valor de pH, que se crea mediante procesamiento realizado por la parte 102 de control.

Además, el archivo 106b de curva de calibración son unos medios de almacenamiento de curva de calibración que crean y almacenan una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo y la tensión del sensor 10 de amoniaco.

Además, el archivo 106c de concentración de amoniaco no ionizado son unos medios de almacenamiento de concentración de amoniaco no ionizado que almacenan la concentración de amoniaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo medida con el sensor 10 de amoniaco, la parte 102b de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado midiendo la tensión del sensor 10 de amoniaco y sustituyendo la tensión en la curva de calibración.

Además, el archivo 106d de valor de pH son unos medios de almacenamiento de valor de pH que almacenan el valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque 200 de cultivo medido por la parte 102c de medición de valor de pH con el sensor 20 de pH.

Además, el archivo 106e de concentración de amoniaco total son unos medios de almacenamiento de concentración de amoniaco total que almacenan la concentración de amoniaco total en el tanque 200 de cultivo calculada por la parte 102d de cálculo de concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado almacenada en el archivo 106c de concentración de amoniaco no ionizado y el valor de pH almacenado en el archivo 106d de valor de pH basándose en la curva de disociación de amoniaco almacenada en el archivo 106a de curva de disociación de amoniaco.

Además, en la figura 4, la parte 104 de salida de control controla comunicaciones entre el aparato 100 de control de amoniaco y el dispositivo 300 de alimentación de amoniaco. Es decir, la parte 104 de salida de control tiene una función de comunicación de transmitir una señal para abrir y cerrar la válvula 32 controlando el conmutador 31 del dispositivo 200 de alimentación de amoniaco de modo que el dispositivo 300 de alimentación de amoniaco suministra amoniaco al tanque 200 de cultivo en una cantidad instruida por el aparato 100 de control de amoniaco.

Además, en la figura 4, la parte 108 de entrada de señal controla el sensor 10 de amoniaco, el sensor 12 de amoniaco externo y el sensor 20 de pH. El sensor 10 de amoniaco es un sensor para medir la concentración de amoniaco no ionizado (NH_3) entre el amoniaco contenido en el medio de cultivo contenido en el tanque 200 de cultivo, y comprende, por ejemplo, un electrodo de iones o similar. Además, este sensor 10 de amoniaco puede estar conectado a un amplificador 11 de NH_3 que amplifica una señal que representa la concentración de amoniaco no ionizado (NH_3) medida en el tanque 200 de cultivo, y la transmite a la parte 108 de entrada de señal. Dado que el sensor 12 de amoniaco externo y el amplificador 13 de NH_3 son similares, se omiten explicaciones de los mismos. Además, el sensor 20 de pH es un sensor para medir el valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque 200 de cultivo, y comprende, por ejemplo, un electrodo de pH o similar. Además, este sensor 20 de pH puede estar constituido para conectarse a un amplificador 21 de pH que amplifica la señal que representa el valor de pH medido

en el tanque 200 de cultivo, y la transmite a la parte 108 de entrada de señal.

Además, en la figura 4, la parte 102 de control tiene una memoria interna para almacenar programas de control, tales como OS (sistema operativo), programas que definen diversas clases de procedimientos de procesamiento, y datos necesarios, y realiza procesamientos de información para realizar diversos procedimientos con estos programas, y así sucesivamente. La parte 102 de control está constituida, en el sentido funcional y conceptual, para comprender la parte 102a de creación de curva de calibración, la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado, la parte 102c de medición de valor de pH, la parte 102d de cálculo de concentración de amoníaco total, la parte 102e de instrucción de suministro de amoníaco, la parte 102f de medición de tensión para verificación y la parte 102g de verificación.

Entre estas, la parte 102a de creación de curva de calibración son unos medios de creación de curva de calibración que crean una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoníaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo y la tensión del sensor 10 de amoníaco.

Además, la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado son unos medios de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado que calculan la concentración de amoníaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo sustituyendo la tensión del sensor 10 de amoníaco en la curva de calibración.

Además, la parte 102c de medición de valor de pH son unos medios de medición de valor de pH para medir el valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque 200 de cultivo con el sensor 20 de pH.

Además, la parte 102d de cálculo de concentración de amoníaco total son unos medios de cálculo de concentración de amoníaco total para calcular la concentración de amoníaco total en el tanque 200 de cultivo a partir de la concentración de amoníaco no ionizado almacenada en el archivo 106c de concentración de amoníaco no ionizado y el valor de pH almacenado en el archivo 106d de valor de pH basándose en la curva de disociación de amoníaco almacenada en el archivo 106a de curva de disociación de amoníaco.

Además, la parte 102e de instrucción de suministro de amoníaco son unos medios de instrucción de suministro de amoníaco que instruyen al dispositivo 300 de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque 200 de cultivo, cuando la concentración de amoníaco no ionizado calculada por la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado es inferior a una concentración predeterminada. Además, la parte 102e de instrucción de suministro de amoníaco puede instruir al dispositivo 300 de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque 200 de cultivo, cuando la concentración de amoníaco total calculada mediante la parte 102d de cálculo de concentración de amoníaco total es inferior a una concentración predeterminada.

Además, la parte 102f de medición de tensión para verificación son unos medios de medición de tensión para verificación para medir la tensión para un medio de cultivo que se ha recogido a partir del tanque 200 de cultivo, y suspendido en un líquido de reacción fuertemente alcalino (por ejemplo, NaOH) de modo que se convierte ion amonio en amoníaco no ionizado con el sensor 12 de amoníaco externo.

Además, la parte 102g de verificación son unos medios de verificación para verificar una curva de calibración almacenada en el archivo 106b de curva de calibración de modo que la concentración de amoníaco no ionizado calculada sustituyendo la tensión medida con la parte 102f de medición de tensión para verificación en la curva de calibración, representa la concentración de amoníaco total calculada mediante el cálculo de concentración de amoníaco total.

[Procesamiento realizado por el aparato 100 de control de amoníaco]

A continuación en el presente documento, se explicará en detalle con referencia a las figuras 5 y 6 un ejemplo de procesamiento realizado por el aparato 100 de control de amoníaco constituido tal como se describió anteriormente. La figura 5 es un diagrama de flujo que muestra un ejemplo del procesamiento operativo básico realizado por el aparato 100 de control de amoníaco, y la figura 6 es un diagrama de flujo que muestra detalles de un ejemplo del procesamiento realizado por el aparato 100 de control de amoníaco.

[Procesamiento operativo básico]

En primer lugar, se explicará con referencia a la figura 5 un ejemplo del procesamiento operativo básico realizado por el aparato 100 de control de amoníaco.

(Procesamiento previo)

Tal como se muestra en la figura 5, como procesamiento previo, la parte 102 de control puede crear una curva de disociación de amoníaco (véase la figura 3) que muestra la razón existente de concentración de amoníaco no ionizado y concentración de ion amonio en el tanque 200 de cultivo a cada valor de pH, y almacenarla en el archivo 106a de curva de disociación de amoníaco (etapa SB-1). Es decir, la parte 102 de control puede crear una curva de

disociación de amoníaco calculando las razones existentes de amoníaco no ionizado e ion amonio a diversos valores de pH basándose en la constante de disociación de amoníaco, y trazando gráficamente los valores calculados como un gráfico.

5 (Procesamiento principal)

Después, la parte 102a de creación de curva de calibración crea una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoníaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo y la tensión del sensor 10 de amoníaco (etapa SB-2).

10 Después, la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado calcula la concentración de amoníaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo sustituyendo la tensión del sensor 10 de amoníaco en la curva de calibración (etapa SB-3). Después, el procedimiento avanza al procesamiento de la etapa SB-6.

15 En la etapa SB-3 mencionada anteriormente, tras calcularse la concentración de amoníaco no ionizado mediante el procesamiento en la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado, pueden realizarse los procesamientos de la etapa SB-4 y la etapa SB-5.

20 La parte 102c de medición de valor de pH mencionada anteriormente puede medir el valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque 200 de cultivo con el sensor 20 de pH (etapa SB-4). Además, la parte 102d de cálculo de concentración de amoníaco total puede calcular la concentración de amoníaco total a partir de la concentración de amoníaco no ionizado calculada por la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado y el valor de pH medido con la parte 102c de medición de valor de pH basándose en la curva de disociación de amoníaco almacenada en el archivo 106a de curva de disociación de amoníaco (etapa SB-5).

25 Después, la parte 102 de control determina si la concentración de amoníaco no ionizado medida por la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado es inferior a una concentración predeterminada o no (etapa SB-6). La parte 102 de control puede determinar si la concentración de amoníaco total medida por la parte 102d de medición de amoníaco total es inferior a una concentración predeterminada o no (etapa SB-6).

30 Después, cuando la parte 102 de control determina que la concentración de amoníaco no ionizado medida por la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado en la etapa SB-3 es inferior a la concentración predeterminada (etapa SB-6, sí), la parte 102e de instrucción de suministro de amoníaco instruye al dispositivo 300 de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque 200 de cultivo (etapa SB-7). La parte 102e de instrucción de suministro de amoníaco puede instruir al dispositivo 300 de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque 200 de cultivo, cuando la parte 102 de control determina que la concentración de amoníaco total medida por la parte 102d de medición de amoníaco total es inferior a la concentración predeterminada (etapa SB-6, sí) (etapa SB-7).

40 Por otro lado, cuando la parte 102 de control determina que la concentración de amoníaco no ionizado medida por la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado no es inferior a la concentración predeterminada (etapa SB-6, no), el procedimiento vuelve al procesamiento de la etapa SB-3.

45 Además, cuando la parte 102 de control determina que la concentración de amoníaco total medida por la parte 102d de medición de amoníaco total no es inferior a la concentración predeterminada (etapa SB-6, no), pueden realizarse los procesamientos de la etapa SB-8 a la etapa SB-10.

50 La parte 102 de control puede determinar si la curva de calibración creada en la etapa SB-2 debe verificarse o no (etapa SB-8). Aunque la figura 5 muestra un ejemplo en el que se determina si se inicia el procesamiento de verificación tras instruirse el suministro de amoníaco (etapa SB-6), la determinación puede realizarse en cualquier momento según la entrada del usuario, o puede realizarse automáticamente para cada periodo establecido previamente.

55 Además, cuando la parte 102 de control ha determinado que debe realizarse la verificación (etapa SB-8, sí), la parte 102f de medición de tensión para verificación puede medir una tensión del sensor 12 de amoníaco externo para un medio de cultivo que se ha recogido a partir del tanque 200 de cultivo, y suspendido en un líquido de reacción fuertemente alcalino (por ejemplo, NaOH) de modo que se convierte ion amonio en amoníaco no ionizado (etapa SB-9).

60 Además, la parte 102g de verificación puede verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoníaco no ionizado calculada sustituyendo la tensión medida por la parte 102f de medición de tensión para verificación en la curva de calibración almacenada en el archivo 106b de curva de calibración, representa la concentración de amoníaco total calculada mediante el cálculo de concentración de amoníaco total (etapa SB-10).

65 Por otro lado, cuando la parte 102 de control ha determinado que no debe realizarse la verificación (etapa SB-8, no), el procedimiento vuelve al procesamiento de la etapa SB-3.

Estos procesamientos operativos básicos (etapa SB-2 a etapa SB-10) se realizan de manera repetida durante el cultivo. De ese modo, puede controlarse la concentración de amoníaco en el tanque 200 de cultivo, y puede realizarse el cultivo con control continuo y arbitrario de la concentración de amoníaco en el medio de cultivo.

[Detalles del procesamiento de control de amoníaco]

A continuación en el presente documento, se explicarán con referencia a la figura 6 detalles de un ejemplo del procesamiento realizado por el aparato 100 de control de amoníaco según la presente invención.

Tal como se muestra en la figura 6, la parte 102 de control determina si la curva de disociación de amoníaco creada y/o la concentración de amoníaco total calculada deben verificarse o no (etapa SC-1). El contenido del procesamiento de esta etapa SC-1 es el mismo que el del procesamiento de la etapa SB-7 mostrada en la figura 5. Además, tal como se describió anteriormente, si se inicia este procesamiento de verificación puede determinarse en cualquier momento según la entrada del usuario, o determinarse automáticamente para cada periodo establecido previamente.

Después, cuando la parte 102 de control ha determinado que debe realizarse la verificación (etapa SC-1, sí), se crea una curva de calibración para el medio de cultivo contenido en el tanque 200 de cultivo (etapa SC-2).

La "curva de calibración" mencionada anteriormente es una ecuación de relación que representa la relación entre la concentración de amoníaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo y la tensión medida con el sensor 10 de amoníaco, y se usa para medir la concentración de amoníaco no ionizado (C) sustituyendo la tensión medida con el sensor 10 de amoníaco en las etapas SC-7 y SC-10 descritas a continuación en la curva de calibración.

Por otro lado, cuando la parte 102 de control ha determinado que no debe realizarse la verificación (etapa SC-1, no), el procedimiento avanza al procesamiento de la etapa SC-3.

Después, la parte 102 de control determina si debe cambiarse un parámetro de control para el tanque 200 de cultivo o no (etapa SC-3).

El parámetro de control mencionado anteriormente es, por ejemplo, valor SV (valor establecido), valor TC (ciclo de tiempo), valor ON (a tiempo) o similares. El valor SV es un valor preestablecido de la concentración de amoníaco total o la concentración de amoníaco no ionizado (mM) que va a controlarse. Además, el valor TC representa el ciclo para determinar el suministro de amoníaco (segundo). Además, el valor ON representa el tiempo (segundo) para realizar el suministro de amoníaco dentro de un ciclo. Específicamente, cuando los parámetros de control se establecen, por ejemplo, de la siguiente manera: valor SV = 50 mM, valor TC = 10 segundos, y valor ON = 1 segundo, se determina si debe suministrarse amoníaco o no una vez cada 10 segundos, y si la concentración de amoníaco realmente medida es superior a 50 mM, no se suministra amoníaco. Es decir, la válvula electromagnética de la entrada para gas amoníaco se mantiene cerrada. Además, cuando la concentración de amoníaco realmente medida es inferior a 50 mM, se suministra amoníaco durante 1 segundo. Es decir, se abre la válvula electromagnética.

Cuando la parte 102 de control ha determinado que debe cambiarse el parámetro de control (etapa SC-3, sí), se introduce un valor de parámetro de control (etapa SC-4).

Por otro lado, cuando la parte 102 de control ha determinado que no debe cambiarse el parámetro de control (etapa SC-3, no), el procedimiento avanza al procesamiento de la etapa SC-5.

Después, la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado incorpora la tensión (A) del sensor 10 de amoníaco (por ejemplo, electrodo de iones) insertado en el tanque 200 de cultivo (etapa SC-5). Es decir, la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado mide la tensión del sensor 10 de amoníaco.

Después, la parte 102c de medición de valor de pH incorpora el valor de pH (B) a partir del electrodo de pH del sensor 20 de pH insertado en el tanque 200 de cultivo (etapa SC-6). Es decir, la parte 102c de medición de valor de pH mide el valor de pH (B) del medio de cultivo contenido en el tanque 200 de cultivo con el sensor 20 de pH.

Después, la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado calcula la concentración de amoníaco no ionizado (C) sustituyendo la tensión (A) incorporada en la etapa SC-5 en la curva de calibración creada en la etapa SC-2 (etapa SC-7). Es decir, la parte 102b de cálculo de concentración de amoníaco no ionizado calcula la concentración de amoníaco no ionizado (C) en el tanque 200 de cultivo sustituyendo la tensión del sensor 10 de amoníaco en la curva de calibración.

Después, la parte 102d de cálculo de concentración de amoníaco total calcula la concentración de amoníaco total (D) basándose en el valor de pH (B) incorporado en la etapa SC-6, la concentración de amoníaco (C) calculada en la etapa SC-7 y la curva de disociación de amoníaco (véase la figura 3) creada por la parte 102 de control como

procesamiento previo (etapa SC-8). Es decir, la parte 102d de cálculo de concentración de amoníaco total calcula la concentración de amoníaco total (D) en el tanque 200 de cultivo a partir de la concentración de amoníaco no ionizado (C) almacenada en el archivo 106c de amoníaco no ionizado y el valor de pH (B) almacenado en el archivo 106d de valor de pH basándose en la curva de disociación de amoníaco almacenada en el archivo 106a de curva de disociación de amoníaco.

Después, la parte 102 de control determina si debe realizarse corrección de un punto o no (etapa SC-9).

La “corrección de un punto” mencionada anteriormente es uno de los métodos para normalización, y normaliza un objeto usando una muestra de normalización de un punto. En esta realización, la muestra de normalización de un punto es el dato de medición obtenido con un aparato de medición externo (tensión (A')), y el término normalización se usa con el mismo significado que el de verificación.

Cuando la parte 102 de control ha determinado que debe realizarse la corrección de un punto (etapa SC-9, sí), la parte 102f de medición de concentración de amoníaco para verificación y la parte 102g de verificación incorporan el dato de medición (tensión (A')) obtenido con el aparato de medición externo (sensor 12 de amoníaco externo, etc.), y realizan la corrección de un punto para la curva de calibración de modo que la concentración de amoníaco no ionizado (C') obtenida sustituyendo el dato de medición (tensión (A')) en la curva de calibración representa la concentración de amoníaco total (D) calculada en la etapa SC-8 (etapa SC-10). Es decir, la parte 102f de medición de tensión para verificación mide la tensión (A') del sensor 12 de amoníaco externo para un medio de cultivo que se ha recogido a partir del tanque 200 de cultivo y suspendido en un líquido de reacción fuertemente alcalino (por ejemplo, NaOH) de modo que se convierte ion amonio en amoníaco no ionizado, y la parte 102g de verificación verifica la curva de calibración de modo que la concentración de amoníaco no ionizado (C') calculada sustituyendo la tensión (A') medida con la parte 102f de medición de tensión para verificación en la curva de calibración almacenada en el archivo 106b de curva de calibración, representa la concentración de amoníaco total (D) calculada mediante el cálculo de concentración de amoníaco total.

Por otro lado, cuando la parte 102 de control ha determinado que no debe realizarse la corrección de un punto (etapa SC-9, no), el procedimiento avanza al procesamiento de la etapa SC-11.

Después, la parte 102 de control determina qué modo de control de amoníaco se elige (etapa SC-11).

El modo de control de amoníaco mencionado anteriormente es, por ejemplo, un modo para realizar el control con la concentración de amoníaco total o tal como se describe en el presente documento, un modo para realizar el control con la concentración de amoníaco no ionizado, o similar, y en la etapa SC-11, la parte 102 de control puede elegir el modo de control de concentración de amoníaco total o el modo de control de concentración de amoníaco no ionizado como modo de control de amoníaco.

Después, cuando la parte 102 de control ha elegido el modo de control de concentración de amoníaco total como modo de control de amoníaco (etapa SC-11, modo de control de concentración de amoníaco total), establece el modo en el que se controla la concentración de amoníaco basándose en la concentración de amoníaco total en el tanque 200 de cultivo. Después, la parte 102 de control genera instrucciones para control que van a enviarse al aparato de cultivo que incluye el dispositivo 300 de alimentación de amoníaco conectado al tanque 200 de cultivo, etc., usando la concentración de amoníaco total (D) calculada en la etapa SC-8 o la concentración de amoníaco total (D') verificada en la etapa SC-10, y valores preestablecidos y parámetros de control (por ejemplo, valor SV que sirve como índice para el control de la concentración de amoníaco) establecidos en el aparato 100 de control de amoníaco (etapa SC-12).

Después, la parte 102 de control determina si el control calculado en la etapa SC-12 es necesario o no (etapa SC-13). Por ejemplo, la parte 102 de control determina si la concentración de amoníaco total es inferior a una concentración predeterminada o no.

