



(10) 申请公布号 CN 117529467 A

(43) 申请公布日 2024.02.06

(21) 申请号 202280043573.5

(22) 申请日 2022.06.27

(30) 优先权数据

2021-107301 2021.06.29 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/025631 2022.06.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/276980 JA 2023.01.05

(71) 申请人 绿色地球研究所株式会社

地址 日本东京新宿区新宿三丁目5番6号
(邮编:160-0022)

申请人 DIC株式会社

(72) 发明人 三浦里美 中屋敷彻 宇佐见祐章

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

专利代理师 刘赞 黄健

(51) Int.Cl.

C07C 227/42 (2006.01)

权利要求书2页 说明书30页 附图17页

(54) 发明名称

制造天冬氨酸的方法

(57) 摘要

本公开涉及一种制造天冬氨酸的方法,即便在使用混入了相当量的氨基酸、有机物、着色物质、无机盐类等杂质的粗生成物作为起始材料的情况下,也能够减少或去除杂质。所述方法包含:(q) 准备含有天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)的浆料;以及(r) 对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体,获取包含所述 α 型晶体的天冬氨酸的晶体组分(Y)。

1. 一种制造天冬氨酸的方法,包含:
 - (q) 准备含有天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)的浆料;以及
 - (r) 对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体,接着获取包含所述 α 型晶体的天冬氨酸的晶体组分(Y)。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,在工序(r)中,在 $30^{\circ}\text{C} \sim 190^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中,在工序(r)中,在 $60^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体。
4. 根据权利要求1所述的方法,还包含:
 - (p) 在含有天冬氨酸或其盐与至少一种杂质的溶液(S)中,将所述溶液(S)的pH调整为酸性区域中的规定的pH值,生成天冬氨酸的 β 型晶体,接着,从溶液(S)中分离包含所述 β 型晶体的组分,
在工序(q)中,使用所述包含 β 型晶体的组分来准备所述晶体组分(X)的浆料。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,在工序(p)中,将所述溶液(S)的pH调整为 $0.50 \sim 6.95$ 的范围的规定的值,生成所述天冬氨酸的 β 型晶体。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中,在工序(p)中,将所述溶液(S)的pH调整为 $1.50 \sim 4.50$ 的范围的规定的值,生成所述天冬氨酸的 β 型晶体。
7. 根据权利要求4所述的方法,其中,供试于工序(p)中的所述溶液(S)包含晶种。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述晶种包含天冬氨酸的 β 型晶体。
9. 根据权利要求4所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)是通过在培养基中培养微生物或使其反应而获取的培养物、从所述培养物中分离出的澄清液或它们的浓缩物。
10. 根据权利要求4所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)是以 $0.1\text{M} \sim 5.0\text{M}$ 的浓度含有所述天冬氨酸或其盐的溶液。
11. 根据权利要求4所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)含有选自由天冬氨酸以外的氨基酸、有机酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种作为所述杂质。
12. 根据权利要求4所述的方法,其中,
供试于工序(p)中的溶液(S)至少含有如下部分作为所述杂质:
 - i) 选自由谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种、以及
 - ii) 选自由丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸、富马酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种。
13. 根据权利要求4所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)的pH处于 $6.00 \sim 8.00$ 的范围内。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中,在工序(p)中,通过向所述溶液(S)中添加酸来将所述溶液(S)的pH调整为 $1.00 \sim 6.85$ 的范围的规定的值,以生成所述天冬氨酸的 β 型晶体。
15. 根据权利要求4所述的方法,其中,
在工序(p)中,在所述溶液(S)中生成所述天冬氨酸的 β 型晶体后,利用固液分离法从所述溶液(S)中分离所述包含 β 型晶体的组分,
在工序(q)中,使用在工序(p)中分离出的所述包含 β 型晶体的组分来准备所述晶体组

分(X)的浆料,

在工序(r)中,对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体后,利用固液分离法从所述晶体组分(X)的浆料中分离所述晶体组分(Y)。

16.根据权利要求15所述的方法,其中,

在工序(p)中,利用固液分离法从所述溶液(S)中分离出包含所述 β 型晶体的晶体组分后,利用溶媒将所述分离出的晶体组分清洗一次以上,进而使其干燥,

在工序(q)中,使用所述干燥后的晶体组分来准备所述晶体组分(X)的浆料,

在工序(r)中,利用固液分离法从所述晶体组分(X)的浆料中分离出所述晶体组分(Y)后,利用溶媒将所述分离出的所述晶体组分(Y)清洗一次以上,进而使其干燥。

制造天冬氨酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制造天冬氨酸的方法。详细而言,本发明涉及一种制造具有 α 型晶体的形态的天冬氨酸的方法。

背景技术

[0002] 各种氨基酸是构成生物体的蛋白质的构成单位,另一方面是能够发挥出生物学或化学方面的各种功能的物质,因此作为食品原料、医药品、化学材料、化妆品等的原料被用于广泛的用途。尤其是,作为酸性氨基酸已知的天冬氨酸或谷氨酸被用作甜味剂、鲜味调味料等食品原料,此外,近年来,将它们聚合物化而获取的聚天冬氨酸或聚谷氨酸作为保持生物降解性或吸水性等功能且对环境友好的功能性原材料而备受关注。在此种背景下,开发出各种天冬氨酸或谷氨酸的制造方法或精制技术。

[0003] 例如,专利文献1中公开了一种精制光学活性 β 型谷氨酸晶体的获取方法,其特征在于,将包含含有 α 型谷氨酸晶体的光学活性谷氨酸粗晶体与水性溶媒的晶泥在 50°C 以上且 120°C 以下的温度范围内放置或搅拌后,分离获取谷氨酸晶体。在专利文献1中,作为所述方法的优点,相对于现有方法而言,不仅提及处理体系的总量以少量便足够且处理所需的能量或劳力也可缩减这一点,也提及由于不需要酸或碱的添加,因此可抑制氯化钠等向制品中的混入或光学活性的外消旋化等不利的现象这一点。

[0004] 进而,专利文献2中公开了一种天冬氨酸的精制方法,其特征在于,在水溶液中,在悬浮下以 50°C 以上的温度精制至少包含C1-的天冬氨酸晶体。在专利文献2中,利用发酵法、酶法及化学合成法制造的天冬氨酸的粗晶体中包含其他氨基酸、着色物质、无机盐类等杂质,这暗示相对于现有方法而言,根据所述文献所记载的精制方法,可获取进一步减少或去除了C1-等杂质的高纯度的天冬氨酸晶体。

[0005] 进而,专利文献3中公开了一种天冬氨酸的晶化方法,其将天冬氨酸铵水溶液与硫酸或盐酸加以混合来对天冬氨酸进行晶化,所述方法的特征在于,使晶化体系内共存特定量的苹果酸。在专利文献3的发明中,暗示出,以使现有的柱状晶体结晶为课题,清洗工序中的清洗效果得到改善,可获取高纯度的天冬氨酸柱状晶体。

[0006] 此外,最近,在以天冬氨酸或谷氨酸为首的各种氨基酸的工业生产中,迄今为止有通用酶法或提取法的历史。例如,在利用酶法的天冬氨酸的生产中,采用以富马酸与氨为原料,利用基于天冬氨酸的可逆反应来合成天冬氨酸的方法,作为合成的天冬氨酸的分离精制方法,可采用将利用活性炭的吸附、过滤、等电点晶化、冷却、晶体分离、干燥、利用了卡拉胶载体的固定化等各种处理适宜加以组合的分离精制方法。另一方面,在利用提取法的生产中,采用通过将规定的蛋白质供试于利用盐酸等的水解反应中而分解为氨基酸单位,而单离/精制所需的氨基酸的方法。此时,所期望的氨基酸的单离/精制中采用通过将离子交换色谱、或基于各物质中的等电点、吸附性、溶解度等的差异的分级晶化等各种分离方法加以组合而单离/精制目标氨基酸的方法。进而,近年来,使用了微生物的发酵法也越来越普遍。例如,已知有一种将赋予了L-谷氨酸生产能力的菠萝泛菌 (*Pantoea ananatis*) 在调整

为L-谷氨酸析出的pH条件的培养基中进行培养,在所述培养基中使L-谷氨酸的晶体析出的同时进行生成蓄积的方法(专利文献4)。所述L-谷氨酸的制造方法的特征在于,在培养基中的L-谷氨酸浓度低于引起自发结晶的浓度时,使L-赖氨酸存在于培养基中,使L-谷氨酸的 α 型晶体析出。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本专利特公昭45-4730号公报

[0010] 专利文献2:日本专利特开昭63-233958号公报

[0011] 专利文献3:日本专利特开平8-217733号公报

[0012] 专利文献4:国际公开公报W02004/099426

发明内容

[0013] 发明所要解决的问题

[0014] 与当前通用的酶法与提取法不同,在经由利用了微生物的发酵法等生物工艺来生产天冬氨酸的情况下,所获取的粗生成物中除有作为目标的天冬氨酸外,还混入了相当量的源自微生物或培养基成分等的其他氨基酸、有机物、着色物质、无机盐类等杂质。本发明人等发现,确立能够在混入了相当量的此种杂质的粗生成物中有效果地减少或去除杂质的天冬氨酸的分离精制或制造技术成为新的课题。

[0015] 解决问题的技术手段

[0016] 本发明人等为了解决所述课题,对从源自微生物的培养物且含有各种杂质的粗生成物试样中分离精制天冬氨酸的各条件进行了努力研究,结果发现,在以浆料的形态准备从所述粗生成物试样中分离出的天冬氨酸的 β 型晶体,对所述浆料进行加热,使其从 β 型晶体转相为 α 型晶体,并获取包含所述 α 型晶体的晶体组分的过程中,各种杂质被有效果地减少或去除,从而可以 α 型晶体的形态制造高纯度的天冬氨酸。本发明是根据所述发现而完成的发明。

[0017] 根据本发明的实施例,提供下述的制造天冬氨酸的方法。

[0018] (1)一种制造天冬氨酸的方法,包含:

[0019] (q) 准备含有天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)的浆料;以及

[0020] (r) 对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体,接着获取包含所述 α 型晶体的天冬氨酸的晶体组分(Y)。

[0021] (2)根据(1)所述的方法,其中,在工序(r)中,在 $30^{\circ}\text{C} \sim 190^{\circ}\text{C}$,优选为 $60^{\circ}\text{C} \sim 190^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体。

[0022] (3)根据(1)或(2)所述的方法,其中,在工序(r)中,在 $65^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体。

[0023] (4)根据(1)至(3)中任一项所述的方法,还包含:

[0024] (p) 在含有天冬氨酸或其盐与至少一种杂质的溶液(S)中,将所述溶液(S)的pH调整为酸性区域中的规定的pH值,生成天冬氨酸的 β 型晶体,接着,从溶液(S)中分离包含所述 β 型晶体的组分,

[0025] 在工序(q)中,使用所述包含 β 型晶体的组分来准备所述晶体组分(X)的浆料。

[0026] (5)根据(4)所述的方法,其中,在工序(p)中,将所述溶液(S)的pH调整为0.50~6.95的范围的规定的值,生成所述天冬氨酸的 β 型晶体。

[0027] (6)根据(4)或(5)所述的方法,其中,在工序(p)中,将所述溶液(S)的pH调整为1.50~4.50的范围的规定的值,生成所述天冬氨酸的 β 型晶体。

[0028] (7)根据(4)至(6)中任一项所述的方法,其中,供试于工序(p)中的所述溶液(S)包含晶种。

[0029] (8)根据(7)所述的方法,其中,所述晶种包含天冬氨酸的 β 型晶体。

[0030] (9)根据(4)至(8)中任一项所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)是通过在培养基中培养微生物或使其反应而获取的培养物、从所述培养物中分离出的澄清液或它们的浓缩物。

[0031] (10)根据(4)至(9)中任一项所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)是以0.1M~5.0M的浓度含有所述天冬氨酸或其盐的溶液。

[0032] (11)根据(4)至(10)中任一项所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)含有选自由天冬氨酸以外的氨基酸、有机酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种作为所述杂质。

[0033] (12)根据(4)至(11)中任一项所述的方法,其中,

[0034] 供试于工序(p)中的溶液(S)至少含有如下部分作为所述杂质:

[0035] i)选自由谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种;以及

[0036] ii)选自由丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸、富马酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种。

[0037] (13)根据(4)至(12)中任一项所述的方法,其中,供试于工序(p)中的溶液(S)的pH处于6.00~8.00的范围内。

[0038] (14)根据(13)所述的方法,其中,在工序(p)中,通过向所述溶液(S)中添加酸来将所述溶液(S)的pH调整为1.00~6.85的范围的规定的值,以生成所述天冬氨酸的 β 型晶体。

[0039] (15)根据(4)至(15)中任一项所述的方法,其中,

[0040] 在工序(p)中,在所述溶液(S)中生成所述天冬氨酸的 β 型晶体后,利用固液分离法从所述溶液(S)中分离所述包含 β 型晶体的组分,

[0041] 在工序(q)中,使用在工序(p)中分离出的所述包含 β 型晶体的组分来准备所述晶体组分(X)的浆料,

[0042] 在工序(r)中,对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体后,利用固液分离法从所述晶体组分(X)的浆料中分离所述晶体组分(Y)。

[0043] (16)根据(15)所述的方法,其中,

[0044] 在工序(p)中,利用固液分离法从所述溶液(S)中分离出包含所述 β 型晶体的晶体组分后,利用溶媒将所述分离出的晶体组分清洗一次以上,进而使其干燥,

[0045] 在工序(q)中,使用所述干燥后的晶体组分来准备所述晶体组分(X)的浆料,

[0046] 在工序(r)中,利用固液分离法从所述晶体组分(X)的浆料中分离出所述晶体组分(Y)后,利用溶媒将所述分离出的所述晶体组分(Y)清洗一次以上,进而使其干燥。

[0047] 发明的效果

[0048] 根据本发明的实施方式,即便以混入了相当量的包含天冬氨酸以外的氨基酸、有

机酸、蛋白质、糖质的有机物、无机盐类等杂质的粗生成物等作为起始材料,也可以 α 型晶体的形态制造这些杂质被减少或去除的、纯度高的天冬氨酸。进而,根据本发明的特定的实施方式,可制造尤其是着色物质被减少或去除的、天冬氨酸的高纯度 α 型晶体。

附图说明

- [0049] [图1]是示意性地表示能够在本发明的方法中采用的各工序的一例的图。
- [0050] [图2A]是表示试验例1中的滤液(A)的氨基酸/有机酸分析的结果的图。
- [0051] [图2B]是表示试验例1中的粗晶体(B)的氨基酸/有机酸分析的结果的图。
- [0052] [图2C]是表示试验例1中的晶体(C)的氨基酸/有机酸分析的结果的图。
- [0053] [图3A]是表示经由试验例1中的等电点晶化工序而从各试样中去除的各种杂质的比例的图。
- [0054] [图3B]是表示经由试验例1中的热再浆料化处理工序而从各试样中去除的各种杂质的比例的图。
- [0055] [图3C]是表示经由试验例1中的等电点晶化/热再浆料化处理整体而从各试样中去除的各种杂质的去除率的图。
- [0056] [图4A]是表示在试验例1中获取的晶体试样的外观照片的图。
- [0057] [图4B]是表示在试验例1中获取的晶体试样的显微镜照片的图。
- [0058] [图4C]是表示在试验例1中获取的晶体试样的显微镜照片的图。
- [0059] [图4D]是表示在试验例1中获取的晶体试样的显微镜照片的图。
- [0060] [图5A]是表示试验例1中的粗晶体(B)的X射线衍射图的图。
- [0061] [图5B]是表示试验例1中的晶体(C)的X射线衍射图的图。
- [0062] [图6]是表示试验例2中的各试样的各种氨基酸的分析结果的图。
- [0063] [图7]是表示试验例2中的各试样的各种有机酸的分析结果的图。
- [0064] [图8A]是表示试验例2中的各试样中的天冬氨酸回收率的图。
- [0065] [图8B]是表示试验例2中的粗晶体(B)的各种杂质的残存率的图。
- [0066] [图9]是表示试验例2中的各晶体试样中的各种杂质的残存率的图。
- [0067] [图10]是表示试验例2中的最终生产物的评价试验的结果的图。
- [0068] [图11]是表示在试验例3中进行等电点晶化时拍摄到的未添加晶种的试样的外观照片的图。
- [0069] [图12]是表示试验例3中的各晶体试样中的天冬氨酸及其他氨基酸的残存率的图。
- [0070] [图13]是表示试验例3中的各晶体试样中的各种有机酸的残存率的图。
- [0071] [图14]是表示试验例5中的各试样的各种氨基酸的分析结果的图。
- [0072] [图15]表示试验例5中的各试样的各种有机酸及二羟基丙酮(DHA)的分析结果的图。
- [0073] [图16A]是表示在试验例5中获取的粗晶体(B)及晶体(C)的各试样中的天冬氨酸回收率(残存率)的图。
- [0074] [图16B]是表示试验例5中获取的粗晶体(B)的各杂质的残存率的图。
- [0075] [图17]是表示试验例5中获取的各晶体(C)的各试样中的各杂质的残存率的图。