Después, cuando la parte 102 de control ha determinado que la instrucción de control es necesaria (por ejemplo, la concentración de amoníaco total es inferior a una concentración predeterminada) (etapa SC-13, sí), la parte 102e de instrucción de suministro de amoníaco emite una instrucción de control, tal como una instrucción para añadir amoníaco al tanque 200 de cultivo a partir de un tanque 30 de amoníaco en una cantidad instruida, para el dispositivo 300 de alimentación de amoníaco. Es decir, la parte 102e de instrucción de suministro de amoníaco hace funcionar el conmutador 31 para cambiar la apertura y el cierre de la válvula 32 mediante la parte 104 de emisión de control para controlar la apertura y el cierre de la válvula 32 de modo que se suministra amoníaco al tanque 200 de cultivo a partir del tanque 30 de amoníaco en una cantidad según la instrucción de control.

Por otro lado, cuando la parte 102 de control ha determinado que la instrucción de control no es necesaria (por ejemplo, la concentración de amoníaco total no es inferior a la concentración predeterminada) (etapa SC-13, no), el procedimiento vuelve al procesamiento de la etapa SC-5.

Cuando el procedimiento vuelve a la etapa SC-11, y la parte 102 de control ha elegido, tal como se describe en el

presente documento, el modo de control de concentración de amoniaco no ionizado como modo de control de amoniaco, se establece un modo en el que el control se realiza basándose en la concentración de amoniaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo (etapa SC-11, modo de control de concentración de amoniaco no ionizado). Después, la parte 102 de control genera instrucciones de control para el aparato de cultivo que incluye el dispositivo 300 de alimentación de amoniaco conectado al tanque 200 de cultivo, etc., usando la concentración de amoniaco no ionizado (C) que se ha calculado en la etapa SC-7, valores preestablecidos y parámetros de control (por ejemplo, valor SV que sirve como índice de control de la concentración de amoniaco) establecidos en el aparato 100 de control de amoniaco (etapa SC-15).

Después, la parte 102 de control determina si el control calculado en la etapa SC-15 es necesario o no (etapa SC-16). Por ejemplo, la parte 102 de control determina si la concentración de amoniaco no ionizado es inferior a una concentración predeterminada.

Después, cuando la parte 102 de control ha determinado que la instrucción de control es necesaria (por ejemplo, la concentración de amoniaco no ionizado es inferior a una concentración predeterminada) (etapa SC-16, sí), la parte 102e de instrucción de suministro de amoniaco emite una instrucción de control, tal como una instrucción para añadir amoniaco al tanque 200 de cultivo a partir del tanque 30 de amoniaco en una cantidad instruida, para el dispositivo 300 de alimentación de amoniaco. Es decir, la parte 102e de instrucción de suministro de amoniaco hace funcionar el conmutador 31 para conmutar la apertura y el cierre de la válvula 32 mediante el parte 104 de emisión de control para controlar la apertura y el cierre de la válvula 32 de modo que se suministra amoniaco al tanque 200 de cultivo a partir del tanque 30 de amoniaco en una cantidad según la instrucción de control.

Por otro lado, cuando la parte 102 de control ha determinado que la instrucción de control no es necesaria (por ejemplo, la concentración de amoniaco no ionizado no es inferior a la concentración predeterminada) (etapa SC-16, no), el procedimiento vuelve al procesamiento de la etapa SC-5.

[Otras realizaciones]

Aunque anteriormente se ha explicado una realización de la invención, la presente invención puede implementarse como diversas realizaciones diferentes dentro del alcance técnico de la presente invención definido en las reivindicaciones adjuntas, además de la realización explicada anteriormente.

Por ejemplo, aunque anteriormente se ha explicado la presente invención para un caso en el que el aparato 100 de control de amoniaco realiza el control de amoniaco para una fermentación realizada en el tanque 200 de cultivo, puede usarse no sólo para fermentación, sino también para otro uso tal como el uso en un tanque de reacción para la industria química, etc. (no forma parte de la invención).

Además, tal como se describe en el presente documento, la totalidad o una parte de los procesamientos que se explica que se realizan automáticamente también pueden realizarse manualmente, y la totalidad o una parte de los procesamientos que se explica que se realizan manualmente también pueden realizarse automáticamente mediante métodos conocidos.

Además, los componentes mostrados en los dibujos para el aparato 100 de control de amoniaco se muestran esquemáticamente para indicar las funciones de los mismos, y pueden no estar necesariamente constituidos físicamente tal como se muestra en los dibujos.

Por ejemplo, la totalidad o una parte de las funciones de procesamiento de los componentes del aparato 100 de control de amoniaco, especialmente las funciones de procesamiento de la parte 102 de control, pueden realizarse con una CPU (unidad de procesamiento central) y programas que van a interpretarse y ejecutarse por la CPU, o con hardware basado en lógica cableada. Los programas se graban en un medio de grabación descrito a continuación, y se leen mecánicamente por el aparato 100 de control de amoniaco según se requiera. Es decir, programas informáticos para dar comandos a la CPU para realizar diversos procesamientos mediante actuación conjunta con el OS (sistema operativo) se almacenan en la parte 106 de almacenamiento, tal como ROM y HD. Estos programas informáticos se ejecutan cargándose en la RAM, y actúan conjuntamente con la CPU para constituir la parte 102 de control.

Además, los programas informáticos pueden almacenarse en un servidor de programa de aplicación conectado al aparato 100 de control de amoniaco a través de una red arbitraria, y la totalidad o una parte de los mismos pueden descargarse según se requiera.

Además, los programas también pueden almacenarse en un medio de grabación legible por ordenador. El "medio de grabación" mencionado anteriormente incluye "medios físicos portátiles" arbitrarios tales como disco flexible, disco magneto-óptico, ROM, EPROM, EEPROM, CD-ROM, MO y DVD, así como "medios de comunicación" para almacenar temporalmente programas tales como líneas de comunicación y ondas portadoras usadas para transmitir los programas a través de redes, de los que LAN, WAN e Internet son ejemplos típicos.

Además, el término “programa” significa un método de procesamiento de datos descrito en un lenguaje arbitrario o método de descripción, y el formato del mismo tal como código fuente y código binario no está limitado. Además, el “programa” no está necesariamente limitado a los constituidos como software independiente, sino que incluye los distribuidos como una pluralidad de módulos o bibliotecas, y los que realizan las funciones de los mismos mediante actuación conjunta con otros programas independientes, de los que un ejemplo típico es el OS (sistema operativo). Además, como configuraciones específicas para leer medios de grabación en el aparato mostrado, procedimientos para leer los programas, procedimientos para instalarlos después de leerlos, y así sucesivamente, pueden usarse configuraciones y procedimientos bien conocidos.

La parte 106 de almacenamiento que almacena diversas clases de las bases de datos (archivo 106a de curva de disociación de amoníaco a archivo 106e de concentración de amoníaco total) y así sucesivamente son unos medios de almacenamiento que comprenden un dispositivo de memoria tal como RAM y ROM, una unidad de disco fija tal como disco duro, un disco flexible, un disco óptico o similares, y almacenan diversas clases de programas, tablas, bases de datos, archivos para páginas web, etc., usados para diversos procesamientos o presentación en sitios web.

Además, el aparato 100 de control de amoníaco también puede realizarse conectando un procesador de información tal como ordenadores personales y estaciones de trabajo existentes a un objeto del control, e instalando software (incluyendo programas, datos, etc.) para realizar el método en el procesador de información.

Además, los modos específicos de distribución e integración del aparato no están limitados a los mostrados en los dibujos, y el aparato puede constituirse distribuyendo o integrando funcional o físicamente la totalidad o una parte del aparato en unidades arbitrarias según diversas adiciones de componentes, etc.

El método de control de amoníaco y el aparato de control de amoníaco anteriormente mencionados pueden usarse para los siguientes métodos. Por ejemplo, pueden usarse para un método para producir una sustancia objetivo mediante fermentación usando un microorganismo, específicamente, un método de cultivo de un microorganismo que tiene una capacidad para producir la sustancia objetivo en un medio líquido contenido en un tanque de fermentación para producir y acumular la sustancia objetivo en el medio.

Los ejemplos de la sustancia objetivo a la que se hace referencia en la presente invención incluyen L-aminoácidos, ácidos nucleicos, alcoholes, proteínas y así sucesivamente. En la presente invención, el “L-aminoácido” no está particularmente limitado, siempre que sea un L-aminoácido que puede acumularse en un medio en fermentación usando un microorganismo. Aunque el tipo del L-aminoácido no está particularmente limitado, los ejemplos incluyen aminoácidos básicos tales como L-lisina, L-ornitina, L-arginina, L-histidina y L-citrulina, aminoácidos alifáticos tales como L-isoleucina, L-alanina, L-valina, L-leucina y glicina, aminoácidos que son ácidos hidroximonoaminocarboxílicos tales como L-treonina y L-serina, aminoácidos cíclicos tales como L-prolina, aminoácidos aromáticos tales como L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano, aminoácidos que contienen azufre tales como L-cisteína, L-cisteína y L-metionina, aminoácidos ácidos tales como ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, L-glutamina y L-asparagina y amidas de ácido de los mismos.

El microorganismo usado puede tener una capacidad para producir dos o más clases de aminoácidos. El L-aminoácido al que se hace referencia en la presente invención puede ser un L-aminoácido libre o puede ser una sal tal como sulfato, clorhidrato y carbonato de L-aminoácido.

En la presente invención, el “ácido nucleico” no está particularmente limitado, siempre que sea un ácido nucleico que puede acumularse en un medio en fermentación usando un microorganismo. Los ejemplos del ácido nucleico incluyen nucleósidos de purina, nucleótidos de purina y así sucesivamente. Los nucleósidos de purina incluyen inosina, xantosina, guanosina, adenosina y así sucesivamente, y los nucleótidos de purina incluyen ésteres de 5'-fosfato de los nucleósidos de purina, por ejemplo, ácido inosínico (inosina-5'-fosfato, también denominado a continuación en el presente documento “IMP”), ácido xantílico (xantosina-5'-fosfato, también denominado a continuación en el presente documento “XMP”), ácido guanílico (guanosina-5'-monofosfato, también denominado a continuación en el presente documento “GMP”), ácido adenílico (adenosina-5'-monofosfato, también denominado a continuación en el presente documento “AMP”) y así sucesivamente.

En la presente invención, el “ácido orgánico” no está particularmente limitado, siempre que sea un ácido orgánico que puede acumularse en un medio en fermentación usando un microorganismo. Los ejemplos del ácido orgánico incluyen ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico y así sucesivamente.

En la presente invención, el “alcohol” no está particularmente limitado, siempre que sea un alcohol que puede acumularse en un medio en fermentación usando un microorganismo. Los ejemplos del alcohol incluyen, por ejemplo, etanol, isobutanol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol, glicerol, 2,3-butanodiol y así sucesivamente.

Los ejemplos del microorganismo que puede usarse incluyen, específicamente, bacterias *Enterobacteriaceae*

5 pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella* o similares, bacterias corineformes, bacterias *Bacillus*, bacterias *Streptococcus*, levaduras *Saccharomyces* y así sucesivamente. Es preferiblemente un microorganismo para el que es posible una sustitución génica.

10 Los ejemplos de las bacterias *Escherichia* incluyen *Escherichia coli* y así sucesivamente. Cuando se cultiva *Escherichia coli* usando técnicas de ingeniería genética, pueden usarse la cepa K12 de *E. coli* y derivadas de la misma, la cepa 1655 de *Escherichia coli* (ATCC 47076) y la cepa W3110 de *Escherichia coli* (ATCC 27325). Para obtener la cepa K-12 de *Escherichia coli* y las cepas derivadas, pueden proporcionarse, por ejemplo, a partir de la colección americana de cultivos tipo (ATCC, dirección: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América).

15 Como bacterias *Escherichia*, pueden usarse las descritas en la obra de Neidhardt *et al.* (Neidhardt, F.C. *et al.*, *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, tabla 1), tales como *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de tipo natural de *Escherichia coli* incluyen, por ejemplo, la cepa K12 y derivadas de la misma, cepa MG1655 de *Escherichia coli* (ATCC n.º 47076), cepa W3110 (ATCC n.º 27325) y así sucesivamente. Están disponibles de la colección americana de cultivos tipo (ATCC, dirección: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América).

20 Los ejemplos de las bacterias *Enterobacter* incluyen *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* y así sucesivamente, y los ejemplos de las bacterias *Pantoea* incluyen *Pantoea ananatis*. Algunas especies de *Enterobacter agglomerans* se han reclasificado recientemente como *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* o similares, basándose en el análisis de secuencia de nucleótidos de ARNr 16S, etc. Pueden usarse tanto las bacterias *Enterobacter* como las bacterias *Pantoea* siempre que la bacteria elegida esté clasificada en la familia de *Enterobacteriaceae*. Cuando se cultiva una cepa de *Pantoea ananatis* mediante una técnica de ingeniería genética, puede usarse la cepa AJ13355 de *Pantoea ananatis* (FERM BP-6614), cepa AJ13356 (FERM BP-6615), cepa AJ13601 (FERM BP-7207) y derivadas de las mismas. Estas cepas se identificaron como *Enterobacter agglomerans* cuando se aislaron, y se depositaron como *Enterobacter agglomerans*. Sin embargo, recientemente se reclasificaron como *Pantoea ananatis* basándose en secuenciación de nucleótidos de ARNr 16S y así sucesivamente tal como se describió anteriormente.

35 Las bacterias corineformes son un grupo de microorganismos definidos en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª ed., pág. 599 (1974), y pueden usarse microorganismos clasificados como tales bacilos aerobios, Gram positivos y no acidorresistentes que no pueden esporular. Las bacterias corineformes incluyen bacterias que se han clasificado previamente en el género *Brevibacterium* pero que en la actualidad se han unido al género *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol. 41:255-260 (1991)), y bacterias que pertenecen al género *Brevibacterium* o *Microbacterium*, que están estrechamente relacionados con el género *Corynebacterium*.

40 Los ejemplos específicos de tales bacterias corineformes incluyen las siguientes especies:

40 *Corynebacterium acetoacidophilum*

Corynebacterium acetoglutamicum

45 *Corynebacterium alkanolyticum*

Corynebacterium callunae

50 *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

55 *Corynebacterium thermoaminogenes* (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum

60 *Brevibacterium flavum*

Brevibacterium immariophilum

65 *Brevibacterium lactofermentum*

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

5 *Brevibacterium thiogenitalis*

Corynebacterium ammoniagenes

Brevibacterium album

10 *Brevibacterium cerinum*

Microbacterium ammoniaphilum

15 Los ejemplos específicos de estas bacterias incluyen las siguientes cepas:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

20 *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

25 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

30 *Corynebacterium efficiens* AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

35 *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020

Brevibacterium flavum ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

40 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869)

Brevibacterium roseum ATCC 13825

45 *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6871, ATCC 6872

50 *Brevibacterium album* ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

55 *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354

Estas cepas están disponibles, por ejemplo, de la colección americana de cultivos tipo (ATCC) (dirección: P.O. Box 1549, Manassas, VA 2010812301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos de América). Es decir, se facilitan números de registro para cada una de las cepas, y las cepas pueden pedirse usando estos números de registro. Los números de registro de las cepas se indican en el catálogo de la colección americana de cultivos tipo (véase <http://www.atcc.org/>). La cepa AJ12340 se presentó el 27 de octubre de 1987 en el instituto nacional de biociencia y tecnología humana, agencia de ciencia industrial y tecnología, ministerio de economía, comercio e industria (actualmente una agencia administrativa independiente, instituto nacional de tecnología y evaluación, depositario de organismos de patentes internacionales, habitación n.º 120, 2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) con el número de registro de FERM BP-1539 de acuerdo con las disposiciones del tratado de Budapest. La cepa AJ12418 se presentó el 5 de enero de 1989 en el instituto nacional

de biociencia y tecnología humana, agencia de ciencia industrial y tecnología, ministerio de economía, comercio e industria (actualmente una agencia administrativa independiente, instituto nacional de tecnología y evaluación, depositario de organismos de patentes internacionales) con el número de registro de FERM BP-2205 de acuerdo con las disposiciones del tratado de Budapest.

5 Cuando se usan bacterias *Bacillus*, los ejemplos de las mismas incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y así sucesivamente.

10 Los ejemplos de *Bacillus subtilis* incluyen cepa 168 Marburg de *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), cepa PY79 de *Bacillus subtilis* (Plasmid, 1984, 12, 1-9) y así sucesivamente. Los ejemplos de *Bacillus amyloliquefaciens* incluyen cepa T de *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC 23842), cepa N de *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC 23845) y así sucesivamente. Los ejemplos de *Bacillus pumilus* incluyen *Bacillus pumilus* Gottheil n.º 3218 (ATCC 21005) (patente estadounidense n.º 3.616.206) y así sucesivamente.

15 A continuación en el presente documento, se describirán métodos para conferir una capacidad de producción de L-aminoácido o ácido nucleico para tales cepas originales tal como se mencionaron anteriormente.

20 Para conferir la capacidad para producir un L-aminoácido o un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionalmente empleados en el cultivo de bacterias corineformes o bacterias del género *Escherichia* (véase "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1ª edición, publicado el 30 de mayo de 1986, págs. 77-100). Tales métodos incluyen métodos de adquirir un mutante auxótrofo, una cepa resistente a análogo o un mutante de regulación metabólica, o construir una cepa recombinante de modo que sobreexpresen una enzima de biosíntesis de L-aminoácidos o ácidos nucleicos. En el cultivo de una bacteria productora de L-aminoácidos, pueden conferirse una única o dos o tres o más de las propiedades descritas anteriormente tales como auxotrofia, resistencia a análogo o mutación de regulación metabólica. Puede potenciarse la expresión de una única o dos o tres o más enzimas de biosíntesis de L-aminoácidos. Además, los métodos de conferir propiedades tales como una mutación auxótrofa, resistencia a análogo o mutación de regulación metabólica pueden combinarse con los métodos de potenciar las enzimas de biosíntesis.

30 Una cepa mutante auxótrofa, cepa resistente a análogo de L-aminoácido o ácido nucleico o cepa mutante de regulación metabólica que tiene una capacidad para producir un L-aminoácido o ácido nucleico puede obtenerse sometiendo una cepa original o cepa de tipo natural a una mutagénesis convencional, tal como exposición a rayos X o irradiación UV, o tratamiento con un mutágeno tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etc., y después seleccionando aquellas que muestran una mutación de autotrofia, resistencia a análogo o regulación metabólica, y que también tienen la capacidad para producir un L-aminoácido a partir de las cepas mutantes obtenidas.

35 Una cepa mutante auxótrofa, cepa resistente a análogo de L-aminoácido o cepa mutante de regulación metabólica que tiene una capacidad para producir un L-aminoácido puede obtenerse sometiendo una cepa original o cepa de tipo natural a una mutagénesis convencional, tal como exposición a rayos X o irradiación UV, o tratamiento con un mutágeno tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o metanosulfonato de etilo (EMS), etc., y después seleccionando aquellas que muestran una mutación de autotrofia, resistencia a análogo o regulación metabólica y que también tienen la capacidad para producir un L-aminoácido a partir de las cepas mutantes obtenidas.

45 A continuación se mostrarán específicamente a modo de ejemplo métodos para conferir capacidad de producción de aminoácidos y bacterias productoras de aminoácidos.

(Bacterias productoras de L-Lisina)

50 A continuación se muestran a modo de ejemplo bacterias productoras de L-Lisina y métodos para construirlas.

Los ejemplos de cepas que tienen capacidad de producción de L-lisina incluyen, por ejemplo, cepas resistentes a análogo de L-lisina y cepas mutantes de regulación metabólica. Los ejemplos de análogo de L-lisina incluyen, pero no se limitan a, oxalisina, hidroxamato de lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ -metil-lisina, α -clorocaprolactama y así sucesivamente. Pueden obtenerse cepas mutantes que tienen resistencia a esos análogos de lisina sometiendo una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* o una bacteria corineforme a un tratamiento de mutagénesis artificial convencional. Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-lisina incluyen *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, véase la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-18596 y la patente estadounidense n.º 4.346.170), cepa VL611 de *Escherichia coli* (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2000-189180) y así sucesivamente. Como *Escherichia coli* productora de L-lisina, también puede usarse la cepa WC196 (véase la publicación internacional WO96/17930).