[0076] [图18]是表示在试验例5中对由热再浆料化处理引起的各试样的晶体变化进行显微镜观察而得的结果的图。

具体实施方式

[0077] 如上所述,根据本发明的形态,提供一种制造天冬氨酸的方法,

[0078] 所述制造天冬氨酸的方法包含:

[0079] (q) 准备含有天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)的浆料;以及

[0080] (r) 对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体,接着获取包含所述 α 型晶体的天冬氨酸的晶体组分(Y)。

[0081] 进而,在特定的实施方式中,本发明的方法在工序(q)之前还包含:

[0082] (p) 在含有天冬氨酸或其盐与至少一种杂质的溶液(S)中,将所述溶液(S)的pH调整为酸性区域中的规定的pH值,生成天冬氨酸的 β 型晶体,接着,从溶液(S)中分离包含所述 β 型晶体的组分。

[0083] 此处,在后续的工序(q)中,使用包含所述 β 型晶体的组分来准备所述晶体组分(X)的浆料。

[0084] 以下,对本发明中的各术语进行说明,以工序(p)、工序(q)及工序(r)的顺序对能够采用本发明的方法的实施方式进行说明。

[0085] <术语的说明>

[0086] 在本发明中,“天冬氨酸”及“天冬氨酸的盐”照字义进行解释即可。在本发明中,天冬氨酸可为天然丰富存在的L体、D体或它们的混合物。此外,作为可在本发明中采用的天冬氨酸的盐,并无特别限定,例如可列举铵盐、钠盐、钾盐、钙盐等。进而,在本发明中,天冬氨酸或其盐可包含天冬氨酸或其盐的无水物或水合物(例如一水合物、二水合物)的形态。此外,在利用微生物发酵法等生物工艺生产天冬氨酸的盐的情况下,溶液(S)通常可主要含有L-天冬氨酸或其盐。但是,只要不特别限定,则本发明中“天冬氨酸”及“其盐(天冬氨酸的盐)”的术语照字义进行解释即可,只要无特别限定,则并不限定于特定的结构。

[0087] 在本发明中,所谓“杂质”,是指作为制造对象的天冬氨酸或其盐以外的各种物质,是指为了分离精制天冬氨酸而欲从粗生成物中减少或去除的各种物质。作为“杂质”,例如可列举天冬氨酸以外的各种氨基酸(例如甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸)及它们的盐、其他有机酸(例如丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸、富马酸)及它们的盐、蛋白质或肽、碳水化合物或糖质、肽聚糖等糖蛋白质、无机盐类、 SO_4^{2-} 或 Cl^- 等无机离子。

[0088] 此外,利用本发明的方法制造的对象为具有 α 型晶体的形态的天冬氨酸,但供试于所述方法中的起始材料或粗生成物中包含的形态不仅可为天冬氨酸,也可为天冬氨酸的盐,在所述情况下,最终能够转换为 α 型晶体的天冬氨酸的天冬氨酸的盐当然不属于杂质。

[0089] 在本发明中,“ α 型晶体”及“ β 型晶体”的各术语意指如本领域技术人员所知晓那样天冬氨酸能够采取的晶体多型,只要照字义进行解释即可。具体而言,关于 α 型晶体,当利用显微镜等进行观察时观察到板状结晶体,当利用X射线衍射进行分析时,在X射线衍射图谱中,在 21.65° 及 23.7° 附近的衍射角度具有峰值。另一方面,关于 β 型晶体,当利用显微镜等

进行观察时,观察到微细的柱状结晶体,当利用X射线衍射进行分析时,在X射线衍射图谱中,在 18.8° 、 19.7° 及 25.0° 附近的衍射角度具有峰值。

[0090] <工序(p)>

[0091] 供试于工序(p)中的溶液(S)除能够含有天冬氨酸或其盐外,还能够含有如上所述的物质中的至少一种以上作为杂质。根据特定的实施方式,如后述的实施例所示那样,尤其是能够有效果地去除在将天冬氨酸聚合物化等用途中经常成为问题的、引起着色的杂质。根据所述实施方式,尤其是可有效果地减少以高水平混入至利用使用了微生物的发酵法而生产出的天冬氨酸的粗生成物中的着色物质。

[0092] 如上所述,溶液(S)是含有天冬氨酸或其盐及至少一种杂质的溶液,但溶解这些溶质的溶媒例如可列举:水、乙醇、甲醇等有机溶媒、它们的混合物。此外,在将本发明的方法应用于利用发酵法等各种生物工艺获得的粗生成物或其浓缩物的情况下,通常微生物用的培养基或培养液以水作为溶媒,因此溶液(S)主要包含水作为溶媒成分。

[0093] 在工序(p)中,关于“含有天冬氨酸或其盐及至少一种杂质的溶液(S)”的意义,只要照字义对所述术语进行理解即可,具体而言,作为溶液(S),只要采用经由将所述溶液(S)的pH调整为酸性区域中的规定的pH值而能够产生天冬氨酸的向 β 型晶体的结晶化的溶液即可。作为溶液(S),例如可列举:通过对能够生成天冬氨酸或其盐的微生物(例如细菌、真菌等菌类、蓝藻、浮游动物、浮游植物)、昆虫细胞、动物细胞、植物细胞等各种培养细胞等进行培养而获得的培养物、对所述培养物实施物理处理或化学处理(例如,超声波处理或蛋白酶处理等)而获得的处理物、利用生成天冬氨酸或其盐的酶反应工艺或化学合成工艺而获得的反应生成物、利用离心分离等从所述培养物、处理物或反应生成物中除掉固体成分而获得的上清液等生物来源试样。

[0094] 近年来,开发出一种利用了使用棒状杆菌的细菌(例如谷氨酸棒状杆菌)或大肠杆菌(*Escherichia coli*)等细菌的转基因菌株的发酵法或增殖非依赖型生物工艺的各种氨基酸的生产技术。在所述方面,可将从利用了细菌的发酵法或增殖非依赖型生物工艺中回收的粗生成物有利地供试于本发明的方法中。更具体而言,可将在发酵法或增殖非依赖型生物工艺中对细菌进行培养或使其反应后回收的培养物、从所述培养物中除掉菌体后的上清液、所述培养物或上清液的处理物、或者它们的浓缩物作为溶液(S)而供试于工序(p)中。在这些生物来源试样中除作为精制对象的天冬氨酸或其盐外,还混入了菌体或培养基来源的各种氨基酸、各种有机酸、蛋白质、碳水化合物或糖质等,根据本发明的实施方式,能够有效果地去除这些杂质,其结果,可从生物来源试样以 α 型晶体的形态制造高纯度的天冬氨酸。但是,能够在本发明中采用的溶液(S)并不限定于这些生物来源试样。

[0095] 在如上所述的生物来源试样中,也设想天冬氨酸或其盐的浓度并不高至经由工序(p)而有效率地生成天冬氨酸的 β 型晶体的程度的情况。在此种情况下,当在工序(p)之前,对所述生物来源试样实施浓缩处理,由此获取溶液试样中的天冬氨酸或其盐经浓缩而成的浓缩物,并采用所述浓缩物作为工序(p)中的溶液(S)时,可有效率地且以较短的时间经由工序(p)而生成天冬氨酸的 β 型晶体,因此可优选地采用将此种浓缩物用作工序(p)中的溶液(S)的实施方式。此外,关于对所述生物来源试样的浓缩处理,具体而言,可利用使用了各种蒸发器或真空泵等的减压浓缩、使用了活性炭或二氧化硅等吸附剂的吸附、超滤、这些各种浓缩方法的组合、以及任意的接下来的过滤等方法来进行。但是,在本发明中,此种浓缩

处理并非必需,假设在采用浓缩处理的情况下,所述浓缩处理也并不限于所述结构。

[0096] 关于供试于工序(p)中的溶液(S)中的天冬氨酸或其盐的浓度,只要能够生成天冬氨酸的 β 型晶体,则并无特别限定,例如可列举约0.1M~约5.0M、约0.2M~约4.5M、约0.5M~约4.0M、约1.0M~约3.5M的浓度范围。

[0097] 此外,在特定的实施方式中,可在工序(p)中采用包含:

[0098] (i) 天冬氨酸或其盐;

[0099] (ii) 除天冬氨酸以外的氨基酸或其盐(例如,包含选自由谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种的除天冬氨酸以外的氨基酸或其盐);以及

[0100] (iii) 有机酸或其盐(例如,包含选自由丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸、富马酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种的有机酸或其盐),

[0101] 的溶液试样(优选为如上所述的生物来源试样或其浓缩物)作为溶液(S)。

[0102] 此处,所述(ii)及(iii)的成分当然相当于杂质,可谓优选为在溶液(S)中,预先尽可能地减少它们的混入量。在本发明的实施方式中,尤其是所述(ii)及(iii)的成分的混入量是供试的试样所固有的量,因此不应积极地确定,但就生物来源试样或其浓缩液的成分组成而言,在特定的实施方式中,所述(ii)及(iii)的各分量能够具有以下那样的结构。

[0103] 例如,在特定的实施方式中,可在工序(p)中采用如下溶液试样作为溶液(S),所述溶液试样不仅含有(i)所述各种摩尔浓度的范围的天冬氨酸或其盐,还含有(ii)处于所述天冬氨酸或其盐的摩尔浓度的约1/5~约3/4的范围的摩尔浓度的天冬氨酸以外的氨基酸或其盐(例如,包含选自由谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种的除天冬氨酸以外的氨基酸或其盐),且含有(iii)处于所述天冬氨酸或其盐的摩尔浓度的约1/5~约1/2的范围的摩尔浓度的各种有机酸或其盐(例如,包含选自由丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸、富马酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种的有机酸或其盐)。

[0104] 进而,在另一实施方式中,也可在工序(p)中采用包含:

[0105] (i) 所述各种摩尔浓度的范围的天冬氨酸或其盐;

[0106] (ii) 选自由谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种(浓度例如为约100 μ M~约1mM、约1mM~约10mM、约10mM~约1.75M);以及

[0107] (iii) 选自由丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸、富马酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种(浓度例如为约100 μ M~约1mM、约1mM~约10mM、约10mM~约1.5M)的溶液试样(例如,所述生物来源试样或其浓缩物)作为溶液(S)。

[0108] 在工序(p)中,在如上所述的溶液(S)中,将所述溶液(S)的pH调整为酸性区域中的规定的pH值,生成所述天冬氨酸的 β 型晶体。生成基于所述溶液(S)的pH调整的天冬氨酸的 β 型晶体是基于天冬氨酸的等电点晶化的原理,工序(p)中的溶液(S)的pH的调整具体而言可如下述那样进行。

[0109] 首先,通过向溶液(S)中添加酸或碱,使溶液(S)的pH接近天冬氨酸的等电点即2.77的值,使溶液(S)中的天冬氨酸的溶解度降低,从而使天冬氨酸结晶来作为 β 型晶体。

[0110] 此处,作为酸或碱,并无特别限定,例如可使用盐酸、硫酸、乙酸等酸、或者氢氧化钠、氢氧化钾、氨水等碱。在溶液(S)的pH较天冬氨酸的等电点2.77而言更倾向于碱性侧的情况下,只要使用酸以使溶液(S)的pH接近等电点附近的值即可。另一方面,在溶液(S)的pH较天冬氨酸的等电点2.77而言更倾向于酸性侧的情况下,只要使用碱以使溶液(S)的pH接

近等电点附近的值即可。此外,将如上所述的生物来源试样或其浓缩物作为溶液(S)进行供试的情况下,所述溶液(S)的pH通常大部分倾向于较天冬氨酸的等电点而言成为碱性侧的中性(pH7.0)附近。因此,在此种情况下,工序(p)中的溶液(S)的pH的调整中通常使用酸。

[0111] 在若干实施方式中,供试于工序(p)中的溶液(S)的pH为约6.00~约8.00、约6.5~约7.5、约6.6~约7.4、约6.7~约7.3、约6.8~约7.2、约6.9~约7.1、例如约7.0。

[0112] 此外,酸的种类并无特别限定,就操作容易性及成本性能的观点而言,作为酸,使用硫酸合适。

[0113] 在工序(p)中,只要将溶液(S)的pH调整为能够生成天冬氨酸的 β 型晶体的pH的值即可,此种pH的值也依赖于溶液(S)中的天冬氨酸或其盐的浓度,因此并无特别限定。

[0114] 例如,在将具有中性7.0附近的pH的生物来源试样或其浓缩物且为天冬氨酸或其盐的浓度比较高的浓度(例如2.3M以上)的溶液(S)供试于工序(p)中的情况下,由于也依赖于其他各条件,因此无法一概而论,本发明人等根据经验确认到,在通过添加酸将溶液(S)的pH调整为比较接近中性7.0的酸性区域(例如,pH4.0~pH6.5)的时点,能够开始进行天冬氨酸的 β 型晶体的生成。因此,在工序(p)中,溶液(S)的pH不一定需要调整为无限接近于天冬氨酸的等电点即2.77的值。

[0115] 即,工序(p)中的“将所述溶液(S)的pH调整为酸性区域中的规定的pH值,生成所述天冬氨酸的 β 型晶体”的术语意指只要根据在工序(p)中采用的溶液(S)的性质或其他各条件,将溶液(S)的pH调整为能够生成天冬氨酸的 β 型晶体的酸性区域的任意的pH值即可。本领域技术人员可以本说明书的公开为参考,在考虑到工序(p)中采用的各种溶液(S)的性质或其他各条件的基础上,适宜地决定应调整各种溶液(S)的pH的值。

[0116] 如上所述,在工序(p)中应调整溶液(S)的pH的值只要是能够实现溶液(S)中包含的天冬氨酸的 β 型晶体的生成的酸性区域的规定值,则并无特别限定,但在特定的实施方式中,可将溶液(S)的pH例如调整为处于约0.50~约6.95、优选为约1.0~约6.85、约1.50~约4.50、更优选为约2.00~约4.00、特别优选为约2.10~约3.90的范围内的规定的值。

[0117] 此外,在另一实施方式中,相对于天冬氨酸的等电点2.77,调整为 ± 2.50 、优选为 ± 2.00 、更优选为 ± 1.50 , ± 1.00 , ± 0.90 、进而更优选为 ± 0.80 、尤其优选为 ± 0.70 、 ± 0.60 、 ± 0.50 、 ± 0.40 、 ± 0.30 、 ± 0.20 或 ± 0.10 、特别优选为 ± 0.09 、 ± 0.08 、 ± 0.07 、 ± 0.06 、 ± 0.05 、 ± 0.04 、 ± 0.03 、 ± 0.02 或 ± 0.01 的范围,最优选为天冬氨酸的等电点即2.77。根据此种实施方式,由于通过以天冬氨酸的等电点2.77为基准对溶液(S)的pH进行调整来进行工序(p),因此由于天冬氨酸与天冬氨酸以外的各种杂质的等电点的不同,能够在保持天冬氨酸的 β 型晶体的高回收率的同时有效果地从溶液(S)中减少或去除所述各种杂质。

[0118] 关于添加至溶液(S)中的酸或碱的量,只要在考虑到包含溶液(S)的最初pH值及目标pH值在内的各条件的基础上适宜地进行调节即可,并无特别限定。在若干实施方式中,相对于溶液(S)中的天冬氨酸约100质量份,添加至溶液(S)中的酸或碱的量例如可以约50质量份~约200质量份、或约60质量份~约150质量份的范围设定。

[0119] 进而,在特定的实施方式中,为了促进天冬氨酸的 β 型晶体的生长,工序(p)可在规定的晶种的存在下进行,在晶种的存在下进行工序(p)的情况下,只要在溶液(S)的pH的调整之前在溶液(S)中添加规定量的晶种即可。关于晶种,只要是促进天冬氨酸的 β 型晶体的

生成的晶种则并无限定,但为了确实地生成所述 β 型晶体,优选为包含天冬氨酸的 β 型晶体。此外,在所述情况下,关于作为晶种的天冬氨酸的 β 型晶体,晶种不一定需要以高纯度进行精制,除含有天冬氨酸的 β 型晶体外还含有杂质的粗晶体试样即可。例如,也可将通过生物来源试样或其浓缩物作为起始材料,不添加晶种而实施等电点晶化(工序(p))而生成的天冬氨酸的粗晶体试样用作晶种。