65 Además, también puede construirse una bacteria productora de L-lisina aumentando la actividad de una enzima de sistema de biosíntesis de L-lisina. El aumento de la actividad de una enzima de este tipo puede lograrse aumentando el número de copias del gen que codifica para la enzima en células, o modificando una secuencia de control de la expresión del mismo. El aumento del número de copias de un gen que codifica para una enzima del sistema de biosíntesis de L-lisina en células y la modificación de una secuencia de control de la expresión pueden

lograrse de la misma manera que para los genes *gltP* y *gltS* descritos a continuación.

Los ejemplos de genes que codifican para enzimas de biosíntesis de L-lisina incluyen genes que codifican para enzimas de la ruta de diaminopimelato tales como gen de dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), gen de aspartocinasa (*lysC*), gen de dihidrodipicolinato reductasa (*dapB*), gen de diaminopimelato descarboxilasa (*lysA*), gen de diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*) (documento WO96/40934 para todos los genes anteriores), gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 60-87788), gen de aspartato aminotransferasa (*aspC*) (publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 6-102028), gen de diaminopimelato epimerasa (*dapF*) (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2003-135066), y gen de aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*) (documento WO00/61723), y genes que codifican para enzimas de la ruta de ácido aminoacético tales como gen de homoaconitato hidratasa (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2000-157276). Además, la cepa original puede mostrar un nivel aumentado de expresión del gen implicado en la eficiencia energética (*cyo*) (documento EP 1170376 A), el gen que codifica para nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (*pntAB*) (patente estadounidense n.º 5.830.716), el gen *ybjE* que codifica para una proteína que tiene actividad de excreción de L-lisina (documento WO2005/073390), el gen que codifica para glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) (Gene 23:199-209 (1983)), o una combinación arbitraria de los mismos. Las abreviaturas para los genes se muestran entre paréntesis. Entre los genes anteriormente mencionados, se prefiere el gen *ybjE*.

Se sabe que la dihidrodipicolinato sintasa de tipo natural derivada de *Escherichia coli* experimenta inhibición por retroalimentación mediante L-lisina, y se sabe que la aspartocinasa de tipo natural derivada de *Escherichia coli* experimenta supresión e inhibición por retroalimentación mediante L-lisina. Por tanto, cuando se usan los genes *dapA* y *lysC*, estos genes son preferiblemente genes que codifican para enzimas mutantes desensibilizadas frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-lisina.

Los ejemplos de ADN que codifica para una dihidrodipicolinato sintetasa mutante desensibilizada frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-lisina incluyen un ADN que codifica para una proteína de este tipo que tiene una secuencia de aminoácidos en la que el residuo de histidina en la posición 118 se sustituye por un residuo de tirosina. Los ejemplos de ADN que codifica para una aspartocinasa mutante desensibilizada frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-lisina incluyen un ADN que codifica para una AKIII que tiene una secuencia de aminoácidos en la que el residuo de treonina en la posición 352, el residuo de glicina en la posición 323 y el residuo de metionina en la posición 318 se sustituyen por residuos de isoleucina, asparagina e isoleucina, respectivamente (para estos mutantes, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 5.661.012 y 6.040.160). Tales ADN mutantes pueden obtenerse mediante mutagénesis específica del sitio usando PCR o similares.

Se conocen plásmidos de amplio espectro de huéspedes RSFD80, pCAB1 y pCABD2 como plásmidos que contienen un gen *dapA* mutante que codifica para una dihidrodipicolinato sintetasa mutante y un gen *lysC* mutante que codifica para una aspartocinasa mutante (patente estadounidense n.º 6.040.160). La cepa JM109 de *Escherichia coli* transformada con RSFD80 se denominó AJ12396 (patente estadounidense n.º 6.040.160), y se presentó la cepa en el instituto nacional de biociencia y tecnología humana, agencia de ciencia industrial y tecnología, ministerio de comercio internacional e industria (actualmente una agencia administrativa independiente, instituto nacional de tecnología y evaluación, depositario de organismos de patentes internacionales) el 28 de octubre de 1993 y se le asignó un número de registro de FERM P-13936, y después se convirtió el depósito en un depósito internacional de acuerdo con las disposiciones del tratado de Budapest el 1 de noviembre de 1994 y se le asignó un número de registro de FERM BP-4859. RSFD80 puede obtenerse a partir de la cepa AJ12396 mediante un método convencional.

Además, las bacterias productoras de L-aminoácidos pueden tener una actividad reducida de una enzima que cataliza una reacción que se bifurca a partir de una ruta de biosíntesis de L-aminoácidos y que produce otro compuesto, o pueden ser deficientes en tal actividad, o pueden tener una actividad reducida de una enzima que actúa negativamente sobre la síntesis o acumulación de L-aminoácidos, o pueden ser deficientes en tal actividad. Los ejemplos de tales enzimas implicadas en la producción de L-lisina incluyen homoserina deshidrogenasa, lisina descarboxilasa (*cadA*, *ldcC*), enzima málica y así sucesivamente, y cepas en las que se reducen o delecionan las actividades de estas enzimas se divulgan en los documentos WO95/23864, WO96/17930, WO2005/010175 y así sucesivamente.

Se prefiere que las expresiones de los genes tanto *cadA* como *ldcC* que codifican para lisina descarboxilasa estén reducidas con el fin de reducir o delecionar la actividad lisina descarboxilasa. La expresión de ambos genes puede reducirse, por ejemplo, mediante el método descrito en el documento WO2006/078039.

Con el fin de reducir o eliminar las actividades de estas enzimas, puede introducirse una mutación en genes de las enzimas en un genoma mediante un método de mutagénesis habitual o técnica de recombinación génica de modo que se reducen o eliminan las actividades intracelulares de las enzimas. Tal introducción de una mutación puede lograrse, por ejemplo, usando recombinación genética para eliminar los genes que codifican para las enzimas en el genoma o para modificar una secuencia de control de la expresión tal como un promotor o la secuencia Shine-Dalgarno (SD). También puede lograrse introduciendo una mutación para sustitución de aminoácido (mutación de

cambio de sentido), un codón de terminación (mutación sin sentido) o una mutación de desplazamiento de marco para añadir o delecionar uno o dos nucleótidos en regiones que codifican para las enzimas en el genoma, o delecionar parcial o totalmente los genes (J. Biol. Chem., 272:8611-8617 (1997)). Las actividades enzimáticas también pueden reducirse o eliminarse construyendo un gen que codifica para una enzima mutante, cuya región codificante se deleciona total o parcialmente, y sustituyendo un gen normal por el mismo en un genoma mediante recombinación homóloga o similar, o introduciendo un transposón o factor de IS en el gen.

Por ejemplo, con el fin de introducir una mutación que reduce o elimina las actividades de las enzimas anteriormente mencionadas mediante recombinación genética, se usan los siguientes métodos. Se prepara un gen mutante modificando una secuencia parcial de un gen objetivo de modo que no codifica para una enzima que puede funcionar normalmente, y después puede transformarse una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* con un ADN que contiene el gen mutante para provocar la recombinación de un gen correspondiente en el genoma con el gen mutante para sustituir el gen objetivo por el mutante en el genoma. Los ejemplos de tal sustitución génica usando recombinación homóloga incluyen métodos de uso de un ADN lineal tal como el método denominado integración impulsada por Red (Datsenko, K.A, y Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645 (2000)), y el método que usa la integración impulsada por Red en combinación con un sistema de escisión derivado de fago λ (Cho, E.H., Gumpert, R.I., Gardner, J.F., J. Bacteriol., 184:5200-5203 (2002)) (véase el documento WO2005/010175), un método de uso de un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura (patente estadounidense n.º 6.303.383, solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 05-007491) y así sucesivamente. Además, tal mutagénesis específica del sitio basada en sustitución génica usando recombinación homóloga también puede realizarse usando un plásmido que no puede replicarse en un huésped.

Los ejemplos preferidos de bacterias productoras de L-lisina incluyen *Escherichia coli* WC196 Δ cadA Δ ldcC/pCABD2 (documento WO2006/078039). La cepa se construyó introduciendo el plásmido pCABD2 que contiene genes de biosíntesis de lisina (patente estadounidense n.º 6.040.160) en la cepa WC196 que tiene genes *cadA* y *ldcC* alterados, que codifican para lisina descarboxilasa. Se cultivó la cepa WC196 a partir de la cepa W3110, que se derivó de *Escherichia coli* K-12, sustituyendo el gen *lysC* de tipo natural en el cromosoma de la cepa W3110 por un gen *lysC* mutante que codificaba para una aspartocinasa III mutante en la que la treonina en la posición 352 se sustituyó por isoleucina, dando como resultado la desensibilización de la inhibición por retroalimentación de la misma mediante L-lisina (patente estadounidense n.º 5.661.012), y confiriendo resistencia a AEC a la cepa resultante (patente estadounidense n.º 5.827.698). La cepa WC196 se denominó *Escherichia coli* AJ13069, se depositó en el instituto nacional de biociencia y tecnología humana, agencia de ciencia industrial y tecnología (actualmente una agencia administrativa independiente, instituto nacional de tecnología y evaluación, depositario de organismos de patentes internacionales, habitación n.º 120, 2-5-8 Kazusakamatarí, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 6 de diciembre de 1994, y se le asignó un número de registro de FERM P-14690. Después, se convirtió en un depósito internacional de acuerdo con las disposiciones del tratado de Budapest el 29 de septiembre de 1995, y se le asignó un número de registro de FERM BP-5252 (patente estadounidense n.º 5.827.698). La propia cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC también es una bacteria productora de L-lisina preferida. La WC196 Δ cadA Δ ldcC se denominó AJ110692, y se depositó en el instituto nacional de biociencia y tecnología humana, agencia de ciencia industrial y tecnología (actualmente, la agencia administrativa independiente, instituto nacional de tecnología y evaluación, depositario de organismos de patentes internacionales, habitación n.º 120, 2-5-8 Kazusakamatarí, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 7 de octubre de 2008 como un depósito internacional y se le asignó un número de registro de FERM BP-11027.

El plásmido pCABD2 contiene un gen *dapA* mutante derivado de *Escherichia coli* y que codifica para una dihidrodipicolinato sintasa (DDPS) que tiene una mutación para desensibilización frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-lisina, un gen *lysC* mutante derivado de *Escherichia coli* y que codifica para aspartocinasa III que tiene una mutación para desensibilización frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-lisina, el gen *dapB* derivado de *Escherichia coli* y que codifica para dihidrodipicolinato reductasa, y el gen *ddh* derivado de *Brevibacterium lactofermentum* y que codifica para diaminopimelato deshidrogenasa.

Los procedimientos descritos anteriormente para potenciar la expresión génica de las enzimas implicadas en la biosíntesis de L-lisina y los métodos para reducir las actividades enzimáticas pueden aplicarse de manera similar a genes que codifican para otras enzimas de biosíntesis de L-aminoácidos.

(Bacterias productoras de L-triptófano)

Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas originales que pueden usarse para derivar las mismas incluyen, pero no se limitan a, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) y JP6015/pMU91 (DSM10123) que son deficientes en triptofanil-ARNt sintetasa codificada por gen *trpS* mutante (patente estadounidense n.º 5.756.345), *E. coli* SV164 (pGH5) que tiene un alelo de *serA* que codifica para fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada frente a la inhibición por retroalimentación mediante serina y un alelo de *trpE* que codifica para antranilato sintasa desensibilizada frente a inhibición por retroalimentación mediante triptófano (patente estadounidense n.º 6.180.373), *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) y AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) deficiente en triptofanasa (patente estadounidense n.º 4.371.614), *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps en la que se potencia una capacidad de producción de fosfoenolpiruvato (documento WO97/08333, patente

estadounidense n.º 6.319.696) y así sucesivamente. También pueden usarse bacterias productoras de L-triptófano que pertenecen al género *Escherichia* que tienen actividad potenciada de la proteína codificada por el gen *yedA* o *yddG* (solicitudes publicadas de patente estadounidense 2003/0148473 A1 y 2003/0157667 A1).

5 Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas originales que pueden usarse para derivar las mismas también incluyen cepas en las que se potencian una o más actividades de las siguientes enzimas: antranilato sintasa (*trpE*), fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*) y triptófano sintasa (*trpAB*). La antranilato sintasa y la fosfoglicerato deshidrogenasa están ambas sujetas a inhibición por retroalimentación mediante L-triptófano y L-serina, y por tanto puede introducirse en estas enzimas una mutación que desensibilice a las enzimas frente a la inhibición por retroalimentación. Los ejemplos específicos de cepas que tienen una mutación de este tipo incluyen *E. coli* SV164 que alberga antranilato sintasa desensibilizada y una cepa transformante SV164 obtenida introduciendo en la *E. coli* SV164 el plásmido pGH5, que contiene un gen *serA* mutante que codifica para una fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada frente a inhibición por retroalimentación (documento WO94/08031).

15 Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas originales que pueden usarse para derivar las mismas también incluyen una cepa que tiene actividad potenciada de 3-fosfoserina fosfatasa (*serB*) (patente estadounidense n.º 4.371.614), una cepa que tiene actividad potenciada de fosfoenolpiruvato carboxinasa (*pckA*) (documento WO2004/090125), y una cepa en la que enzimas de la ruta de ácido glioxílico se expresan de manera constitutiva (documento WO2005/103275).

20 L-Triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina son todos ellos aminoácidos aromáticos y comparten una ruta de biosíntesis común. Los ejemplos de los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis para estos aminoácidos aromáticos incluyen desoxiarabino-heptulosonato fosfato sintasa (*aroG*), 3-deshidroquinato sintasa (*aroB*), ácido shikímico deshidratasa (*aroE*), shikimato cinasa (*aroL*), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (*aroA*), y corismato sintasa (*aroC*) (publicación de patente europea n.º 763127 A). Se conoce que estos genes se controlan mediante el represor de tirosina (*tyrR*), y por tanto la actividad de una enzima de biosíntesis de aminoácidos aromáticos también puede aumentarse delecionando el gen *tyrR* (véase la publicación de patente europea n.º 763127 A). Las abreviaturas entre paréntesis después de los nombres de enzimas representan los nombres de genes (lo mismo se aplicará a las mismas ocasiones a continuación en el presente documento).

30 Con el fin de potenciar la productividad de cada uno de los aminoácidos aromáticos objetivo, puede atenuarse el sistema de biosíntesis de un aminoácido distinto del aminoácido objetivo. Por ejemplo, cuando el aminoácido objetivo es L-triptófano, pueden atenuarse las rutas de biosíntesis de L-fenilalanina y/o L-tirosina (patente estadounidense n.º 4.371.614).

35 En la presente invención, el término "aumento de la actividad de enzima" corresponde, por ejemplo, a un aumento del número de moléculas de enzima por célula, aumento de la actividad específica por molécula de enzima y así sucesivamente. Por ejemplo, puede aumentarse la actividad aumentando la cantidad de expresión del gen de la enzima. La actividad intracelular de una enzima se aumenta preferiblemente para que sea superior a la de una cepa no modificada, por ejemplo, una cepa de tipo natural, del microorganismo.

40 Además, 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintetasa (*aroF*, *aroG*) está sujeta a inhibición por retroalimentación mediante aminoácidos aromáticos. Por tanto, la enzima puede modificarse de modo que se desensibilice frente a la inhibición por retroalimentación. Puede obtenerse una bacteria productora de L-aminoácidos aromáticos, por ejemplo, introduciendo un *aroF* mutante en el que el residuo de ácido L-aspártico en la posición 147 o el residuo de L-serina en la posición 181 desde el extremo N-terminal se sustituye por otro aminoácido, o introduciendo un gen *aroG* mutante en el que uno del residuo de ácido L-aspártico en la posición 146, el residuo de L-metionina en la posición 147, la L-prolina en la posición 150 y el residuo de L-alanina en la posición 202, o tanto el residuo de L-metionina en la posición 157 como el residuo de L-alanina en la posición 219 desde el extremo N-terminal, se sustituyen por otro(s) aminoácido(s) (documento EP0488424).

45 Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas originales que pueden usarse para derivar las mismas también incluyen cepas en las que se ha introducido el operón de triptófano que contiene un gen que codifica para antranilato sintasa desensibilizada frente a inhibición (solicitudes de patente japonesa abiertas a consulta por el público n.ºs 57-71397, 62-244382, patente estadounidense n.º 4.371.614). Además, puede conferirse capacidad de producción de L-triptófano potenciando la expresión de un gen que codifica para triptófano sintasa en el operón de triptófano (*trpBA*). La triptófano sintasa consiste en subunidades α y β que se codifican por los genes *trpA* y *trpB*, respectivamente. Además, puede mejorarse la capacidad de producción de L-triptófano potenciando la expresión del operón de isocitrato liasa-malato sintasa (documento WO2005/103275).

60 Como bacterias corineformes, pueden usarse *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, patente japonesa n.º 01681002), que es resistente a sulfaguanidina, la bacteria corineforme con el operón de triptófano introducido (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 63-240794), y la bacteria corineforme con un gen introducido que codifica para shikimato cinasa derivado de una bacteria corineforme (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 01-994749).

65

(Bacterias productoras de L-fenilalanina)

Los ejemplos de bacterias productoras de L-fenilalanina y cepas originales que pueden usarse para derivar las mismas incluyen, pero no se limitan a, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197), *E. coli* HW1089 (ATCC 55371) que alberga un gen *pheA34* mutante (patente estadounidense n.º 5.354.672), *E. coli* MWE101-b (patente coreana n.º 8903681), *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146, y NRRL B-12147 (patente estadounidense n.º 4.407.952). Además, como cepa original, también pueden usarse *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB (FERM BP-3566)], *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662) y *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] denominada AJ12604 (FERM BP-3579) (documento EP 488424 B1). Además, también pueden usarse bacterias productoras de L-fenilalanina que pertenecen al género *Escherichia* con una actividad potenciada de la proteína codificada por el gen *yedA* o el gen *yddG* (solicitudes publicadas de patente estadounidense n.ºs 2003/0148473 A1 y 2003/0157667 A1).

Como bacterias corineformes productoras de fenilalanina, pueden usarse *Corynebacterium glutamicum* BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062) y K78 (FERM BP-2063) (publicación de patente europea n.º 331145 A, solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 02-303495), cuya actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa o piruvato cinasa se reduce, cepa auxótrofa para tirosina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 05-049489) y así sucesivamente.

También puede obtenerse una bacteria que produce de manera eficiente fenilalanina modificando una bacteria de modo que incorpora subproductos, por ejemplo, aumentando la cantidad de expresión del gen de captación de L-triptófano, *tnaB* o *mtr*, o el gen de captación de L-tirosina, *tyrP* (documento EP 1484410).

(Bacterias productoras de L-tirosina)

Los ejemplos de bacterias productoras de tirosina incluyen bacterias *Escherichia* con un gen de pefenato deshidratasa desensibilizado (*tyrA*) (publicación de patente europea n.º 1616940 A).

(Bacterias productoras de L-valina)

Los ejemplos de bacterias productoras de L-valina y cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-valina incluyen, pero no se limitan a, cepas que se han modificado para sobreexpresar el operón *ilvGMEDA* (patente estadounidense n.º 5.998.178). Se prefiere que la región en el operón *ilvGMEDA* que se requiere para la atenuación se retire de modo que la expresión del operón no se atenúe mediante la L-valina que se produce. Además, se prefiere que el gen *ilvA* en el operón se altere de modo que se reduzca la actividad treonina desaminasa.

Los ejemplos de cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-valina también incluyen cepas mutantes con amino-acil ARNt sintetasa que tienen una mutación (patente estadounidense n.º 5.658.766). Por ejemplo, puede usarse *E. coli* VL1970, que tiene una mutación en el gen *ileS* que codifica para isoleucina ARNt sintetasa. *E. coli* VL1970 se depositó en la colección nacional rusa de microorganismos industriales (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscú 117545, Rusia) el 24 de junio de 1988 con un número de registro VKPM B-4411.

Además, también pueden usarse mutantes que requieren ácido lipoico para el crecimiento y/o que carecen de H⁺-ATPasa como cepas originales (documento WO96/06926).

Los ejemplos de bacterias productoras de L-valina de bacterias corineformes incluyen, por ejemplo, cepas modificadas de modo que se potencia la expresión de un gen que codifica para una enzima de biosíntesis de L-valina. Los ejemplos de la enzima de biosíntesis de L-valina incluyen enzimas codificadas por genes presentes en el operón *ilvBNC*, es decir, acetohidroxiácido sintetasa codificada por *ilvBN* e isómero reductasa codificada por *ilvC* (documento WO00/50624). Dado que el operón *ilvBNC* está sujeto a regulación de la expresión mediante L-valina y/o L-isoleucina y/o L-leucina, es deseable eliminar la atenuación para evitar la supresión de la expresión mediante L-valina que se produce.

Puede conferirse capacidad de producción de L-valina a bacterias corineformes y puede mejorarse la capacidad de producción de L-valina de bacterias corineformes reduciendo o eliminando la actividad de al menos una clase de enzima que está implicada en una ruta metabólica que reduce la producción de L-valina. Por ejemplo, se contempla la reducción de la actividad de treonina deshidratasa implicada en la síntesis de L-leucina, o la actividad de una enzima que está implicada en la síntesis de D-pantotenato (documento WO00/50624).

Los ejemplos de métodos para conferir capacidad de producción de L-valina también incluyen conferir resistencia a un análogo de aminoácido o similar.

Los ejemplos incluyen, por ejemplo, cepas mutantes que son auxótrofas para L-isoleucina y L-metionina, y

resistentes a D-ribosa, ribonucleósido de purina o ribonucleósido de pirimidina, y tienen una capacidad para producir L-valina (FERM P-1841, FERM P-29, publicación de patente japonesa n.º 53-025034), cepas mutantes resistentes a policétidos (FERM P-1763, FERM P-1764, publicación de patente japonesa n.º 06-065314), y cepas mutantes resistentes a L-valina en un medio que contiene ácido acético como única fuente de carbono y sensibles a análogos de ácido pirúvico (ácido β -fluoropirúvico, etc.) en un medio que contiene glucosa como única fuente de carbono (FERM BP-3006, BP-3007, patente japonesa n.º 3006929).

Un ejemplo de un gen implicado en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada es el operón *ilvGMEDA*, y este operón está sujeto a control de la expresión (atenuación) mediante L-valina y/o L-isoleucina y/o L-leucina. Por tanto, la productividad de un microorganismo para estos L-aminoácidos puede mejorarse introduciendo en el microorganismo el operón *ilvGMEDA* en el que se retira o se muta la región requerida para la atenuación.

(Bacterias productoras de L-isoleucina)

Los ejemplos de bacterias productoras de L-isoleucina y cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-isoleucina incluyen, pero no se limitan a, mutantes que tienen resistencia a 6-dimetilaminopurina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 5-304969), mutantes que tienen resistencia a un análogo de isoleucina tal como tiaisoleucina e hidroxamato de isoleucina, y mutantes que tienen resistencia a DL-etionina y/o hidroxamato de arginina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 5-130882). Además, también pueden usarse cepas recombinantes transformadas con genes que codifican para proteínas implicadas en la biosíntesis de L-isoleucina, tales como treonina desaminasa y acetohidroxiácido sintasa, como cepas originales (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2-458, patente francesa n.º 0356739, y patente estadounidense n.º 5.998.178).

Los ejemplos de cepas productoras de L-isoleucina de bacterias corineformes incluyen la bacteria corineforme en la que se amplifica el gen *bmE* que codifica para una proteína de excreción de aminoácidos de cadena ramificada (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-169788), la bacteria corineforme a la que se confiere capacidad de producción de L-isoleucina mediante fusión de protoplasto con una bacteria de producción de L-lisina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-74293), la bacteria corineforme en la que se potencia homoserina deshidrogenasa (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-91193), la cepa resistente a hidroxamato de treonina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-195293), cepa resistente a ácido α -cetomalónico (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 61-15695) y la cepa resistente a metil-lisina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 61-15696).

(Bacterias productoras de L-leucina)

Los ejemplos de bacterias productoras de L-leucina y cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-leucina incluyen, pero no se limitan a, bacterias *Escherichia*, tales como cepas de *E. coli* resistentes a leucina (por ejemplo, la cepa 57 (VKPM B-7386, patente estadounidense n.º 6.124.121)) o análogos de leucina incluyendo β -2-tienilalanina, 3-hidroxisoleucina, 4-azaleucina y 5,5,5-trifluoroisoleucina (publicación de patente japonesa n.º 62-34397 y solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 8-70879); cepas de *E. coli* obtenidas mediante el método de ingeniería genética descrito en el documento WO96/06926; y *E. coli* H-9068 (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 8-70879).

También pueden mejorarse bacterias productoras de L-leucina potenciando la expresión de uno o más genes implicados en la biosíntesis de L-leucina. Los ejemplos de tales genes incluyen genes del operón *leuABCD*, que están representados preferiblemente por un gen *leuA* mutante que codifica para isopropilmalato sintasa desensibilizada frente a inhibición por retroalimentación mediante L-leucina (patente estadounidense n.º 6.403.342). Además, también pueden mejorarse bacterias productoras de L-leucina potenciando la expresión de uno o más genes que codifican para proteínas que excretan L-aminoácido a partir de la célula bacteriana. Los ejemplos de tales genes incluyen los genes *b2682* y *b2683* (genes *ygaZH*) (documento EP 1239041 A2).

Los ejemplos de cepas productoras de L-leucina de bacterias corineformes incluyen las cepas resistentes a 2-tiazolalanina y β -hidroxisoleucina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 8-266295), la cepa resistente a análogo de valina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 63-248392), la cepa auxótrofa para valina (publicación de patente japonesa n.º 38-4395), la cepa resistente a S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC) (publicación de patente japonesa n.º 51-37347) y la cepa auxótrofa para fenilalanina, valina e isoleucina (publicación de patente japonesa n.º 54-36233).

(Bacterias productoras de ácido L-glutámico)

Los ejemplos preferidos de bacterias productoras de ácido L-glutámico incluyen, por ejemplo, cepas en las que se potencia la expresión de un gen que codifica para una enzima de biosíntesis de ácido L-glutámico. Los ejemplos de tales genes incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican para glutamato deshidrogenasa (*gdhA*), glutamina sintetasa (*glnA*), glutamato sintetasa (*gltAB*), isocitrato deshidrogenasa (*icdA*), aconitato hidratasa (*acnA*, *acnB*),

citrato sintasa (*gltA*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), piruvato deshidrogenasa (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinasa (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*), enolasa (*eno*), fosfogliceromutasa (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato cinasa (*pgk*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), triosa fosfato isomerasa (*tpiA*), fructosa bisfosfato aldolasa (*fbp*), fosfofructocinasa (*pfkA*, *pfkB*), glucosa fosfato isomerasa (*pgi*) y así sucesivamente.

Los ejemplos de cepas que se han modificado de modo que se potencia la expresión del gen de citrato sintetasa, el gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa, el gen de isocitrato deshidrogenasa, el gen de piruvato deshidrogenasa y/o el gen de glutamato deshidrogenasa incluyen las dadas a conocer en los documentos EP 1078989 A, EP 955368 A, EP 952221 A y EP 1033407 A.

La modificación para conferir capacidad de producción de ácido L-glutámico también puede lograrse reduciendo o eliminando la actividad de una enzima que cataliza una reacción que se bifurca a partir de la ruta de biosíntesis de ácido L-glutámico y que produce un compuesto distinto de ácido L-glutámico. Los ejemplos de una enzima de este tipo que cataliza una reacción que se bifurca a partir de la ruta de biosíntesis de ácido L-glutámico y que produce un compuesto distinto de ácido L-glutámico incluyen isocitrato liasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, acetohidroxiácido sintasa, acetolactato sintasa, formiato acetiltransferasa, lactato deshidrogenasa, glutamato descarboxilasa, 1-pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa y así sucesivamente.

Por ejemplo, con el fin de reducir la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa, puede realizarse una modificación usando el gen *sucA* (*odhA*) que codifica para la subunidad E1o de la enzima. Los ejemplos de cepas con actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa reducida incluyen, por ejemplo, las siguientes cepas:

cepa ΔS de *Brevibacterium lactofermentum* (documento WO95/34672)

Brevibacterium lactofermentum AJ12821 (FERM BP-4172; patente francesa n.º 9401748)

Brevibacterium flavum AJ12822 (FERM BP-4173; patente francesa n.º 9401748)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174; patente francesa n.º 9401748)

Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207)

Klebsiella planticola AJ13410 (FERM BP-6617)

Pantoea ananatis AJ13355 (FERM BP-6614)

Pantoea ananatis AJ13356 es deficiente en actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa como resultado de alteración del gen de la subunidad α KGDH-E1 (*sucA*). Esta cepa se identificó como *Enterobacter agglomerans* cuando se aisló y se depositó como *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Sin embargo, recientemente reclasificó como *Pantoea ananatis* basándose en secuenciación de nucleótidos de ARNr 16S y así sucesivamente. Aunque AJ13356 se depositó en el depositario anterior como *Enterobacter agglomerans*, se describe como *Pantoea ananatis* en esta memoria descriptiva.

Además, también puede conferirse la capacidad para producir ácido L-glutámico a bacterias corineformes mediante un método de amplificar el gen *yggB* (NCgl 1221; NP_600492. Reports small-conductance. [gi:19552490], documento WO2006/070944), o un método de introducir un gen *yggB* mutante en el que se introduce una mutación en la región codificante.

Los ejemplos de otros métodos para conferir o potenciar capacidad de producción de ácido L-glutámico incluyen un método de conferir resistencia a un análogo de ácido orgánico, un inhibidor de la cadena respiratoria, etc., y un método de conferir sensibilidad frente a un inhibidor de síntesis de la pared celular. Los ejemplos de tales métodos incluyen el método de conferir resistencia a ácido monofluoroacético (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 50-113209), el método de conferir resistencia a adenina o timina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-065198), el método de atenuar la ureasa (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 52-038088), el método de conferir resistencia a ácido malónico (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 52-038088), el método de conferir resistencia a benzopironas o naftoquinonas (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-1889), el método de conferir resistencia a HOQNO (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-140895), el método de conferir resistencia a ácido α -cetomalónico (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-2689), el método de conferir resistencia a guanidina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-35981), el método de conferir sensibilidad frente a penicilina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 4-88994) y así sucesivamente.

Los ejemplos específicos de tales cepas resistentes incluyen las siguientes cepas:

Brevibacterium flavum AJ3949 (FERM BP-2632; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 50-113209)

5 *Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-065198)

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-1889)

10 *Corynebacterium glutamicum* AJ11368 (FERM P-5020; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-1889)

Brevibacterium flavum AJ11217 (FERM P-4318; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-2689)

15 *Corynebacterium glutamicum* AJ11218 (FERM P-4319; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-2689)

20 *Brevibacterium flavum* AJ11564 (FERM BP-5472; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-140895)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM BP-5136; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-35981)

25 *Corynebacterium glutamicum* H7684 (FERM BP-3004; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 04-88994)

Brevibacterium lactofermentum AJ11426 (FERM P-5123; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-048890)

30 *Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P-5137; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-048890)

35 *Brevibacterium lactofermentum* AJ11796 (FERM P-6402; solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 58-158192)

(Bacterias productoras de L-treonina)

40 Los ejemplos preferidos de bacterias productoras de L-treonina incluyen bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* en las que se potencia una actividad de enzima de sistema de biosíntesis de L-treonina. Los ejemplos de genes que codifican para enzimas de biosíntesis de L-treonina incluyen el gen de aspartocinasa III (*lysC*), gen de aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), gen de aspartocinasa I (*thrA*), gen de homoserina cinasa (*thrB*) y gen de treonina sintasa (*thrC*) codificados por el operón *thr*. Pueden introducirse dos o más clases de estos genes. Los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis de L-treonina pueden introducirse en una bacteria *Enterobacteriaceae* con descomposición de treonina reducida. Los ejemplos de la bacteria *Escherichia* con descomposición de treonina reducida incluyen, por ejemplo, la cepa TDH6 que es deficiente en actividad treonina deshidrogenasa (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-346578) y así sucesivamente.

50 Las actividades de las enzimas de biosíntesis de L-treonina se inhiben mediante el producto final L-treonina, y por tanto las enzimas de biosíntesis de L-treonina se modifican preferiblemente para desensibilizarse frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-treonina cuando se construyen cepas productoras de L-treonina. Los genes *thrA*, *thrB* y *thrC* anteriormente descritos constituyen el operón de treonina que tiene una estructura de atenuador. La expresión del operón de treonina se inhibe mediante isoleucina y treonina en el medio de cultivo y también se reprime mediante atenuación. Esta atenuación puede eliminarse o reducirse retirando una secuencia líder o atenuador en la región de atenuación (Lynn, S.P., Burton, W.S., Donohue, T.J., Gould, R.M., Gumpert, R.I., y Gardner, J.F.J., Mol. Biol. 194:59-69 (1987); documentos WO02/26993; WO2005/049808).

60 El promotor nativo presente en la región en sentido de 5' del operón de treonina puede sustituirse por un promotor no nativo (documento WO98/04715), o el operón de treonina puede construirse de modo que la expresión de los genes de biosíntesis de treonina se controla mediante el represor y promotor de fago λ (patente europea n.º 0593792). Además, pueden obtenerse bacterias *Escherichia* mutantes que están desensibilizadas frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-treonina seleccionando cepas resistentes a ácido α -amino- β -hidroxisovalérico (AHV).

65 Es preferible que se aumente el número de copias del operón de treonina resistente a la inhibición por

retroalimentación modificado, o se aumente la expresión del operón modificado conectándolo a un promotor potente en el huésped. El número de copias puede aumentarse usando, además de amplificación usando un plásmido, transposón, fago Mu o similares de modo que el operón se transfiera al cromosoma.

5 El gen que codifica para aspartocinasa III (*lysC*) se modifica preferiblemente de modo que la enzima se desensibiliza frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-lisina. Un gen *lysC* resistente a la inhibición por retroalimentación modificado de este tipo puede obtenerse mediante el método descrito en la patente estadounidense n.º 5.932.453.

10 También pueden obtenerse preferiblemente bacterias productoras de L-treonina potenciando la expresión de genes implicados en la ruta glicolítica, ciclo de TCA o cadena respiratoria, o genes que regulan la expresión de estos genes, o genes implicados en la captación de azúcar, además de los genes de enzimas de biosíntesis de L-treonina. Los ejemplos de estos genes que son eficaces para la producción de L-treonina incluyen el gen de transhidrogenasa (*pntAB*, patente europea n.º 733712), gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*pepC*, documento WO95/06114), gen de fosfoenolpiruvato sintasa (*pps*, patente europea n.º 877090) y gen de piruvato carboxilasa derivado de bacteria corineforme o bacteria *Bacillus* (documento WO99/18228, publicación de patente europea n.º 1092776 A).

20 También pueden obtenerse preferiblemente bacterias productoras de L-treonina potenciando la expresión de un gen que confiere resistencia a L-treonina y/o un gen que confiere resistencia a L-homoserina, o confiriendo resistencia a L-treonina y/o resistencia a L-homoserina a la bacteria huésped. Los ejemplos de los genes que confieren la resistencia anteriormente mencionada incluyen el gen *rhtA* (Res. Microbiol. 154:123-135 (2003)), gen *rhtB* (publicación de patente europea n.º 0994190 A), gen *rhtC* (publicación de patente europea n.º 1013765 A), gen *yfiK* y gen *yeaS* (publicación de patente europea n.º 1016710 A). Los métodos a modo de ejemplo para conferir resistencia a L-treonina a una bacteria huésped incluyen los descritos en la publicación de patente europea n.º 0994190 A y el documento WO90/04636.

30 *E. coli* VKPM B-3996 (patente estadounidense n.º 5.175.107) puede mostrarse a modo de ejemplo como bacteria productora de L-treonina. La cepa VKPM B-3996 se presentó el 19 de noviembre de 1987 en la colección nacional rusa de microorganismos industriales (VKPM), GNII Genetika (Rusia, 117545 Moscow 1, Dorozhny proezd, 1) con el número de registro VKPM B-3996. La cepa VKPM B-3996 contiene el plásmido pVIC40 (documento WO90/04636) que se obtuvo insertando los genes de biosíntesis de treonina (operón de treonina, *thrABC*) en un vector de plásmido de amplio espectro de huéspedes pAYC32 que contiene el marcador de resistencia a estreptomicina (Chistorerdov, A.Y., y Tsygankov, Y.D., Plasmid, 16, 161-167 (1986)). En pVIC40, aspartocinasa L-homoserina deshidrogenasa I codificada por el gen *thrA* en el operón de treonina se desensibiliza frente a la inhibición por retroalimentación mediante L-treonina.

40 *E. coli* VKPM B-5318 (véase la patente europea n.º 0593792) también puede mostrarse a modo de ejemplo como bacteria productora de L-treonina preferida. La cepa VKPM B-5318 se depositó en la colección nacional rusa de microorganismos industriales (VKPM) GNII Genetika el 3 de mayo de 1990 con un número de registro de VKPM B-5318. La cepa VKPM B-5318 es protótrofa con respecto a L-isoleucina, y alberga un ADN de plásmido recombinante construido de modo que el operón de treonina, es decir, los genes de biosíntesis de treonina, deficiente en la región de atenuador, que es una región de regulación de la transcripción originalmente contenida, está ubicado en el sentido de 3' desde el represor de C1 sensible a la temperatura derivado de fago λ , el promotor de PR y el gen que codifica para la parte N-terminal de proteína Cro, y la expresión de los genes de biosíntesis de treonina se regula mediante el represor y el promotor derivados de fago λ .

(Bacterias productoras de L-arginina)

50 Los ejemplos de bacterias productoras de L-arginina y cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-arginina incluyen, pero no se limitan a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tales como cepa 237 de *E. coli* (VKPM B-7925) (solicitud publicada de patente estadounidense n.º 2002/058315 A1) y sus cepas derivadas que albergan N-acetilglutamato sintasa mutante (solicitud de patente rusa n.º 2001112869), cepa 382 de *E. coli* (VKPM B-7926) (documento EP 1170358 A1) y una cepa productora de arginina transformada con el gen *argA* que codifica para N-acetilglutamato sintetasa (documento EP 1170361 A1).

55 Los ejemplos de bacterias productoras de L-arginina y cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-arginina también incluyen cepas en las que se potencia la expresión de uno o más genes que codifican para una enzima de biosíntesis de L-arginina. Los ejemplos de tales genes incluyen el gen de N-acetilglutamato fosfato reductasa (*argC*), gen de ornitina acetil transferasa (*argJ*), gen de N-acetilglutamato cinasa (*argB*), gen de acetilornitina transaminasa (*argD*), gen de ornitina carbamoil transferasa (*argF*), gen de ácido argininosuccínico sintetasa (*argG*), gen de ácido argininosuccínico liasa (*argH*) y gen de carbamoil fosfato sintetasa (*carAB*).