[0120] 此外,溶液(S)中的晶种的量只要根据其他晶化条件适宜设定即可,并无特别限定。例如,在特定的实施方式中,相对于溶液(S)中的天冬氨酸或其盐约100质量份,可将约0.001质量份~约5.00质量份、优选为约0.001质量份~约4.00质量份的范围,在另一实施方式中,例如约0.01质量份~约3.00质量份、优选为约0.01质量份~约2.50质量份、特别优选为约0.01质量份~约2.00质量份的晶种添加至溶液(S)中。但是,在本发明中,向溶液(S)中添加晶种本来便并非必需。如后述的实施例所示那样,即便不添加晶种,也能够工序(q)中生成所期望的天冬氨酸的 β 型晶体,且能够经由后续的工序(r)而最终生产所期望的天冬氨酸的 α 型晶体。

[0121] 在工序(p)中,在向溶液(S)中添加酸或碱时,有时会产生稀释热或溶解热等反应热,为了避免此情况,且实现均匀的晶化反应,阶段性地添加酸或碱合适。此外,并无特别限定,可在工序(p)中的溶液(S)的pH调整后不久,由于所述反应热的产生而导致溶液(S)的温度上升的情况下,散热至常温,进而冷却至 2°C ~ 10°C 的温度范围(例如约 4°C)。但是,这些散热工序或冷却工序并非是对本发明规定的天冬氨酸或其盐的晶体型的生成或杂质的去除带来影响的要素,并非是本发明的必需的构成要素。

[0122] 进而,在工序(p)中向溶液(S)中添加酸或碱时,虽并不一定为必需,但也可采用将溶液(S)的温度控制在规定的温度范围内的实施方式。在所述实施方式中,可将溶液(S)的温度例如控制在约 30°C ~约 190°C 、优选为约 35°C ~约 150°C 、更优选为约 40°C ~约 110°C 、进而优选为约 45°C ~约 105°C 、进而更优选为约 50°C ~约 105°C 的范围。进而,在常压条件下对溶液(S)的温度进行控制的情况下,可控制在约 45°C ~约 100°C ,优选为约 50°C ~约 100°C ,更优选为约 60°C ~约 100°C 、进而优选为约 65°C ~约 100°C ,进而更优选为约 70°C ~约 100°C 、特别优选为约 75°C ~约 100°C 、最优选为约 78°C ~约 100°C 的范围。根据将溶液(S)的温度控制在此种规定的温度范围内的实施方式,能够再现性良好地制造均匀的品质的天冬氨酸,特别是越是接近 100°C 的温度范围,越可期待以更高的水平减少天冬氨酸以外的氨基酸的效果,因此能够优选地采用将溶液(S)的温度控制在所述各种温度范围的实施方式。进而,在将溶液(S)的温度控制在规定的温度范围时,也可采用例如控制在约 30°C ~约 100°C 、优选为约 30°C ~约 80°C 、更优选为约 40°C ~约 70°C 等比较低温区域的实施方式。根据此种实施方式,例如,在溶液(S)中包含的天冬氨酸或其盐以外的混入成分的比例比较少等的情况下,可将投入至工序中的能量减少至必要最低限度的水平,实现更有效率的工艺,因此能够优选地采用。

[0123] 如上所述,当在溶液(S)中将溶液(S)的pH调整为酸性区域中的规定的pH值,生成天冬氨酸的 β 型晶体时,天冬氨酸以外的大部分杂质残存于溶液(S)的液体组分(即,相对于粗晶体固体组分的上清液)中。因此,在工序(p)中,在溶液(S)中生成天冬氨酸的 β 型晶体后,从溶液(S)中分离包含所生成的 β 型晶体的组分,由此可将混入至溶液(S)中的大部分杂质去除。

[0124] 在本发明中,关于从溶液(S)中分离所述包含所生成的 β 型晶体的组分的方法,只要是将残存于溶液(S)的液体部分中的杂质的至少一部分去除的形态,则可并无特别限定地利用。在若干实施方式中,例如可采用:i)利用抽吸等方法将包含在溶液(S)中生成的天冬氨酸的 β 型晶体的至少一部分的组分分离的方法、ii)在使溶液(S)中生成的粗晶体组分(固体组分)沉降等的基础上利用抽吸等方法将上清液体部分去除,并采集包含残存的天冬氨酸的 β 型晶体的至少一部分的组分的方法。

[0125] 此外,在所述情况下,只要是将残存于溶液(S)的液体部分中的杂质的至少一部分去除的形态,则可理解为天冬氨酸的精制的目的在一定程度上已实现,因此,不排除杂质的一部分进入在工序(p)中获取的包含天冬氨酸的 β 型晶体的至少一部分的组分中。即便在工序(p)中相当量的杂质进入包含所述天冬氨酸的 β 型晶体的至少一部分的组分中,也可通过经由后续的工序(q)而期待进一步减少或去除杂质。

[0126] 进而,在特定的实施方式中,也可采用如下方法:利用蒸发、过滤、抽吸过滤、真空干燥等各种固液分离法,从生成天冬氨酸的 β 型晶体的溶液(S)中分离包含天冬氨酸的 β 型晶体的粗晶体组分的方法。根据采用此种固液分离法的实施方式,可几乎完全去除残存杂质的上清液部分,从而可有效去除杂质,因此可大幅减轻杂质向所获取的包含天冬氨酸的 β 型晶体的粗晶体组分中的进入,因此可在本发明中优选地采用所述实施方式。

[0127] 此外,对于从溶液(S)中分离出的“包含天冬氨酸的 β 型晶体的至少一部分的组分”或“包含天冬氨酸的 β 型晶体的粗晶体组分”,可任意地进行使用了水等溶媒的清洗工序及之后的干燥工序,也可多次反复进行这些清洗工序与干燥工序的任意的组合。

[0128] 以上,对在本发明的特定的实施方式中能够在工序(q)之前采用的工序(p)进行了详细叙述,但在采用了在工序(q)之前进行工序(p)的实施方式的情况下,在以下所详细叙述的工序(q)中,可使用工序(p)中生成的包含所述天冬氨酸的 β 型晶体的组分或粗晶体组分来准备“包含天冬氨酸的 β 型晶体的晶体组分(X)的浆料”。

[0129] <工序(q)>

[0130] 接着,对工序(q)进行说明。

[0131] 工序(q)如上所述是“准备包含天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)的浆料”。

[0132] 此处,“包含天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)”只要照字义进行解释即可,“天冬氨酸的 β 型晶体”及“杂质”的术语意义如以上所说明那样。但是,作为“包含天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)”,并不一定限定于利用所述工序(p)获取的“包含天冬氨酸的 β 型晶体的至少一部分的组分”或“包含天冬氨酸的 β 型晶体的粗晶体组分”或者对其实施规定的处理而得的组分,在其他流程中获取的晶体试样也可无限定地供试于工序(q)中。

[0133] 此外,关于工序(q)中的“包含天冬氨酸的 β 型晶体与至少一种杂质的晶体组分(X)”,在工序(p)或其他流程中获取的规定的试样已经具有浆料的形态,且能够供试于后续的工序(r)中的情况下,在不实施任何处理的情况下直接作为“晶体组分(X)的浆料”而准备,并直接供试于工序(r)中的形态也包含于工序(q)中的“准备晶体组分(X)的浆料”中。

[0134] 另一方面,也可在利用工序(p)或其他流程而获取的规定的试样在获取其的时点为粗晶体的悬浮液或浆料的形态的情况下,利用蒸发、过滤、抽吸过滤、真空干燥等各种固

液分离法分离为上清液与粗晶体组分,对分离出的粗晶体组分任意地实施利用水等溶媒的清洗处理、干燥处理,将所获得的粗晶体组分再悬浮于水等溶媒中,由此准备“晶体组分(X)的浆料”。进而,在预先获取的试样例如为粗晶体的固体物质或半固体物质等的形态、且并非浆料的形态的情况下,通过将所述试样悬浮于水等任意的溶媒中来准备“晶体组分(X)的浆料”也当然包含于工序(q)中。进而此外,即便预先获取的试样已经是浆料的形态,通过将如下粗晶体再悬浮于水等溶媒中来准备“晶体组分(X)的浆料”也包含于工序(q)中,所述粗晶体是通过利用各种固液分离法分离出固体组分(粗晶体组分)后,对分离出的固体组分(粗晶体组分)任意地实施清洗处理或干燥处理而获取。或者,也可准备将预先获取的粗晶体浆料的试样进一步利用水等溶媒进行稀释而得的物质作为“晶体组分(X)的浆料”,此种流程也包含于工序(q)中。

[0135] 即,工序(q)中的“晶体组分(X)的浆料”只要照字义进行解释即可,只要理解为意指相对于晶体成分完全溶解而成的晶体溶液,在溶媒中晶体成分超过饱和溶解度而过剩地存在,且晶体粒子悬浮于溶媒中的混合物的词语即可。晶体成分的饱和溶解度也依赖于温度等,因此无法一概而论,浆料中的晶体组分(X)的浓度例如可设定为约10w/v%~70w/v%,优选为约15w/v%~60w/v%,更优选为约20w/v%~50w/v%。但是,并不限定于这些范围。此外,溶媒的种类并无特别限定,但就操作容易性的观点而言,优选为水(例如离子交换水、纯水、超纯水)。

[0136] 在工序(q)中使用包含天冬氨酸的 β 型晶体的粗晶体的固体物质来准备晶体组分(X)的浆料的实施方式中,也可将所述粗晶体的固体物质悬浮于水等规定的溶媒的一定量中,制备所述各种浓度范围的粗晶体浆料,由此准备晶体组分(X)的浆料。在所述情况下,优选为通过将所述粗晶体的固体物质悬浮于实质上包含水的溶媒中来制备晶体组分(X)，“实质上包含水的溶媒”的意义意指不排除水以外的溶媒物质的不可避免的混入。

[0137] 工序(q)中的“晶体组分(X)的浆料”除能够包含天冬氨酸的 β 型晶体外,还能够包含应利用后续的工序(r)去除或减少的杂质。可谓“晶体组分(X)的浆料”能够包含的杂质是固有地混入至应作为工序(r)中的精制的对象的粗晶体试样中的物质,因此其种类或混入量并无限定。

[0138] 此外,如对溶液(S)进行说明的那样,混入至晶体组分(X)或其浆料中的杂质的量越小越优选,但在晶体组分(X)或其浆料源自生物来源试样或其浓缩物等的情况下,设想有菌体或培养基来源的天冬氨酸以外的各种氨基酸或其盐、各种有机酸或其盐、蛋白质、碳水化合物或糖质等的混入。

[0139] 关于所述方面,在特定的实施方式中,工序(q)中的“晶体组分(X)的浆料”源自生物来源试样或其浓缩物等,更具体而言,能够包含下述的成分组成。

[0140] (i) 能够形成粗晶体浆料的浓度(例如约0.05M~约4.5M、约0.8M~约4.0M、约1.0M~约3.5M)的天冬氨酸;

[0141] (ii) 包含选自由谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种的天冬氨酸以外的氨基酸或其盐(浓度例如为约0.05mM~约1.0M、约0.1mM~约1.0M、约1mM~约1.0M、约1mM~约800mM、约1mM~约500mM、约1mM~约100mM);以及

[0142] (iii) 包含选自由丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸、富马酸及它们的盐所组成的群组中的至少一种的有机酸或其盐(浓度例如为约0.05mM~约1.0M、约0.1mM~约1.0M、约1mM~

约1.0M、约1mM~约800mM、约1mM~约500mM、约1mM~约100mM)。

[0143] 如以上所述,例示出工序(q)的若干实施方式,但在工序(q)中,只要准备能够供试于后续的工序(r)中的“晶体组分(X)的浆料”即可,在所述术语的字义的范围,其具体的形态并不受任何限定。

[0144] <工序(r)>

[0145] 工序(r)是对工序(q)中准备的“晶体组分(X)的浆料”进行加热,使所述浆料中包含的天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体,接着获取包含所述 α 型晶体的天冬氨酸的晶体组分(Y)的工序。

[0146] 此外,工序(r)中的“对所述浆料进行加热,使所述天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体”的术语是起因于对晶体组分(X)的浆料的加热处理而产生所述浆料中的天冬氨酸的从 β 型晶体向 α 型晶体的晶体变化的术语,是不仅包含在对所述浆料的加热处理的过程中产生所述晶体变化的形态,而且也可包含在所述加热处理之后(例如放冷或冷却处理的过程中或之后)产生所述晶体变化的形态的概念。

[0147] 在工序(r)中,对晶体组分(X)的浆料进行加热时的加热温度、加热时间、加压条件等条件只要产生所期望的晶体变化,则并无特别限定。加热温度例如可设定为约60°C~约190°C、约61°C~约190°C、约62°C~约190°C、约63°C~约190°C、约64°C~约190°C、约65°C~约190°C、优选为约65°C~约150°C,更优选为约65°C~约110°C、约66°C~约110°C、约67°C~约110°C,进而更优选为约68°C~约110°C、约69°C~约110°C的范围。此外,在常压条件下进行加热的情况下,加热温度例如可设定为约60°C~约100°C、约61°C~约100°C、约62°C~约100°C、约63°C~约100°C、约64°C~约100°C,更优选为约65°C~约100°C、约66°C~约100°C、约67°C~约100°C,进而更优选为约68°C~约100°C、约69°C~约100°C的范围。

[0148] 进而在另一实施方式中,也可采用比较低的温度区域的加热温度,例如可采用约30°C~约190°C、约35°C~约190°C、约36°C~约190°C、约37°C~约190°C、约38°C~约190°C、约39°C~约190°C、约40°C~约190°C、优选为约30°C~约150°C、约35°C~约150°C、约36°C~约150°C、约37°C~约150°C、约38°C~约150°C、约39°C~约150°C、约40°C~约150°C、约60°C~约150°C、更优选为约30°C~约110°C、约35°C~约110°C、约36°C~约110°C、约37°C~约110°C、约38°C~约110°C、约39°C~约110°C、约40°C~约110°C、约60°C~约110°C的温度范围,进而,在常压条件下进行加热的情况下,也可采用约30°C~约100°C、约35°C~约100°C、约36°C~约100°C、约37°C~约100°C、约38°C~约100°C、约39°C~约100°C、约40°C~约100°C的温度范围。

[0149] 进而此外,在若干实施方式中,加热温度例如也可设定为约70°C~约100°C、约75°C~约100°C、约78°C~约100°C、约80°C~约100°C、约85°C~约100°C、约88°C~约100°C、约90°C~约100°C、约95°C~约100°C的范围。在常压条件下进行加热的情况下,越是更接近100°C的温度范围,越能够以高水平减少或去除谷氨酰胺或丙氨酸等天冬氨酸以外的氨基酸的杂质,因此可优选地采用基于这些温度范围的实施方式。

[0150] 进而,加热时间只要根据晶体组分(X)的浆料的性质或加热条件等适宜设定在产生所期望的晶体变化的范围即可,并无特别限定。一般而言,在常压条件下进行加热的情况下,越是更接近100°C的加热温度,越容易在比较短的时间内从 β 型晶体生成 α 型晶体,另一方面,在采用比较低的加热温度的情况下,有从 β 型晶体至生成 α 型晶体为止需要比较长的

加热时间的倾向。例如,作为加热时间的下限值,可设定为在试样的温度达到规定的加热温度后例如5分钟以上,优选为约10分钟以上、约15分钟以上、约30分钟以上。在另一实施方式中,也可将加热时间设为在试样的温度达到规定的加热温度后例如约1小时以上、约2小时以上、约3小时以上,以确实地获得天冬氨酸的 α 型晶体。此外,关于加热时间的上限值,只要设定为根据各种条件生成所期望的量的天冬氨酸的 α 型晶体即可,并无特别限定,例如可设为约20小时、约15小时、约10小时、约5小时。

[0151] 此外,将上文所述的加热时间的各下限值与各上限值任意地组合而得的各数值范围是能够在特定的实施方式中采用的加热时间的范围,且在本说明书中作为实施方式而明示。此外,工序(r)中的对晶体组分(X)的浆料的加热只要能够从 β 型晶体生成 α 型晶体,则也可在加压条件下进行。

[0152] 如上所述,在工序(r)中,对晶体组分(X)的浆料的加热处理完成后,并无特别限定,但也可将试样放置至常温,进而冷却至 $2^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 的温度范围(例如约 4°C)。此外,如上所述,不仅是在加热处理的过程中产生晶体变化的形态,在加热处理后如此将晶体试样放冷或冷却的期间产生晶体变化的形态当然也能够包含于本发明中。

[0153] 如以上所述,在工序(r)中,对在工序(q)中准备的“晶体组分(X)的浆料”进行加热,使所述浆料中包含的天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体。

[0154] 在晶体组分(X)的浆料中,在利用所述加热处理生成天冬氨酸的 α 型晶体后,获取包含所述 α 型晶体的粗晶体组分(Y)。

[0155] 此处,“获取包含天冬氨酸的 α 型晶体的粗晶体组分(Y)”的意义如下述那样。

[0156] 如上所述,在晶体组分(X)的浆料中,当利用加热处理使天冬氨酸的 β 型晶体变化为 α 型晶体时,混入至浆料中的杂质的至少一部分成为溶解于液体组分(即,相对于粗晶体固体组分而言的上清液)中的状态。