65 Los ejemplos de bacterias corineformes que tienen la capacidad de producción de L-arginina incluyen, pero no se limitan a, cepas de tipo natural de bacterias corineformes; bacterias corineformes resistentes a determinados agentes incluyendo fármacos de sulfá, 2-tiazolalanina, ácido α -amino- β -hidroxivalérico y así sucesivamente;

bacterias corineformes que muestran auxotrofia de L-histidina, L-prolina, L-treonina, L-isoleucina, L-metionina o L-triptófano además de la resistencia a 2-tiazolalanina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 54-44096); bacterias corineformes resistentes a ácido cetomalónico, ácido fluoromalónico o ácido monofluoroacético (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-18989); bacterias corineformes resistentes a arginina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-24075); bacterias corineformes resistentes a X-guanidina (X representa un derivado de ácido graso o cadena alifática, solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2-186995) y así sucesivamente. La bacteria corineforme deficiente en el represor de L-arginina (solicitud publicada de patente estadounidense n.º 20020045233) y la bacteria corineforme cuya actividad glutamato deshidrogenasa se aumenta (publicación de patente europea n.º 1057893 A) también son cepas adecuadas para la producción de L-arginina.

Específicamente, pueden mostrarse a modo de ejemplo las siguientes cepas: *Brevibacterium flavum* AJ11169 (BP-6892), *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 (FERM BP-6906), *Brevibacterium flavum* AJ11336 (FERM BP-6893), *Brevibacterium flavum* AJ11345 (FERM BP-6894) y *Brevibacterium lactofermentum* AJ12430 (FERM BP-2228). Las cepas AJ11169 y AJ12092 son las cepas resistentes a 2-tiazolalanina descritas en la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 54-44096, la cepa AJ11336 es la cepa resistente a arginina y sulfadiazina descrita en la publicación de patente japonesa n.º 62-24075, la cepa AJ11345 es la cepa que es resistente a arginina, 2-tiazolalanina y sulfaguanidina, y muestra auxotrofia de histidina descrita en la publicación de patente japonesa n.º 62-24075, y la cepa AJ12430 es la cepa resistente a octilguanidina y 2-tiazolalanina descrita en la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2-186995.

Corynebacterium glutamicum AJ12092 (FERM BP-6906) se presentó el 29 de septiembre de 1983 en el instituto nacional de biociencia y tecnología humana, agencia de ciencia industrial y tecnología (actualmente una agencia administrativa independiente, instituto nacional de tecnología y evaluación, depositario de organismos de patentes internacionales, habitación n.º 120, 2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) con el número de registro de FERM P-7273, y el depósito original se convirtió en un depósito internacional basándose en el tratado de Budapest el 1 de octubre de 1999, y se le asignó un número de registro de FERM BP-6906.

Los ejemplos de bacterias *Escherichia* que tienen capacidad de producción de L-arginina incluyen *Escherichia coli* en la que se introduce el gen *argA* (véase la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-5693), y la cepa 237 de *Escherichia coli*, que es un derivado productor de L-arginina de cepa mutante que usa ácido acético (solicitud de patente rusa n.º 2000117677). La cepa 237 se depositó en la colección nacional rusa de microorganismos industriales (VKPM) GNII Genetika con el número de registro VKPM B-7925 desde el 10 de abril de 2000, y el depósito original se convirtió en un depósito internacional basándose en el tratado de Budapest, el 18 de mayo de 2001. También puede usarse la cepa 382 de *Escherichia coli* que tiene una mutación para resistencia a la inhibición por retroalimentación mediante L-arginina, que es un derivado de la cepa 237 (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2002-017342). La cepa 382 de *Escherichia coli* se depositó en la colección nacional rusa de microorganismos industriales con un número de VKPM B-7926 el 10 de abril de 2000, y el depósito se convirtió en un depósito internacional basándose en el tratado de Budapest el 18 de mayo de 2001.

Los ejemplos de bacterias *Serratia* que tienen capacidad de producción de L-arginina incluyen *Serratia marcescens* deficiente en capacidad para descomponer L-arginina, y que muestra resistencia a antagonistas de arginina y canavanina y autotrofia para lisina (véase la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 52-8729).

(Bacterias productoras de L-histidina)

Los ejemplos de cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-histidina incluyen, pero no se limitan a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tales como cepa 24 de *E. coli* (VKPM B-5945, documento RU2003677), cepa 80 de *E. coli* (VKPM B-7270, documento RU2119536), *E. coli* NRRL B-12116 a B-12121 (patente estadounidense n.º 4.388.405), *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675), *E. coli* H-9343 (FERM BP-6676) (patente estadounidense n.º 6.344.347), *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (documento EP 1085087) y *E. coli* AI80/pFM201 (patente estadounidense n.º 6.258.554).

Los ejemplos de cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-histidina también incluyen cepas en las que se potencia la expresión de uno o más genes que codifican para enzimas de biosíntesis de L-histidina. Los ejemplos de tales genes incluyen el gen de ATP fosforibosiltransferasa (*hisG*), gen de fosforibosil AMP ciclohidrolasa (*hisI*), gen de fosforibosil-ATP pirofosfodihidrolasa (*hisE*), gen de fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribótido isomerasa (*hisA*), gen de amidotransferasa (*hisH*), gen de histidinol fosfato aminotransferasa (*hisC*), gen de histidinol fosfatasa (*hisB*), gen de histidinol deshidrogenasa (*hisD*) y así sucesivamente.

Se sabe que las enzimas de biosíntesis de L-histidina codificadas por *hisG* e *hisBHAFI* se inhiben mediante L-histidina, y por tanto la capacidad para producir L-histidina también puede potenciarse eficazmente introduciendo una mutación que confiere resistencia a la inhibición por retroalimentación en el gen que codifica para ATP fosforibosiltransferasa (*hisG*) (patentes rusas n.ºs 2003677 y 2119536).

Los ejemplos específicos de cepas que tienen capacidad de producción de L-histidina incluyen *E. coli* FERM-P 5038 y 5048 que se han transformado con un vector que porta un ADN que codifica para una enzima de biosíntesis de L-histidina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-005099), cepas de *E. coli* transformadas con un gen que codifica para una proteína implicada en la exportación de aminoácidos (documento EP 1016710 A), cepa 80 de *E. coli* que es resistente a sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina y estreptomycin (VKPM B-7270, patente rusa n.º 2119536) y así sucesivamente.

(Bacterias productoras de L-cisteína)

Los ejemplos de cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-cisteína incluyen, pero no se limitan a, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como *E. coli* JM15 que se transforma con diferentes alelos de *cysE* que codifican para serina acetiltransferasas resistentes a retroalimentación (patente estadounidense n.º 6.218.168, solicitud de patente rusa n.º 2003121601), *E. coli* W3110 con genes sobreexpresados que codifican para proteínas que fomentan la excreción de sustancias tóxicas para células (patente estadounidense n.º 5.972.663), cepas de *E. coli* con actividad cisteína desulfhidrasa reducida (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 11-155571), *E. coli* W3110 con actividad aumentada de un regulador de la transcripción positivo para regulón de cisteína codificado por el gen *cysB* (documento WO01/27307A1) y así sucesivamente.

(Bacterias productoras de L-serina)

Los ejemplos de cepas originales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-serina incluyen bacterias corineformes en las que se amplifica el gen de fosfoserina fosfatasa (solicitudes de patente japonesa abiertas a consulta por el público n.ºs 2001-275689 y 11-253187), bacterias corineformes que tienen D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada frente a la inhibición, que derivan de bacterias corineformes que tienen capacidad de producción de L-serina y resistentes a azaserina o β -(2-tienil)-DL-alanina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 11-266881), y bacterias corineformes productoras de serina resistentes a azaserina o tienilalanina, y deficientes en capacidad de descomposición de serina (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 10-248588).

A continuación se mostrarán a modo de ejemplo métodos para conferir capacidad de producción de ácidos nucleicos a un microorganismo y bacterias productoras de ácidos nucleicos.

Puede obtenerse un microorganismo que tiene una capacidad para producir un ácido nucleico confiriendo, por ejemplo, auxotrofia de nucleósido de purina o resistencia a un fármaco tal como análogo de purina a bacterias tal como se describieron anteriormente (véanse las publicaciones de patente japonesa n.ºs 38-23099, 54-17033, 55-45199, 57-14160, 57-41915 y 59-42895). Por ejemplo, puede obtenerse una bacteria *Bacillus* que tiene auxotrofia o resistencia a fármacos mediante un tratamiento con un mutágeno que se usa para tratamiento de mutagénesis habitual tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o metanosulfonato de etilo (EMS).

Los ejemplos de bacterias *Bacillus* que producen un nucleósido de purina incluyen los siguientes.

Como ejemplo específico de cepa productora de inosina perteneciente al género *Bacillus*, puede usarse la cepa KMBS16 de *Bacillus subtilis*. Esta cepa deriva de la cepa trpC2 de *Bacillus subtilis* conocida (168 Marburg), en la que se alteran el gen *purR* que codifica para el represor de operón de purina (*purR::spc*), el gen *purA* que codifica para succinil-AMP sintasa (*purA::erm*), y el gen *deoD* que codifica para nucleósido de purina fosforilasa (*deoD::kan*) (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2004-242610, solicitud publicada de patente estadounidense n.º 2004166575 A1). También puede usarse la cepa AJ3772 de *Bacillus subtilis* (FERM P-2555, solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-014794) y así sucesivamente.

Los ejemplos de bacterias *Bacillus* que tienen una capacidad para producir guanosina incluyen la bacteria *Bacillus* que tiene actividad IMP deshidrogenasa aumentada (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 3-58787), bacteria *Bacillus* obtenida introduciendo un vector que incluye un gen que confiere resistencia a análogos de purina o decoyinina en un mutante auxótrofo para adenina (publicación de patente japonesa n.º 4-28357) y así sucesivamente.

Los ejemplos de bacterias *Bacillus* que producen un nucleótido de purina incluyen los siguientes.

Como bacterias *Bacillus* productoras de ácido inosínico, se han notificado cepas de *Bacillus subtilis* productoras de inosina que tienen actividad fosfatasa atenuada (Uchida, K. *et al.*, Agr. Biol. Chem., 1961, 25, 804-805; Fujimoto, M., Uchida, K., Agr. Biol. Chem., 1965, 29, 249-259). Los ejemplos de bacteria productoras de ácido guanílico incluyen mutantes de bacterias *Bacillus* que tienen auxotrofia de adenina, resistencia a decoyinina o sulfóxido de metionina y una capacidad para producir 5'-ácido guanílico (guanosina-5'-monofosfato, también denominado a continuación en el presente documento "GMP") (publicación de patente japonesa n.º 56-12438).

Además, puede construirse una bacteria productora de ácido xantílico mediante el método usado para cultivar

bacterias corineformes, un ejemplo típico de las cuales es *Corynebacterium ammoniagenes*. Por ejemplo, obteniendo una cepa con PRPP amidotransferasa potenciada (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 8-168383), una cepa resistente a aminoácidos alifáticos (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 4-262790) o una cepa resistente a deshidroprolina (publicación sin examinar de patente de Corea del Sur n.º 2003-56490), puede construirse una bacteria productora de ácido xantílico.

Además, los métodos a modo de ejemplo para cultivar bacterias *Bacillus* que tienen una capacidad para producir una sustancia derivada de purina también incluyen potenciar la actividad de una enzima que está implicada en la biosíntesis de purina que es común a la biosíntesis de nucleósidos de purina y nucleótidos de purina, es decir, enzima de biosíntesis de purina, en células bacterianas.

Los ejemplos de la enzima implicada en la biosíntesis de purina incluyen, por ejemplo, fosforibosil pirofosfato amidotransferasa, fosforibosil pirofosfato sintetasa (PRPP sintetasa [EC: 2.7.6.1]) y así sucesivamente.

Algunos de los catabolitos producidos mediante metabolismo de fuentes de azúcar tales como glucosa que fluyen a la ruta de fosfato de pentosa se convierten en ribosa-5-fosfato mediante ribulosa-5-fosfato. A partir del ribosa-5-fosfato biosintetizado, se produce pirofosfato de fosforibosilo (PRPP), que es un precursor indispensable para las biosíntesis de nucleósido de purina, histidina y triptófano. Específicamente, se convierte ribosa-5-fosfato en PRPP mediante fosforibosil pirofosfato sintetasa. Por tanto, puede conferirse una capacidad para producir sustancia derivada de purina a una bacteria *Bacillus* o puede potenciarse la capacidad de la bacteria modificando la bacteria de modo que se aumenta la actividad de fosforibosil pirofosfato sintetasa de la misma.

La actividad de la fosforibosil pirofosfato sintetasa puede medirse, por ejemplo, mediante el método de Switzer *et al.* (Methods Enzymol., 1978, 51, 3-11) o el método de Roth *et al.* (Methods Enzymol., 1978, 51, 12-17). Puede producirse una bacteria *Bacillus* en la que se aumenta la actividad de fosforibosil pirofosfato sintetasa, por ejemplo, aumentando la expresión de un gen que codifica para la fosforibosil pirofosfato sintetasa en una bacteria *Bacillus* según un método de usar un plásmido o integrar el gen en un cromosoma, lo cual puede realizarse de la misma manera que la del método descrito en la solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2004-242610.

Por otro lado, cuando se produce PRPP, que es un precursor indispensable para la biosíntesis de nucleósido de purina, histidina y triptófano, parte del mismo se convierte en nucleótidos de purina y nucleósidos de purina mediante las enzimas implicadas en la biosíntesis de purina. Los ejemplos de genes que codifican para tales enzimas incluyen los genes del operón de purina de *Bacillus subtilis*, específicamente, genes del operón *purEKB-purC(orf)QLF-purMNH(J)-purD* (Ebbole D.J. y Zalquin H., J. Biol. Chem., 1987, 262, 17, 8274-87) (también llamado en la actualidad *purEKBCSQLFMNHD*, *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives, editor jefe: A.L. Sonenshein, ASM Press, Washington D.C., 2002, n.º de registro de GenBank NC_000964), y los genes del regulón de *pur* de *Escherichia coli* (*Escherichia* and *Salmonella*, segunda edición, editor jefe: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

Por consiguiente, potenciando la expresión de estos genes, también puede conferirse o potenciarse una capacidad para producir una sustancia derivada de purina. Además, los genes del operón de purina que pueden usarse para la presente invención no se limitan a estos, y también pueden usarse genes derivados de otros microorganismos, animales y plantas.

Los ejemplos del método para aumentar la expresión del operón de purina incluyen aumentar la expresión de genes del operón de purina en una bacteria *Bacillus* mediante un método de usar un plásmido, integrar los genes en un cromosoma o similares.

El segundo método para aumentar la expresión del operón de purina incluye sustituir un promotor nativo del operón de purina por un promotor más fuerte, y sustituir la región -35 o -10 del promotor nativo por una secuencia consenso.

Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* (cepa 168 Marburg de *B. subtilis*, ATCC 6051), la secuencia -35 del operón de purina es una secuencia consenso (TTGACA), pero la secuencia -10 es TAAGAT, lo cual difiere de la secuencia consenso TATAAT (Ebbole, D.J. y H. Zaliqu, J. Biol. Chem., 1987, 262, 8274-8287). Por tanto, sustituyendo la secuencia -10 (TAAGAT) por una secuencia consenso, o aproximando la secuencia -10 (TAAGAT) cerca de la secuencia consenso, puede cambiarse por TATAAT, TATGAT o TAAAAT, y de ese modo puede aumentarse la actividad de transcripción del operón de purina. Una secuencia de promotor puede sustituirse mediante el mismo método que el de la sustitución génica, que se describe a continuación.

El tercer método para aumentar la expresión del operón de purina incluye reducir la cantidad de expresión del represor de operón de purina (patente estadounidense n.º 6.284.495).

La cantidad de expresión del represor de operón de purina (represor de purina) puede reducirse, por ejemplo, mediante un método de tratar una bacteria *Bacillus* con irradiación de rayos ultravioleta o un mutágeno usado en un tratamiento de mutagénesis habitual tal como NTG o EMS y seleccionar un mutante que muestra una expresión reducida del represor de purina.

Además, también puede obtenerse una bacteria *Bacillus* con expresión reducida del represor de purina, por ejemplo, además de mediante un tratamiento de mutagénesis, sustituyendo un gen que codifica para el represor de purina en un cromosoma (*purR*, registro de GenBank NC_000964) por un gen correspondiente que no funciona normalmente (también denominado a continuación en el presente documento "gen de tipo alterado") mediante recombinación homóloga usando una técnica de recombinación génica (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1972); Matsuyama, S. y Mizushima, S., J. Bacteriol., 1985, 162, 1196-1202).

Además, también puede potenciarse una capacidad para producir una sustancia derivada de purina atenuando la captación de sustancias derivadas de purina al interior de células. Por ejemplo, la captación de nucleósidos de purina mediante las células puede atenuarse bloqueando una reacción implicada en la captación de nucleósidos de purina mediante las células. Los ejemplos de la reacción implicada en la captación de nucleósidos de purina mediante las células incluyen reacciones catalizadas por nucleósido permeasas.

Además, cuando se produce un nucleósido de purina, puede reducirse la actividad de una enzima que descompone sustancias derivadas de purina con el fin de potenciar la capacidad para producir el nucleósido de purina. Los ejemplos de una enzima de este tipo incluyen nucleósido de purina fosforilasa.

Los nucleótidos de purina biosintetizados a partir de PRPP mediante enzimas implicadas en la biosíntesis de purina se desfosforilan y de ese modo se convierten en un nucleósido de purina. Para provocar de manera eficiente la acumulación de un nucleósido de purina, es preferible reducir las actividades de nucleósido de purina fosforilasas, que degradan adicionalmente nucleósidos de purina para dar hipoxantina o similar. Es decir, es preferible atenuar o eliminar la actividad de una nucleósido de purina fosforilasa que emplea nucleósidos de purina tales como inosina como sustrato.

Específicamente, la actividad nucleósido de purina fosforilasa puede reducirse alterando los genes *deoD* y *pupG* que codifican para nucleósido de purina fosforilasa en bacterias *Bacillus*. La bacteria *Bacillus* usada en la presente invención puede modificarse alterando uno o ambos de los genes *deoD* y *pupG*. Como genes *deoD* y *pupG*, por ejemplo, pueden usarse los genes derivados de bacterias *Bacillus* (*deoD*; registro de Genbank n.º NC_000964, *pupG*; registro de Genbank n.º NC_000964).

La capacidad para producir una sustancia derivada de purina también puede potenciarse reduciendo la actividad de succinil-AMP sintasa. Los ejemplos del gen que codifica para succinil-AMP sintasa incluyen el gen *purA*. Los ejemplos del gen *purA* incluyen, por ejemplo, los que tienen la secuencia de nucleótidos registrada como registro de Genbank n.º NC_000964 (la región codificante corresponde a los números de nucleótido 4153460 a 4155749 de la cadena complementaria).

La capacidad para producir una sustancia derivada de purina también puede potenciarse reduciendo la actividad de inosina monofosfato (IMP) deshidrogenasa. Los ejemplos del gen que codifica para IMP deshidrogenasa incluyen el gen *guaB*. Los ejemplos del gen *guaB* incluyen, por ejemplo, los que tienen la secuencia de nucleótidos registrada como registro de Genbank n.º NC_000964 (la región codificante corresponde a los números de nucleótido 15913 a 17376).

Además, como método para potenciar una capacidad para producir sustancia derivada de purina, puede contemplarse la amplificación de un gen que codifica para una proteína que tiene una actividad de excreción de una sustancia derivada de purina. Un ejemplo de una bacteria en la que se ha amplificado un gen de este tipo es una bacteria *Bacillus* en la que se amplifica el gen *rhtA* (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2003-219876).