[0157] 因此,在工序(r)中,通过从利用所述加热处理生成天冬氨酸的 α 型晶体的晶体浆料整体中分离至少包含所生成的 α 型晶体的晶体组分,可去除混入至晶体组分(X)或其浆料中的大部分杂质。

[0158] 此处,从实施了加热处理的浆料整体中分离包含所生成的 α 型晶体的晶体组分的方法,只要是将所述浆料中的液体部分中残存的杂质的至少一部分去除的形态即可,并无特别限定。在若干实施方式中,例如,能够采用利用抽吸等方法将包含在浆料中生成的天冬氨酸的 α 型晶体的至少一部分的组分分离的方法、在对晶体组分(固体组分)进行沉降或离心分离等后,利用抽吸等方法去除上清液体部分,采集残留的包含天冬氨酸的 α 型晶体的至少一部分的组分的方法。此外,在所述情况下,只要是上清液体部分中残存的杂质的至少一部分被去除的形态,则可谓天冬氨酸的精制在一定程度上实现,因此不排除杂质的一部分进入所获取的包含天冬氨酸的 α 型晶体的至少一部分的组分中。

[0159] 进而,在另一实施方式中,能够采用对于生成了天冬氨酸的 α 型晶体的晶体浆料,利用蒸发、过滤、抽吸过滤、真空干燥等各种固液分离法将包含天冬氨酸的 α 型晶体的晶体组分分离的方法。根据此种采用固液分离法的实施方式,可几乎完全去除残存杂质的上清液体部分,从而可有效果地去除杂质,因此可显著减轻杂质向所获取的包含天冬氨酸的 α 型晶体的晶体组分的进入。因此,在本发明中优选地采用所述实施方式。

[0160] 如以上所述,在工序(r)中,制造作为目标的天冬氨酸的 α 型晶体。

[0161] <其他工序或条件等>

[0162] 工序(p)、工序(q)及工序(r)的至少一部分或全部只要根据欲制造的天冬氨酸的 α 型晶体的量,利用适当的器具或装置来执行即可。例如,工序(p)中的等电点晶化、工序(r)中的加热处理只要适宜地选择并利用任意的加热装置即可。具体而言,只要根据作为目标的制造规模适宜地选择即可,例如,在以实验室规模的制造为目的的情况下,并无特别限定的主旨,也可利用在后述的实施例中也采用的市售的烧杯或热搅拌器。另一方面,在以工业规模的制造为目的的情况下,可利用通用及专用的反应器,或者设计为构成设备的反应槽或加热装置,并利用它们执行工序(p)、工序(q)及工序(r)的至少一部分或全部。即,本发明的方法也包含利用实验室规模的各种装置的组合、各种反应器或加热装置等的组合、大规模的制造设备等各种结构来实现的实施方式。

[0163] 进而,虽并不一定为必需,但本发明的方法可任意地包含如下工序:通过利用目视或显微镜的观察和/或X射线衍射法对针对进行工序(p)之后的溶液(S)、利用工序(p)获取的晶体组分(X)等中间生成物生成 β 型柱状晶体进行确认。进而,本发明的方法也可任意地包含如下工序:利用如上所述的方法对针对在工序(r)中实施了加热处理后的粗晶体浆料和/或利用工序(r)获得的晶体组分(Y)生成 α 型板状晶体进行确认。

[0164] 进而此外,关于本发明的方法,并不一定为必需,但在工序(p)~工序(r)的全部或一部分中,也可如后述的实施例中所示那样,包含利用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)等各种化学分析法在任意的时点对试样中的杂质的残存量、残存率、去除率等进行监视的工序。

[0165] 以上,对本发明的具体的实施方式进行了详细叙述,但当然,本发明并不限定于所述实施方式。在不脱离本发明的主旨的范围内,能够对各结构、要素及特征采用各种改变、修正、组合。

[0166] 此外,在本发明中,“包含”、“含有”及“具有”的各词语只要并无特别说明,则不排除这些词语作为宾语提及的要素以外的要素的存在,这些术语是混用的。

[0167] 另外,在本说明书中,“~”意指“~”的记载之前的值以上且“~”的记载之后的值以下。此外,在本说明书所记载的数值范围及数值中,在记载有词“约”的词语的情况下,除所述词语外的数值范围及数值当然也在本说明书中明示为能够构成本发明的实施方式的要素。

[0168] 以下,示出实施例及比较例,以对本发明更具体地进行说明,但本发明并不限定于实施例。

[0169] 实施例

[0170] (试验例1)

[0171] 本试验例为在规定的反应培养基中培养能够产生天冬氨酸的转基因谷氨酸棒状杆菌(以下有时称为产生温和气单胞菌丝氨酸蛋白酶(*Aeromonas sobria* serine protease, Asp)的棒状杆菌),以由此获得的培养物的发酵澄清液作为起始材料,大致按照图1所示的流程制造出天冬氨酸的 α 型晶体的例子。以下,对各流程进行详细叙述。

[0172] (1) 浓缩/活性炭处理

[0173] 在规定的反应培养基中培养将能够参与L-天冬氨酸代谢途径的酶基因导入并改变的重组型谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)菌株,由此在反应培养基中生

成天冬氨酸。将从所获得的培养物中去除菌体后的发酵澄清液 (S) 5L 供试于以下的工序流程中。

[0174] 使用闪蒸器 (东京理化器械股份有限公司制造, 型号 MF-10B)、隔膜真空泵 (东京理化器械股份有限公司制造, 型号 EVP-1200) 及真空控制器 (东京理化器械股份有限公司, 型号 NVC-2200) 对所述发酵澄清液 (S) 5L 实施了减压浓缩。接着, 在所获得的浓缩液中加入相当于每 100g 的天冬氨酸为 4g 的粉末活性炭 (大阪燃气化学股份有限公司制造的“卡巴拉芬 (CARBORAFFIN)”), 在常温下搅拌 70 分钟后, 利用抽吸过滤法分离为活性炭与滤液 (A) 1400mL, 将如此获得的滤液 (A) 1400mL 供试于后述的等电点晶化中。

[0175] 此外, 由于 5L 的所述发酵澄清液 (S) 浓缩于 1400mL 的滤液 (A) 中, 因此所述滤液 (A) 中的天冬氨酸最终浓度在计算上被估计为 2.5M。

[0176] (2) 等电点晶化

[0177] 在所述滤液 (A) 中预先添加利用后述的方法获得的粗晶体 0.3g 作为晶种, 在常温且搅拌下向所获得的溶液中缓慢添加硫酸 300g, 由此将所述溶液的 pH 调整至相当于天冬氨酸的等电点的 2.77 附近。此外, 所述溶液的 pH 的测定中使用了 pH 计 (堀场制作所股份有限公司制造, 型号 D-71)。利用所述溶液的 pH 调整的等电点晶化处理的结果, 在溶液中生成了晶体组分。此外, 在溶液的 pH 调整时, 由于由中和反应引起的发热, 温度上升至 70°C 左右, 因此一边进行搅拌一边放冷至常温, 接着停止搅拌并在 4°C 下进行冷却。

[0178] 此外, 作为晶种而添加至所述滤液 (A) 中的粗晶体是预先如以下那样获取。即, 对于所述同样地获得发酵澄清液来源的浓缩液 (滤液), 除不添加晶种以外, 进行与所述同样的等电点晶化并生成粗晶体, 预先选择生成了尽可能大的柱状晶体的试样, 并将其用作所述晶种。

[0179] (3) 晶体分离

[0180] 对利用所述等电点晶化获取的晶体生成物进行利用抽吸过滤法的固液分离, 从而获取固体晶体组分。对于所述固体晶体组分, 通过从上方喷洒超纯水 1750mL 而进行清洗, 以将附着于晶体表面的杂质去除。进而, 反复进行四次同样的清洗工序, 从而获取湿粗晶体。将所获得的湿粗晶体转移至不锈钢方形槽中, 并投入至恒温干燥机 (亚速旺 (AS ONE) 股份有限公司制造, 型号 OFW-300B) 中, 在 55°C 下使其干燥。进而, 使用混合器 (阪和股份有限公司制造, 型号 BKE-07) 对干燥后的晶体试样进行粉碎, 并将晶体试样回收至塑料容器中。所获得的粗晶体试样 (B) 的重量为 460g。

[0181] (4) 加热处理 (热再浆料化处理)