Ejemplos más específicos del microorganismo que puede usarse para la presente invención incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli* AJ11442 (NRRL B-12185, FERM BP-1543, véase la patente estadounidense n.º 4.346.170), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3990 (ATCC 31269, véase la patente estadounidense n.º 4.066.501), etc., para L-lisina como sustancia objetivo, *Escherichia coli* VKPM B-3996 (RIA1867, VKPM B-3996, véase la patente estadounidense n.º 5.175.107), *Corynebacterium acetoacidophilum* AJ12318 (FERM BP-1172) (véase la patente estadounidense n.º 5.188.949), etc., para L-treonina, *Escherichia coli* AJ12604 (FERM BP-3579, véase la publicación de patente europea n.º 488.424 A), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12637 (FERM BP-4160, véase la solicitud de patente francesa abierta a consulta por el público n.º 2.686.898), etc., para L-fenilalanina, *Escherichia coli* AJ12624 (FERM BP-3853, véase la solicitud de patente francesa abierta a consulta por el público n.º 2.680.178), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12475 (FERM BP-2922, véase la patente estadounidense n.º 5.272.067), etc., para ácido L-glutámico, *Escherichia coli* AJ11478 (FERM P-5274, véase la publicación de patente japonesa n.º 62-34397), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3718 (FERM P-2516, véase la patente estadounidense n.º 3.970.519), etc., para L-leucina, *Escherichia coli* KX141 (VKPM B-4781, véase la publicación de patente europea n.º 519.113 A), *Brevibacterium flavum* AJ12149 (FERM BP-759, véase la patente estadounidense n.º 4.656.135), etc., para L-iso-leucina, *Escherichia coli* VL1970 (VKPM B-4411, véase la publicación de patente europea n.º 519.113 A), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12341 (FERM BP-1763, véase la patente estadounidense n.º 5.188.948), etc., para L-valina, y *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 (FERM BP-6906) para L-arginina.

La producción de una sustancia objetivo usando la presente invención puede lograrse controlando la concentración de amoníaco para que esté dentro de un determinado intervalo de concentración durante al menos un periodo requerido, es decir, al menos parte de un periodo, dentro del procedimiento de cultivo completo durante la fermentación.

El periodo requerido dentro del procedimiento de cultivo completo durante la fermentación significa un periodo en el que se realiza el cultivo controlándose la concentración de amoníaco a una determinada concentración. Se prefiere controlar durante el periodo en el que se realiza la producción de la sustancia. Por ejemplo, cuando el método de la presente invención incluye una etapa para hacer proliferar un microorganismo que tiene una capacidad para producir la sustancia (fase de proliferación) y una etapa para producir la sustancia (fase de producción de sustancia), la concentración de amoníaco puede controlarse a una determinada concentración en la fase de producción de sustancia, y la concentración de amoníaco puede controlarse o no a una determinada concentración en la fase de proliferación para hacer proliferar el microorganismo.

La "fase de proliferación" significa la etapa en la que se usa principalmente la fuente de carbono para el crecimiento celular, es decir, la etapa en la que el microorganismo está proliferando de manera logarítmica, que puede ser un periodo dentro del plazo de 3 horas, preferiblemente 6 horas, más preferiblemente 10 horas desde el comienzo del cultivo. La "fase de producción de sustancia" significa la etapa en la que se usa principalmente la fuente de carbono para la producción de sustancia, que puede ser un periodo tras 3 horas, preferiblemente tras 6 horas, más preferiblemente tras 10 horas desde el comienzo del cultivo.

El intervalo de concentración determinado puede usarse tanto para el método de realizar el cultivo controlando la concentración de amoníaco para que esté dentro de un determinado intervalo, como para el método de realizar el cultivo controlando la concentración de amoníaco para que no sea superior a una determinada concentración.

La presente invención puede aplicarse a un método de cultivo en el que iones bicarbonato y/o iones carbonato sirven como contraiones de aminoácidos (a continuación en el presente documento, puede describirse como fermentación de carbonato). Cuando se produce un aminoácido básico tal como L-lisina, la producción puede realizarse mediante un método en el que se realiza la fermentación controlando la presión en el tanque de fermentación para que sea positiva durante la fermentación, o suministrando gas dióxido de carbono o un gas mixto que contiene gas dióxido de carbono al medio para proporcionar un periodo de cultivo en el que el medio contiene 20 mM o más de iones bicarbonato y/o iones carbonato, de modo que estos iones bicarbonato y/o iones carbonato sirven como contraiones de cationes que comprenden principalmente el aminoácido básico, y después se recoge el aminoácido básico objetivo (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2002-65287, solicitud publicada de patente estadounidense n.º 2002/0025564, documento EP 1813677 A).

El periodo requerido dentro del procedimiento de cultivo completo durante la fermentación en el método de cultivo en el que iones bicarbonato y/o iones carbonato sirven como contraiones de un aminoácido básico y recogida del aminoácido básico objetivo no está particularmente limitado siempre que se logre la productividad deseada, pero, específicamente, por ejemplo, puede ser de no menos de una décima parte, preferiblemente no menos de una quinta parte, del procedimiento de cultivo completo durante la fermentación principal. Más específicamente, puede incluir un periodo en el que aumenta el pH del medio debido a la escasez de contraiones tales como iones sulfato y cloruro usados en el medio mientras se acumula la sustancia básica objetivo.

En la fermentación de carbonato, puede controlarse la presión en el tanque de fermentación para que sea positiva durante la fermentación y/o puede suministrarse al medio gas dióxido de carbono o un gas mixto que contiene gas dióxido de carbono. Ambas de las operaciones anteriores se realizan preferiblemente de modo que hay un periodo de cultivo en el que está presente en el medio preferiblemente 20 mM o más, más preferiblemente 30 mM o más, de manera particularmente preferible 40 mM o más, de iones bicarbonato y/o iones carbonato. La presión interna del tanque de fermentación, la cantidad de suministro de gas dióxido de carbono o gas mixto que contiene gas dióxido de carbono, o el volumen de suministro de gas limitado pueden determinarse, por ejemplo, midiendo iones bicarbonato o iones carbonato en el medio, o el pH o la concentración de amoníaco del medio.

Según la fermentación de carbonato, es posible suprimir el pH del medio bajo de modo que la cantidad de iones bicarbonato y/o iones carbonato presentes en el medio requeridos como contraiones es menor que la usada en los métodos convencionales. Cuando se controla el pH con amoníaco, se suministra amoníaco con el fin de aumentar el pH, y puede servir como fuente de nitrógeno para el aminoácido básico. Los ejemplos de cationes distintos del aminoácido básico en el medio incluyen K, Na, Mg, Ca, etc., que se originan en componentes del medio. Estos existen preferiblemente en una cantidad del 10% o menos, preferiblemente el 5% o menos, más preferiblemente el 2% o menos de los cationes totales.

Además, la presión interna del tanque de fermentación durante la fermentación puede volverse positiva, por ejemplo, haciendo que la presión de suministro de gas sea superior a la presión de escape. Haciendo que la presión interna del tanque de fermentación sea positiva, el gas dióxido de carbono generado mediante fermentación se disuelve en el medio de cultivo para generar iones bicarbonato o iones carbonato, y estos pueden servir como contraiones del

aminoácido básico. La presión interna del tanque de fermentación es, específicamente, de 0,03 a 0,2 MPa, preferiblemente de 0,05 a 0,15 MPa, más preferiblemente de 0,1 a 0,3 MPa, en cuanto a la presión relativa (diferencia de presión con respecto a la presión atmosférica). Además, suministrando gas dióxido de carbono o un gas mixto que contiene gas dióxido de carbono al medio de cultivo, puede disolverse gas dióxido de carbono en el medio. Además, cuando se suministra gas dióxido de carbono o un gas mixto que contiene dióxido de carbono al medio, la presión interna del tanque de fermentación puede ajustarse para que sea positiva.

La presión interna del tanque de fermentación puede ajustarse para que sea positiva, por ejemplo, haciendo que la presión de suministro de gas sea superior a la presión de escape. Específicamente, se prefiere cultivar ajustando la presión parcial de oxígeno superior a la de dióxido de carbono. Además, cuando se suministra gas dióxido de carbono al medio, por ejemplo, puede burbujearse dióxido de carbono puro o un gas mixto que contiene el 5% en volumen o más de dióxido de carbono en el medio.

Los métodos anteriormente mencionados para disolver iones bicarbonato y/o iones carbonato en el medio pueden usarse de manera individual, o pueden usarse dos o más de los mismos en combinación.

En los métodos convencionales, habitualmente se añade una cantidad suficiente de sulfato de amonio o cloruro de amonio al medio para servir como contraaniones del aminoácido básico que va a producirse, y también se añaden productos de descomposición de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico de proteínas, etc., al medio como componente de nutriente. Por tanto, los iones sulfato e iones cloruro generados a partir de los mismos están presentes en el medio. Por tanto, la concentración de los iones carbonato levemente ácidos es extremadamente baja durante el cultivo, tal como del orden de ppm. La realización anterior de la presente invención se caracteriza porque se reducen estos iones sulfato e iones cloruro, y el gas dióxido de carbono liberado por el microorganismo durante la fermentación se disuelve en el medio en el entorno de fermentación anteriormente mencionado y se usa como contraiones. Por tanto, en la realización anterior de la presente invención, no se requiere añadir iones sulfato o iones cloruro al medio en una cantidad mayor que la cantidad requerida para el crecimiento. Se prefiere que se añada una cantidad apropiada de sulfato de amonio o similar al medio en una etapa inicial del cultivo, y la adición se termine a la mitad del cultivo. Alternativamente, puede alimentarse sulfato de amonio o similar mientras se mantiene el equilibrio con los iones carbonato o iones bicarbonato disueltos en el medio. Además, como fuente de nitrógeno del aminoácido básico, puede alimentarse amoniaco al medio. Puede suministrarse amoniaco al medio de manera individual o junto con otros gases.

Se prefieren más concentraciones inferiores de aniones distintos de iones bicarbonato y/o iones carbonato en el medio siempre que estén presentes en cantidades que se requieran para el crecimiento del microorganismo. Los ejemplos de tales aniones incluyen iones cloruro, iones sulfato, iones fosfato, ácidos orgánicos ionizados, iones hidróxido y así sucesivamente. Habitualmente la concentración molar total de estos otros iones es preferiblemente de 900 mM o inferior, más preferiblemente 700 mM o inferior, todavía más preferiblemente 500 mM o inferior, de manera adicionalmente preferible 300 mM o inferior, de manera particularmente preferible 200 mM o inferior.

Reducir las cantidades de iones sulfato y/o iones cloruro que van a usarse es uno de los objetivos de la realización anterior de la presente invención, y la cantidad total de iones sulfato o iones cloruro o ambos contenidos en el medio es habitualmente de 700 mM o inferior, preferiblemente 500 mM o inferior, más preferiblemente 300 mM o inferior, todavía más preferiblemente 200 mM o inferior, de manera particularmente preferible 100 mM o inferior.

Si se añade sulfato de amonio a un medio como fuente de contraiones de un aminoácido básico, habitualmente se elimina el gas dióxido de carbono en el medio de cultivo mediante iones sulfato. Sin embargo, en la realización anterior de la presente invención, no es necesario añadir una cantidad en exceso de sulfato de amonio al medio, y por tanto puede disolverse fácilmente gas dióxido de carbono en el medio de fermentación.

Además, en la realización anterior de la presente invención, es preferible controlar la concentración de amoniaco total en el medio hasta tal punto que "no se inhibe la producción del aminoácido básico". Los ejemplos de las condiciones para lograr un fin de este tipo incluyen, por ejemplo, aquellas para proporcionar un rendimiento y/o productividad de preferiblemente el 50% o más, más preferiblemente el 70% o más, de manera particularmente preferible el 90% o más, del rendimiento y/o la productividad obtenidos en condiciones óptimas. Específicamente, la concentración de amoniaco total en el medio es, por ejemplo, de 300 mM o inferior, 250 mM o inferior, 200 mM o inferior, 100 mM o inferior, o 50 mM o inferior. El grado de disociación del amoniaco disminuye a medida que el pH se vuelve superior. El amoniaco no ionizado es más tóxico para bacterias que los iones amonio. Por tanto, el límite superior de la concentración de amoniaco total debe determinarse dependiendo del pH del medio de cultivo. Es decir, a medida que aumenta el pH del medio de cultivo, la concentración de amoniaco total aceptable disminuye. Por tanto, la concentración de amoniaco total anteriormente mencionada "que no inhibe la producción de aminoácido básico" se determina preferiblemente para cada valor de pH específico. Sin embargo, el intervalo de concentración de amoniaco total que es aceptable al nivel de pH más alto durante el cultivo puede usarse como límite superior de la concentración de amoniaco total a lo largo de todo el periodo de cultivo.

Por otro lado, la concentración de amoniaco total que funciona como fuente de nitrógeno requerida para el crecimiento del microorganismo y la producción de la sustancia básica no está particularmente limitada, y puede

determinarse de manera apropiada, siempre que un nivel reducido de la fuente de nitrógeno que puede dar como resultado el agotamiento continuo de amoníaco durante el cultivo no reduzca la productividad de la sustancia objetivo por el microorganismo. Por ejemplo, la concentración de amoníaco puede medirse a lo largo del tiempo durante el cultivo, y, si se agota el amoníaco en el medio, puede añadirse una pequeña cantidad de amoníaco al medio. Aunque la concentración de amoníaco total tras la adición de amoníaco no está particularmente limitada, la concentración de amoníaco total puede ser, por ejemplo, preferiblemente de 1 mM o superior, más preferiblemente 10 mM o superior, de manera particularmente preferible 20 mM o superior.

Además, en la fermentación de ácido L-glutámico, el cultivo puede realizarse con precipitación de ácido L-glutámico en el medio usando un medio líquido ajustado para tener una condición en la que precipita ácido L-glutámico. La condición en la que precipita ácido L-glutámico es, por ejemplo, pH de 5,0 a 4,0, preferiblemente pH de 4,5 a 4,0, más preferiblemente pH de 4,3 a 4,0, de manera particularmente preferible pH 4,0 (publicación de patente europea n.º 1078989 A).

[Ejemplo]

Producción de L-arginina usando el aparato de la presente invención

Este ejemplo muestra un ejemplo de aplicación del cultivo con control de amoníaco usando el aparato de la presente invención para la producción de L-arginina mediante una bacteria corineforme. Como cepa productora de L-arginina, se usó *Corynebacterium glutamicum* AJ12092 (FERM BP-6906).

El aparato de la presente invención usado en este ejemplo tenía la configuración descrita a continuación.

Sensor 10 de amoníaco:

El sensor 10 de amoníaco comprende un sensor de tipo de electrodo interno que usa una membrana permeable a amoníaco, y muestra un cambio de tensión en respuesta a amoníaco no ionizado. Se insertó en el tanque 200 de cultivo.

Aparato 100 de control de amoníaco:

Se usó un ordenador que tenía la parte 106 de almacenamiento, la parte 103 de control, la parte 108 de entrada de señal conectada con el sensor 10 de amoníaco, y la parte 104 de salida de control conectada al dispositivo 300 de alimentación de amoníaco. La parte 106 de almacenamiento almacena una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoníaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo y la tensión medida con el sensor 10 de amoníaco. La parte 102 de control realiza la etapa de cálculo de concentración de amoníaco de medir la tensión con el sensor 10 de amoníaco, y calcular la concentración de amoníaco no ionizado en el tanque 200 de cultivo a partir de la tensión usando la curva de calibración, y la etapa de instrucción de suministro de amoníaco de instruir, cuando la concentración de amoníaco no ionizado calculada es inferior a una concentración de control establecida, al dispositivo 300 de alimentación de amoníaco para que suministre amoníaco al tanque 200 de cultivo.

Dispositivo 300 de alimentación de amoníaco:

El dispositivo 300 de alimentación de amoníaco tiene un recipiente que contiene una disolución acuosa de sulfato de amonio, y está dispuesto de modo que la disolución acuosa de sulfato de amonio puede añadirse gota a gota desde el recipiente hasta el tanque de cultivo con una bomba de rodillos, y añade gota a gota la disolución a una tasa de goteo establecida basándose en una señal enviada a partir del aparato 100 de control de amoníaco.

(1) Control de concentración de amoníaco en la fermentación de Arg usando el aparato de la presente invención

Se produjo L-arginina controlando la concentración de amoníaco total, que disminuye esencialmente con el avance del cultivo, para que fuera constante usando el aparato de la presente invención. En esta producción, se establecieron tres clases de condiciones de 20 mM, 100 mM y 300 mM como concentración a la que debe controlarse la concentración de amoníaco total en el medio. Se añadió gota a gota KOH 1 N a 300 ml del medio de producción de L-arginina mostrado en la tabla 1 contenido en un fermentador de jarra para ajustar el pH del medio para que fuera de 6,9. Se mezcló sulfato de amonio en el medio de producción de L-arginina de modo que la concentración de amoníaco total inicial pasó a ser de 20 mM, 100 mM o 300 mM. Se aplicó la cepa AJ12092 de *Corynebacterium glutamicum* a la superficie completa de una placa del medio de agar CM-Dex mostrado en la tabla 2, y se cultivó a 31,5°C durante 24 horas, y se inocularon las células que crecieron en el medio de agar de una placa en el fermentador de jarra. Se realizó el cultivo a una tasa de agitación de 700 rpm manteniendo la temperatura para que fuera de 31,5°C y con aireación de 300 ml/minuto de aire desinfectado con un filtro. El pH del medio, que disminuye esencialmente con el avance del cultivo, se mantuvo para que fuera de 6,9 mediante adición de KOH 6 N. Además, se añadió de manera apropiada una disolución 692 g/l esterilizada por separado de glucosa (que contenía 0,05 ml/l de antiespumante GD-113) de modo que la concentración de glucosa en el medio, que disminuye esencialmente con el avance del cultivo, se mantuvo para que fuera de aproximadamente 40 g/l. Se realizó el cultivo

durante 52 horas. Cuando la concentración de amoniaco no ionizado se volvió inferior al valor establecido, se añadió automáticamente gota a gota la disolución acuosa de sulfato de amonio mediante el aparato de la presente invención de modo que debía mantenerse la concentración de amoniaco total establecida, y de ese modo se controló la concentración de amoniaco total para que fuera constante durante el cultivo. Específicamente, se midió la concentración de amoniaco no ionizado en el medio en tiempo real con el sensor de amoniaco insertado en el fermentador de jarra, y se añadió automáticamente gota a gota una disolución acuosa de sulfato de amonio 450 g/l esterilizada por separado al medio desde el dispositivo de alimentación de amoniaco de modo que se mantuvo la concentración de amoniaco total objetivo. Como resultado, la fermentación de Arg pudo realizarse manteniendo automáticamente la concentración de amoniaco no ionizado objetivo y la concentración de amoniaco total tal como se muestra en la figura 7 de una manera sencilla usando el aparato de la presente invención. Para controlar la concentración de amoniaco total para que fuera de 20 mM, 100 mM y 300 mM, se añadió gota a gota la disolución acuosa de sulfato de amonio 450 g/l a tasas de 0,77 ml/h, 0,90 ml/h y 1,30 ml/h (tasas promedio a lo largo de todo el periodo de cultivo), respectivamente. Cuando se controló la concentración de amoniaco total para que fuera de 300 mM, se realizó verificación usando un sensor de amoniaco externo usando una muestra recogida a mitad del cultivo (8 horas) y que se volvió suficientemente alcalina para convertir el ion amonio contenido en amoniaco no disociado.

Mediante los resultados, se demostró que, en la producción de L-aminoácido mediante fermentación, puede realizarse el cultivo controlando automáticamente la concentración de amoniaco en el medio (concentración de amoniaco no ionizado y concentración de amoniaco total) para que sea constante de una manera extremadamente sencilla usando el aparato de la presente invención.

(2) Mejora en la productividad de Arg proporcionada mediante el uso del aparato de la presente invención

Después, se compararon la cantidad de producción de Arg obtenida controlando la concentración de amoniaco total usando el aparato de la presente invención y la misma obtenida controlando la concentración de amoniaco total usando un método de control manual habitual. La concentración de amoniaco total a la que debía controlarse la concentración se estableció a 300 mM. Se añadió gota a gota KOH 1 N a 300 ml del medio de producción de L-arginina mostrado en la tabla 1 contenido en un fermentador de jarra para ajustar el pH del medio para que fuera de 6,9. Se mezcló sulfato de amonio en el medio de producción de L-arginina de modo que la concentración de amoniaco inicial pasó a ser de 300 mM. Se aplicó la cepa AJ12092 de *Corynebacterium glutamicum* a la superficie completa de una placa del medio de agar CM-Dex mostrado en la tabla 2, y se cultivó a 31,5°C durante 24 horas, y se inocularon las células que crecieron en el medio de agar de una placa en el fermentador de jarra. Se realizó el cultivo a una tasa de agitación de 700 rpm manteniendo la temperatura para que fuera de 31,5°C y con aireación de 300 ml/minuto de aire desinfectado con un filtro. El pH del medio, que disminuye esencialmente con el avance del cultivo, se mantuvo para que fuera de 6,9 mediante adición de KOH 6 N. Además, se añadió de manera apropiada una disolución 692 g/l esterilizada por separado de glucosa (que contenía 0,05 ml/l de antiespumante GD-113) de modo que la concentración de glucosa en el medio, que disminuye esencialmente con el avance del cultivo, se mantuvo para que fuera de aproximadamente 40 g/l. Se realizó el cultivo durante 52 horas. Se controló la concentración de amoniaco total mediante dos clases de métodos, es decir, el método de usar el aparato de la presente invención como la manera descrita en la sección anterior, y un método de añadir manualmente 3 ml de la disolución acuosa de sulfato de amonio 450 g/l cuando la concentración de amoniaco total pasaba a ser inferior al valor establecido (valor de control). Como resultado, cuando se usó el aparato de la presente invención, la concentración de amoniaco total pudo controlarse automáticamente. Por otro lado, cuando se controló manualmente la concentración de amoniaco total, la disolución acuosa de sulfato de amonio se añadió manualmente 17 veces durante el cultivo de 52 horas. Además, tal como se muestra en la figura 8, cuando se usó el aparato de la presente invención, se acumuló arginina a una concentración superior en comparación con el caso en el que se controló manualmente la concentración de amoniaco total. Además, en cuanto a la cantidad de producción de arginina total, se produjeron 11,1 g de arginina en el caso de usar el aparato de la presente invención, mientras que se produjeron 9,5 g de arginina en el caso del control manual.

Se realizó verificación usando un sensor de amoniaco externo usando un medio de cultivo recogido a mitad del cultivo (8 horas) y que se volvió suficientemente alcalino para convertir el ion amonio contenido en amoniaco no disociado.

Mediante los resultados, se demostró que, en la producción de L-aminoácido mediante fermentación, puede realizarse el cultivo controlando automáticamente la concentración de amoniaco en el medio (concentración de amoniaco no ionizado y concentración de amoniaco total) para que sea constante de una manera extremadamente sencilla y, además, también puede mejorarse la capacidad de producción de L-aminoácidos usando el aparato de la presente invención.

[Tabla 1]

Tabla 1: medio de producción de L-arginina

	Para una concentración	Para una concentración	Para una concentración
--	------------------------	------------------------	------------------------

ES 2 761 596 T3

	de amoniaco inicial de 20 mM	de amoniaco inicial de 100 mM	de amoniaco inicial de 300 mM
Glucosa	40 g/l	40 g/l	40 g/l
Hidrolizado de proteína de soja (6,57 ml/l de hidrolizado que tienen 35 g/l de peso de nitrógeno)	0,23 g/l (en cuanto al peso de nitrógeno)	0,23 g/l (en cuanto al peso de nitrógeno)	0,23 g/l (en cuanto al peso de nitrógeno)
KH ₂ PO ₄	1,00 g/l	1,00 g/l	1,00 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,32 g/l	6,6 g/l	19,8 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,40 g/l	0,40 g/l	0,40 g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
MnSO ₄ · 5H ₂ O	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
Clorhidrato de tiamina	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l
Biotina	0,5 mg/l	0,5 mg/l	0,5 mg/l
GD-113 (antiespumante)	0,05 ml/l	0,05 ml/l	0,05 ml/l

El medio se ajustó a pH 6,0 con disolución acuosa de KOH y se sometió a tratamiento en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

5 [Tabla 2]

Tabla 2: medio de agar CM-Dex

Glucosa	5,0 g/l
Polipeptona	10,0 g/l
Extracto de levadura	10,0 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4 g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10,0 mg/l
MnSO ₄ · 5H ₂ O	10,0 mg/l
Urea	3,0 g/l
Hidrolizado de proteína de soja (34,3 ml/l de hidrolizado que tienen 35 g/l de peso de nitrógeno)	1,2 g/l (en cuanto al peso de nitrógeno)
Biotina	10,0 mg/l
Agar	20,0 g/l

10 El medio se ajustó a pH 7,5 con disolución acuosa de KOH y se sometió a tratamiento en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Tras el tratamiento en autoclave, se vertió el medio en una placa petri y se gelificó.

Mediante los resultados, se demostró que, en la producción de L-aminoácido mediante fermentación, puede realizarse el cultivo controlando la concentración de amoniaco en el medio para que sea constante de una manera extremadamente sencilla usando el aparato de la presente invención.

Aplicabilidad industrial

20 Tal como se explicó anteriormente en detalle, según la presente invención, puede realizarse el cultivo controlando de manera continua y arbitraria la concentración de amoniaco en el medio de cultivo, y por tanto puede usarse en los campos de las industrias químicas incluyendo la industria microbiana y así sucesivamente.

Descripción de notaciones numéricas

25 100 Aparato de control de amoniaco

102 Parte de control

30 102a Parte de creación de curva de calibración

102b Parte de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado

102c Parte de medición de valor de pH

35 102d Parte de cálculo de concentración de amoniaco total

102e Parte de instrucción de suministro de amoniaco

102f Parte de medición de tensión para verificación

	102g	Parte de verificación
5	104	Parte de salida de control
	106	Parte de almacenamiento
	106a	Archivo de curva de disociación de amoniac
10	106b	Archivo de curva de calibración
	106c	Archivo de concentración de amoniac no ionizado
	106d	Archivo de valor de pH
15	106e	Archivo de concentración de amoniac total
	108	Parte de entrada de señal
20	10	Sensor de amoniac
	11, 13	Amplificador de NH ₃
	12	Sensor de amoniac externo
25	20	Sensor de pH
	21	Amplificador de pH
30	200	Tanque de cultivo
	300	Dispositivo de alimentación de amoniac
	30	Tanque de amoniac
35	31	Conmutador
	32	Válvula
40		

REIVINDICACIONES

1. Método de control de amoniaco para fermentación, que es para controlar la concentración de amoniaco de un medio de cultivo contenido en un tanque de cultivo, en el que la concentración de amoniaco en el tanque de cultivo se controla usando un aparato de control de amoniaco que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco al tanque de cultivo, un sensor de amoniaco que responde a amoniaco no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y una parte de control conectada al dispositivo de alimentación de amoniaco y al sensor de amoniaco, y método que comprende las siguientes etapas realizadas por la parte de control:
- una etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado de calcular la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo sustituyendo la señal del sensor de amoniaco en una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y la señal del sensor de amoniaco, y
- una etapa de instrucción de suministro de amoniaco de instruir al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada, en el que el aparato de control de amoniaco está además conectado a un sensor de pH para medir un valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo,
- método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control:
- una etapa de cálculo de concentración de amoniaco total de calcular la concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado y un valor de pH medido con el sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniaco que representa una razón existente de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo a cada valor de pH, y
- en el que, en la etapa de instrucción de suministro de amoniaco, se usa la concentración de amoniaco total en lugar de la concentración de amoniaco no ionizado.
2. Método de control de amoniaco según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de creación de curva de calibración de crear la curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado en el medio de cultivo y la señal del sensor de amoniaco.
3. Método de control de amoniaco según la reivindicación 1, que comprende proporcionar un sensor de amoniaco externo fuera del tanque de cultivo para medir la concentración de amoniaco no ionizado, y
- obtener una señal a partir del sensor de amoniaco externo midiendo la concentración de amoniaco no ionizado de un medio de cultivo, que, tras recogerse a partir del tanque de cultivo, se vuelve lo suficientemente alcalino como para convertir ion amonio en amoniaco no ionizado con el sensor de amoniaco externo, como señal para verificación, y
- método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control:
- una etapa de verificación de verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoniaco no ionizado calculada a partir de la señal para verificación basándose en la curva de calibración representa la concentración de amoniaco total calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoniaco total.
4. Método de control de amoniaco según la reivindicación 3, en el que el aparato de control de amoniaco está conectado al sensor de amoniaco externo, y
- método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control:
- una etapa de introducción de señal para verificación de introducir la señal a partir del sensor de amoniaco externo, como señal para verificación.
5. Método para producir una sustancia objetivo mediante fermentación que comprende cultivar un microorganismo que tiene una capacidad para producir la sustancia objetivo en un tanque de cultivo que contiene un medio de cultivo, y recoger la sustancia objetivo a partir del cultivo,
- en el que el microorganismo se cultiva controlando la concentración de amoniaco del medio de cultivo mediante un método de control de amoniaco,
- en el que la concentración de amoniaco en el tanque de cultivo se controla usando un aparato de control de

amoniaco que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco al tanque de cultivo, un sensor de amoniaco que responde a amoniaco no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y una parte de control conectada al dispositivo de alimentación de amoniaco y al sensor de amoniaco, y

5 método que comprende las siguientes etapas realizadas por la parte de control:
una etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado de calcular la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo sustituyendo la señal del sensor de amoniaco en una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado del medio de cultivo y la señal del sensor de amoniaco, y

10 una etapa de instrucción de suministro de amoniaco de instruir al dispositivo de alimentación de amoniaco para que suministre amoniaco al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniaco no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada,

15 en el que el aparato de control de amoniaco está además conectado a un sensor de pH para medir un valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo,

20 método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control:
una etapa de cálculo de concentración de amoniaco total de calcular la concentración de amoniaco total a partir de la concentración de amoniaco no ionizado calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoniaco no ionizado y un valor de pH medido con el sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniaco que representa una razón existente de concentración de amoniaco no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo a cada valor de pH, y

25 en el que, en la etapa de instrucción de suministro de amoniaco, se usa la concentración de amoniaco total en lugar de la concentración de amoniaco no ionizado.

30 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho método de control de amoniaco comprende además la etapa de creación de curva de calibración de crear la curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniaco no ionizado en el medio de cultivo y la señal del sensor de amoniaco.

35 7. Método según las reivindicaciones 5 ó 6, en el que dicho método de control de amoniaco comprende proporcionar un sensor de amoniaco externo fuera del tanque de cultivo para medir la concentración de amoniaco no ionizado, y

40 obtener una señal a partir del sensor de amoniaco externo midiendo la concentración de amoniaco no ionizado de un medio de cultivo, que, tras recogerse a partir del tanque de cultivo, se vuelve lo suficientemente alcalino como para convertir ion amonio en amoniaco no ionizado con el sensor de amoniaco externo, como señal para verificación, y

45 método que comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control:
una etapa de verificación de verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoniaco no ionizado calculada a partir de la señal para verificación basándose en la curva de calibración representa la concentración de amoniaco total calculada en la etapa de cálculo de concentración de amoniaco total.

50 8. Método según las reivindicaciones 5-7, en el que el aparato de control de amoniaco está conectado al sensor de amoniaco externo, y

55 en el que dicho método de control de amoniaco comprende además la siguiente etapa realizada por la parte de control:

una etapa de introducción de señal para verificación de introducir la señal a partir del sensor de amoniaco externo, como señal para verificación.

60 9. Método según las reivindicaciones 5 a 8, en el que la sustancia objetivo es un L-aminoácido, un ácido orgánico, un ácido nucleico, un alcohol o una proteína.

10. Método según la reivindicación 9, en el que la sustancia objetivo es un aminoácido básico seleccionado del grupo que consiste en L-lisina, L-arginina y L-histidina.

65 11. Método según la reivindicación 10, que comprende reducir la cantidad de iones sulfato y/o iones cloruro usados como contraiones del aminoácido básico ajustando la concentración de amoniaco total del medio de

cultivo para que esté dentro de un determinado intervalo de concentración durante al menos una parte del procedimiento de cultivo total.

- 5 12. Aparato de control de amoniacó que comprende al menos un dispositivo de alimentación de amoniacó adaptado para suministrar amoniacó a un tanque de cultivo para fermentación, un sensor de amoniacó y una parte de control, en el que:

10 el sensor de amoniacó está adaptado para responder a amoniacó no ionizado en el medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo,

la parte de control está conectada al dispositivo de alimentación de amoniacó y al sensor de amoniacó,

15 la parte de control está configurada para crear una curva de calibración que representa la relación entre la concentración de amoniacó no ionizado del medio de cultivo y una señal a partir del sensor de amoniacó,

configurada para calcular la concentración de amoniacó no ionizado del medio de cultivo sustituyendo la señal del sensor de amoniacó en la curva de calibración, y

20 configurada para instruir al dispositivo de alimentación de amoniacó para que suministre amoniacó al tanque de cultivo cuando la concentración de amoniacó no ionizado calculada es inferior a una concentración predeterminada,

25 que está conectado además a un sensor de pH adaptado para medir el valor de pH del medio de cultivo contenido en el tanque de cultivo, y

30 en el que la parte de control está configurada además para calcular la concentración de amoniacó total a partir de la concentración de amoniacó no ionizado calculada y el valor de pH medido con el sensor de pH basándose en una curva de disociación de amoniacó que representa una razón existente de concentración de amoniacó no ionizado y concentración de ion amonio en el medio de cultivo a cada valor de pH, y

se usa la concentración de amoniacó total en lugar de la concentración de amoniacó no ionizado.

- 35 13. Aparato de control de amoniacó según la reivindicación 12, en el que la parte de control está configurada además para verificar la curva de calibración de modo que la concentración de amoniacó no ionizado calculada a partir de una señal para verificación basándose en la curva de calibración representa la concentración de amoniacó total calculada mediante los medios de cálculo de concentración de amoniacó total, y

40 la señal para verificación es:

una señal obtenida con un sensor de amoniacó externo proporcionado fuera del tanque de cultivo para medir la concentración de amoniacó no ionizado preparando el sensor de amoniacó externo, y

45 medir la concentración de amoniacó no ionizado de un medio de cultivo, que, tras recogerse a partir del tanque de cultivo, se vuelve lo suficientemente alcalino como para convertir ion amonio en amoniacó no ionizado con el sensor de amoniacó externo.

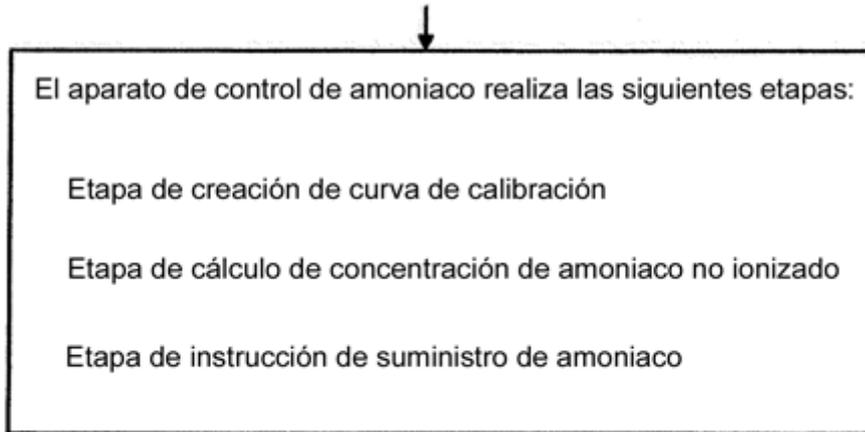
- 50 14. Aparato de control de amoniacó según la reivindicación 13, que está conectado al sensor de amoniacó externo, y

en el que la parte de control está adaptada además para introducir la señal a partir del sensor de amoniacó externo, como señal para verificación.

- 55 15. Aparato de control de amoniacó según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que está configurado para el control en tiempo real de amoniacó en un medio de cultivo.

- 60 16. Método para producir una sustancia objetivo mediante fermentación que comprende cultivar un microorganismo que tiene una capacidad para producir la sustancia objetivo en un tanque de cultivo que contiene un medio de cultivo para producir y acumular la sustancia objetivo en el medio de cultivo, en el que la concentración de amoniacó total del medio de cultivo se ajusta para que esté dentro de un determinado intervalo de concentración durante al menos una parte del procedimiento de cultivo total usando el aparato de control de amoniacó según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15.

Entrada de señal de sensor de amoniaco que responde a amoniaco no ionizado en el medio de cultivo en el tanque de cultivo

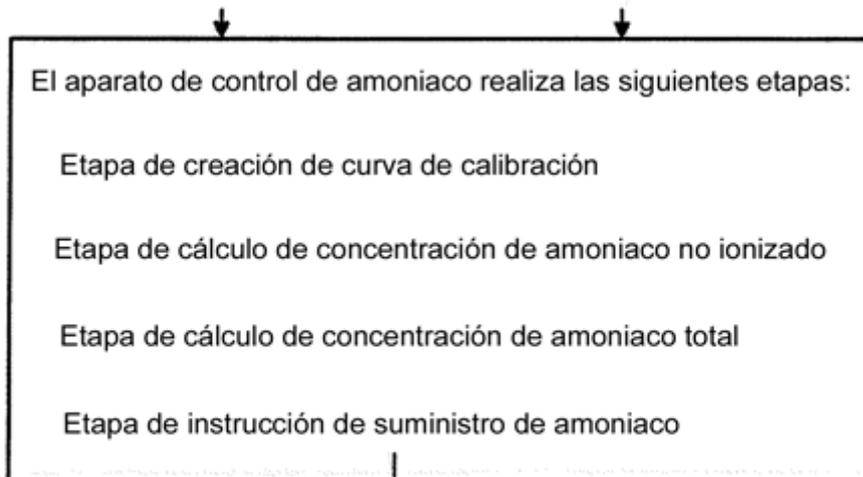


Salida de instrucción a dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco al tanque de cultivo

Fig. 1A

Entrada de señal de sensor de amoniaco que responde a amoniaco no ionizado en el medio de cultivo en el tanque de cultivo

Entrada de pH medido del medio de cultivo en el tanque de cultivo



Salida de instrucción a dispositivo de alimentación de amoniaco que suministra amoniaco al tanque de cultivo

Fig. 1B

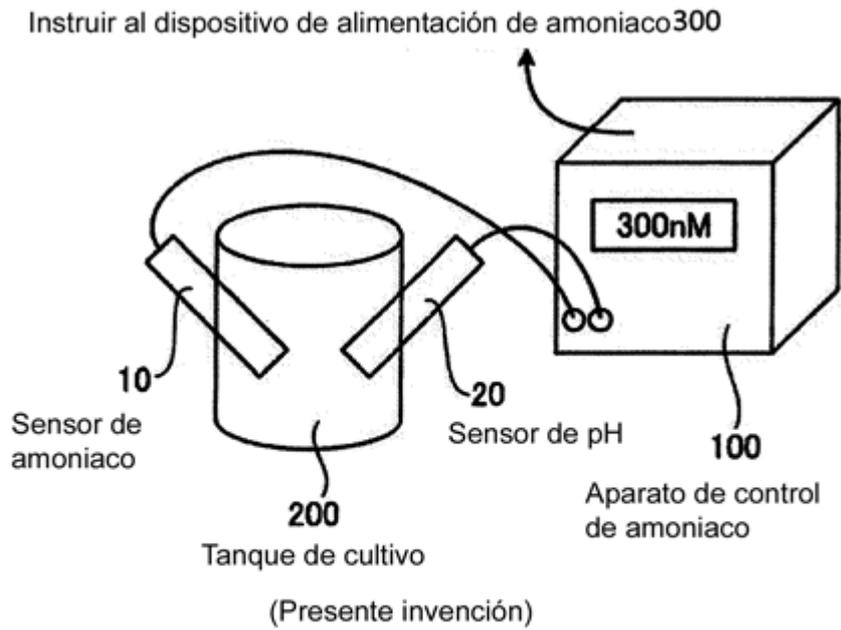


Fig. 2

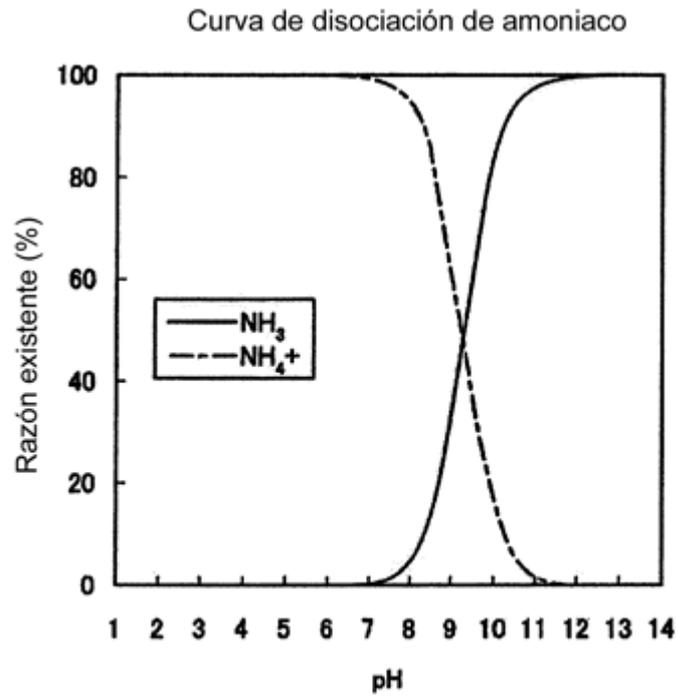


Fig. 3

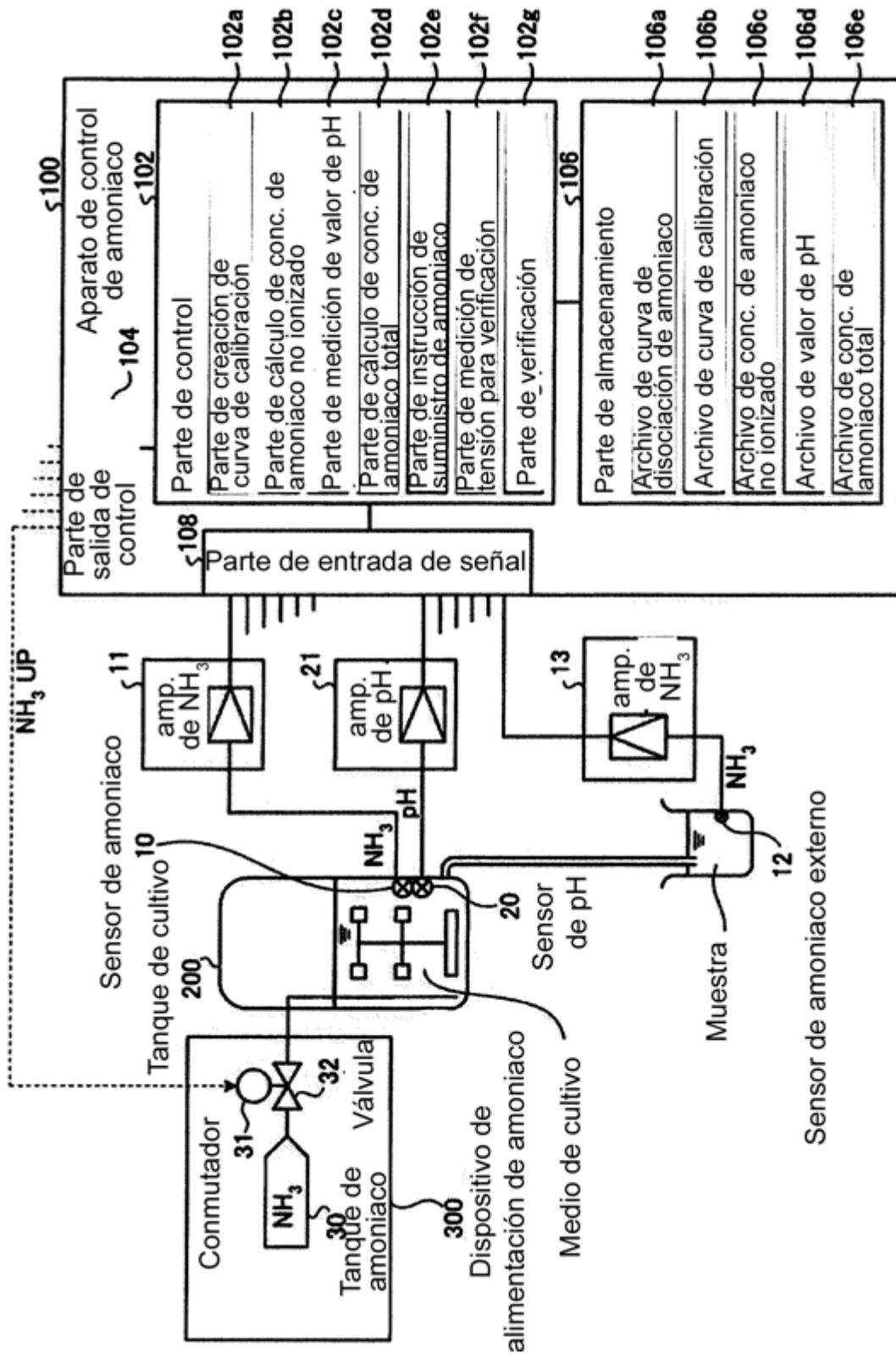


Fig. 4

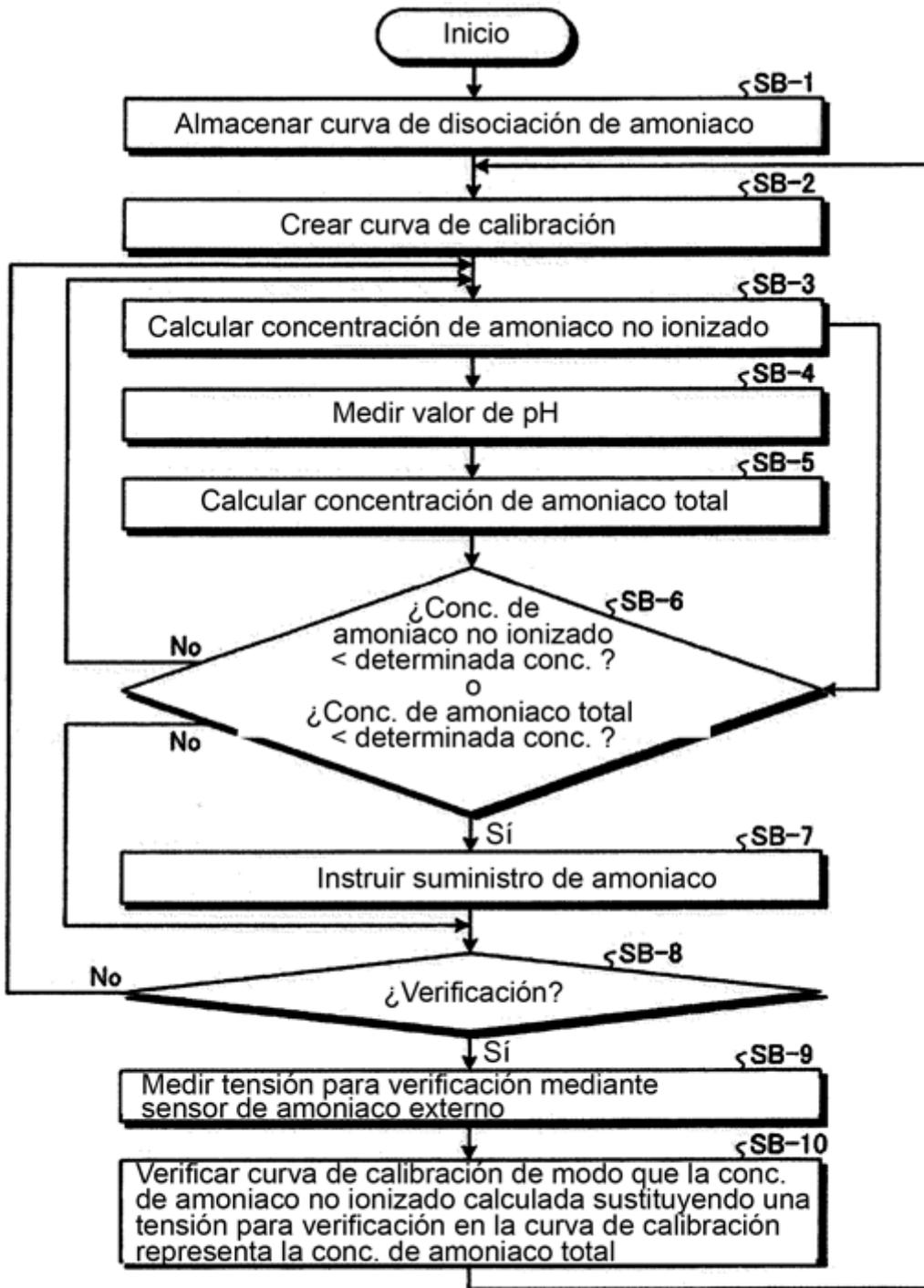


Fig. 5

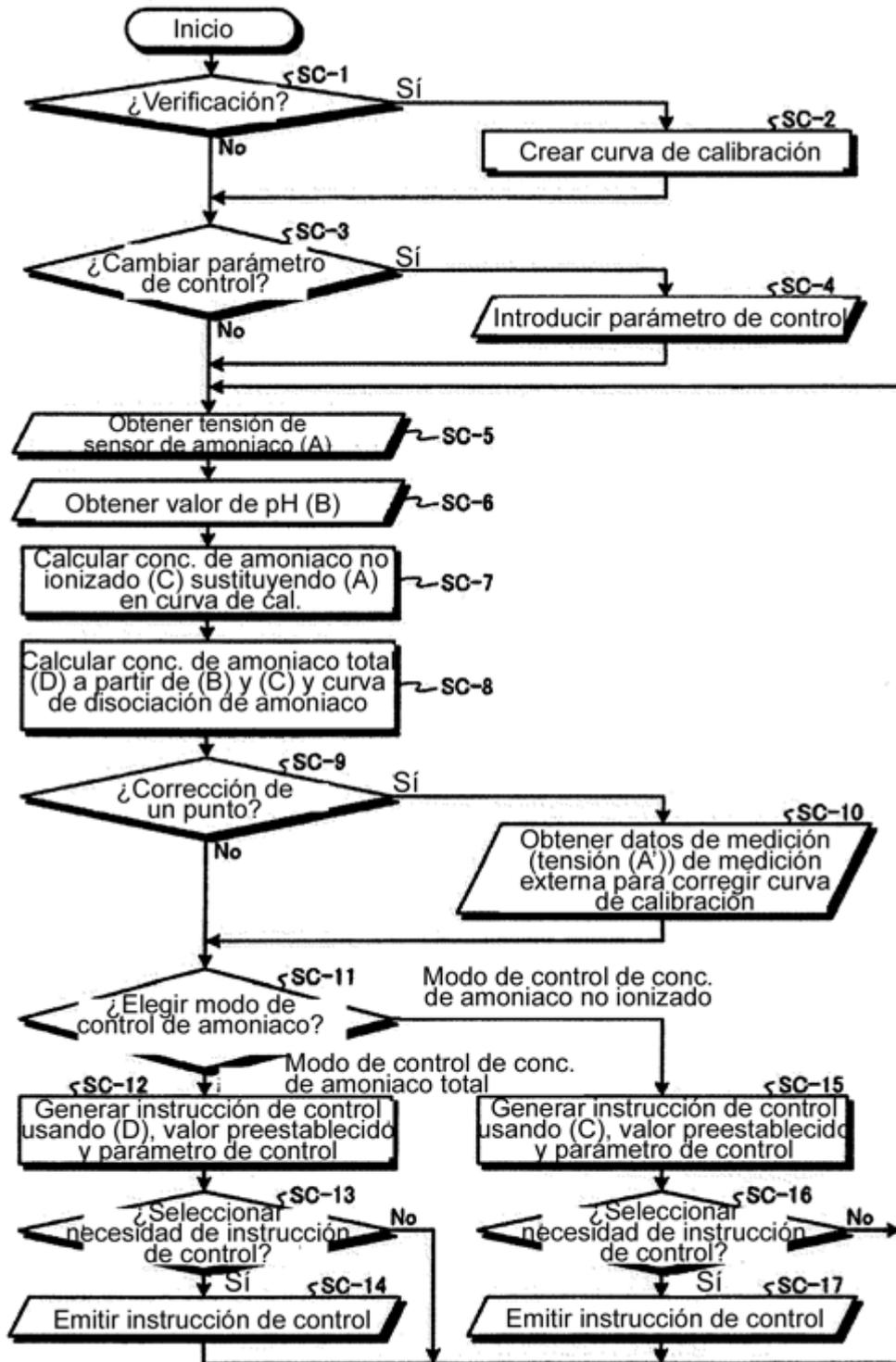


Fig. 6

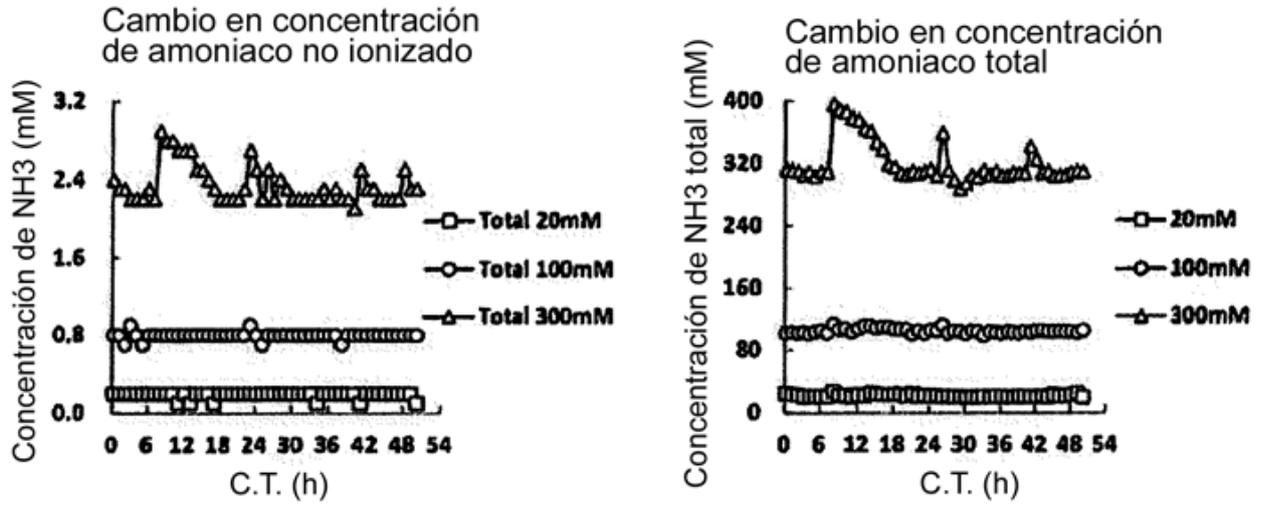


Fig. 7

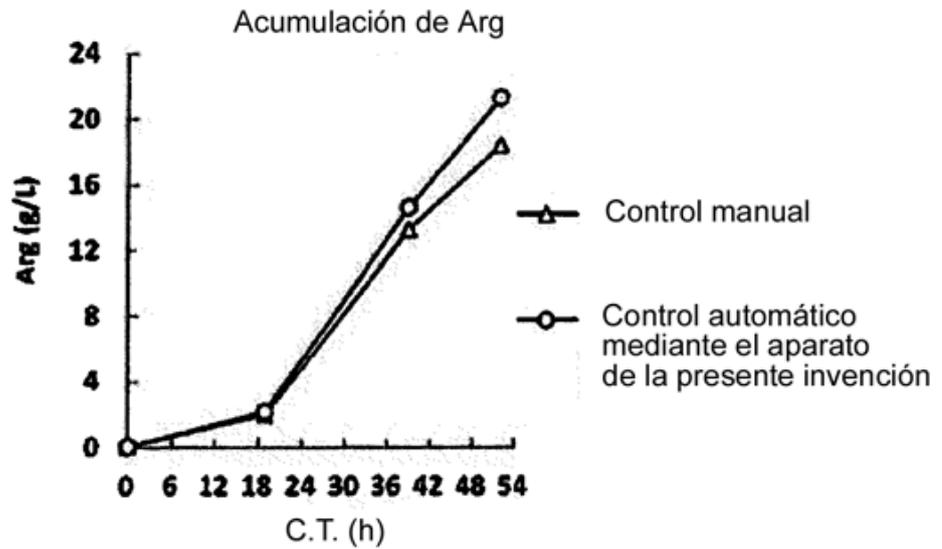
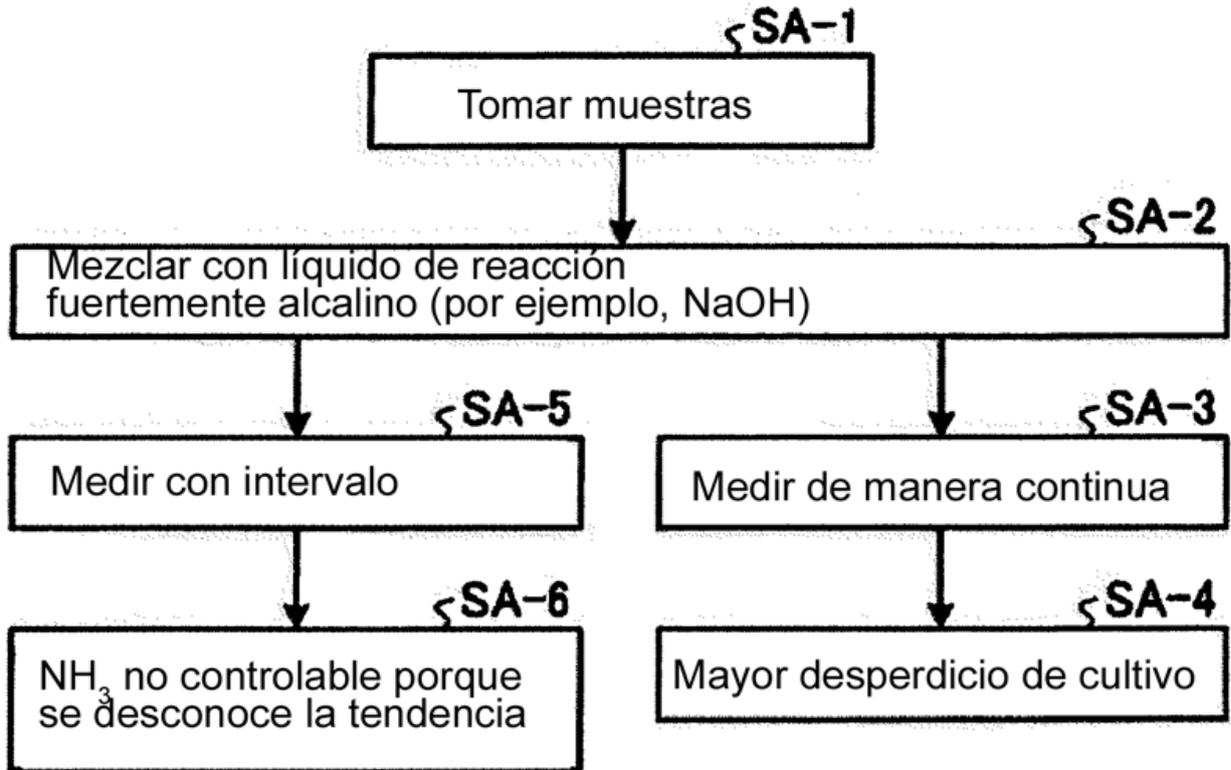


Fig. 8



(Técnica anterior)

Fig. 9