[0182] 利用电子天平 (岛津制作所股份有限公司制造, 型号 UW6200H) 从所述 (3) 一项中获取的粗晶体 (B) 的试样中测定取得 90.0g, 并将其以最终容量成为 300mL 的方式悬浮于超纯水中, 从而制备 30% 粗晶体浆料。使用热搅拌器 (亚速旺 (AS ONE) 股份有限公司制造, 型号 HS-360H) 对所述粗晶体浆料在烧杯内一边进行搅拌一边进行加热。在试样温度达到 100°C 后 10 分钟后停止加热, 一边对试样进行搅拌一边冷却至常温。然后, 停止搅拌, 在 4°C 下进行冷却。

[0183] (5) 晶体分离

[0184] 对于如上所述那样获得的热再浆料化液体, 利用抽吸过滤法进行固液分离处理, 并分离为上清液与固体晶体组分。对于所获得的固体晶体组分, 从上方喷洒超纯水 100mL,

对晶体进行清洗以去除附着于表面的杂质。将清洗后的湿粗晶体转移至不锈钢方形槽中,并将其投入至恒温干燥机(亚速旺(AS ONE)股份有限公司制造,型号OFW-300B)中,在55℃下进行干燥。进而,使用混合器(阪和股份有限公司制造,型号BKE-07)对干燥后的晶体试样进行粉碎,并将晶体试样回收至塑料容器中。所获得的晶体(C)的重量为71.4g。

[0185] (6) 各种分析

[0186] 在所述各工序中,分别从发酵澄清液(S)、浓缩液、滤液(A)、粗晶体(B)、晶体(C)中采集一部分,并供试于各种氨基酸分析及各种有机酸分析中。此外,对于粗晶体(B)及晶体(C),通过将其一部分以100g/L的浓度溶解于氢氧化钠(富士胶片和光纯药股份有限公司制造)水溶液中而制成分析试样。

[0187] 具体而言,在各种氨基酸分析中,使用pH2.2的柠檬酸钠缓冲液(富士胶片和光纯药股份有限公司制造),对于发酵澄清液(S)以1000倍进行稀释,对于浓缩液及滤液(A)以2500倍~4000倍进行稀释,对于粗晶体(B)及晶体(C)以1000倍进行稀释,并使用稀释高效液相色谱仪(岛津制作所股份有限公司,卓越(Prominence))对各稀释试样进行分析。另一方面,在各种有机酸分析中,使用0.75mM硫酸(富士胶片和光纯药股份有限公司制造),对于发酵澄清液(S)以100倍进行稀释,对于浓缩液及滤液(A)以250倍~400倍进行稀释,对于粗晶体(B)及晶体(C)以20倍进行稀释,并使用高效液相色谱仪(岛津制作所股份有限公司制造,卓越(Prominence))对各稀释试样进行分析。

[0188] 此外,在正式加热处理(热再浆料化法)的过程中、以及在下述从(b)至(d)的各时点采集试样的一部分,并利用显微镜(奥林巴斯(Olympus)股份有限公司制造,型号CX41LF)对所采集的各试样进行观察。

[0189] (b) 加热开始后,试样温度达到70℃的时点(晶体变化前),

[0190] (c) 加热开始后,试样温度达到77℃的时点(晶体变化中),

[0191] (d) 加热开始后,试样温度达到100℃的时点(晶体变化后)。

[0192] 进而,对于粗晶体(B)及晶体(C)的各试样,利用X射线衍射(理学(Rigaku)股份有限公司制造,X射线衍射装置智慧实验室(SmartLab))并按照常规方法对各试样的晶体结构进行分析。

[0193] <结果>

[0194] 将氨基酸分析及有机酸分析的结果示于表1及表2中,以及图2A~图2C及图3A~图3C中。

[0195] [表1]

[0196]

| | 发酵澄清液 (S) | | 浓缩液 (活性炭处理/抽吸过滤前) | | 滤液 (A) (供试于等电点晶化中的试样) | | 粗晶体 (B) | | 晶体 (C) (最终生产物) | |
|------------|----------------|--------------|----------------------|--------------|--------------------------|--------------|----------------|--------------|-------------------|--------------|
| | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) |
| 天冬氨酸 (Asp) | 669.00 | 655.40 | 2312.57 | 634.35 | 2366.51 | 632.92 | 5.86 | 527.19 | 7.43 | 530.13 |
| 谷氨酸 (Glu) | 59.28 | 58.07 | 202.70 | 55.60 | 215.27 | 57.57 | 0.01 | 1.34 | 0.02 | 1.24 |
| 丙氨酸 (Ala) | 195.33 | 191.36 | 667.10 | 182.99 | 699.99 | 187.21 | 0.03 | 2.99 | 0.02 | 1.64 |
| 缬氨酸 (Val) | 34.74 | 34.04 | 117.54 | 32.24 | 122.67 | 32.81 | 0.01 | 0.93 | 0.01 | 0.78 |
| 丙酮酸 (Pyr) | 1.73 | 1.70 | 1.86 | 0.51 | 4.94 | 1.32 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 苹果酸 (Mal) | 80.62 | 78.98 | 283.09 | 77.65 | 284.43 | 76.07 | 0.08 | 7.45 | 0.01 | 0.94 |
| 乙酸 (Ace) | 105.69 | 103.54 | 349.47 | 95.86 | 339.88 | 90.9 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 琥珀酸 (Suc) | 23.74 | 23.26 | 77.86 | 21.36 | 68.56 | 18.34 | 0.01 | 1.14 | 0.00 | 0.00 |
| 富马酸 (Fum) | 7.62 | 7.47 | 31.22 | 8.56 | 30.61 | 8.19 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |

[0197]

[表2]

※粗晶体 (B) 及晶体 (C) 以 1 g/10 mL 对分析试样进行调整, 并将其供试于 HPLC 分析中进行测定。

| | 利用等电点晶化的去除率 (A-B) / A (%) | 利用热再浆料化处理的去除率 (B-C) / A (%) | 等电点晶化/热再浆料化整体的去除率 (A-C) / A (%) | 残存率 C/A (%) |
|------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------|
| [0198] Asp | 16.71% | -0.46% | 16.24% | 83.76% (回收率) |
| Glu | 97.67% | 0.17% | 97.85% | 2.15% |
| Ala | 98.40% | 0.72% | 99.12% | 0.88% |
| Val | 97.17% | 0.46% | 97.62% | 2.38% |
| Pyr | 100.00% | 0.00% | 100.00% | 0.00% |
| Mal | 90.21% | 8.56% | 98.76% | 1.24% |
| Ace | 100.00% | 0.00% | 100.00% | 0.00% |
| Suc | 93.78% | 6.22% | 100.00% | 0.00% |
| Fum | 99.88% | 0.12% | 100.00% | 0.00% |

| | 发酵澄清液 (S) | 浓缩液 | 滤液 (A) | 粗晶体 (B) | 晶体 (C) |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|
| [0199] 总固体 | 187.79 (g/L) | - | - | 99.76% | 100.00% |
| Asp总量 (mmol) | 655.40 | 634.35 | 632.92 | 527.19 | 530.13 |
| Asp浓度 | 89.04 (g/L) | 307.80 (g/L) | 314.98 (g/L) | 0.78 (g/g) | 0.99 (g/g) |
| Asp纯度 (%) ^{#1} | 47.42 | - | - | 78.19 | 99.00 |
| Asp回收率 (%) ^{#2} | 100 | 96.79 | 96.57 | 80.44 | 80.89 |

[0200] #1: 各Asp浓度的值/各总固体的百分比

[0201] #2: 各Asp总量mmol/发酵澄清液 (S) 中Asp总量655.40mmol的百分比

[0202] 如图2A ~ 图2C所示, 相对于供试于等电点晶化的滤液 (A) 中的天冬氨酸的总量 (632.92mmol), 经由等电点晶化及热再浆料化处理的各精制工序, 天冬氨酸以高比例得到保持, 最终可以83.76%的回收率 (即, 约16%左右的损失) 制造天冬氨酸晶体 (表2、图2C)。另一方面, 关于供试于等电点晶化中的滤液 (A) 中所混入的一定量的天冬氨酸以外的各种氨基酸、即谷氨酸 (57.57mmol)、丙氨酸 (187.21mmol) 及缬氨酸 (32.81mmol), 相对于滤液 (A) 中的各成分的量, 通过经过等电点晶化的精制工序而去除超过97%的比例, 进而通过经过热再浆料化处理的精制工序而可分别依次最终去除97.85%、99.12%及97.62%的各比例 (表2、图3A ~ 图3C)。

[0203] 进而, 对于在滤液 (A) 中混入的一定量的各种有机酸即丙酮酸 (1.32mmol)、苹果酸 (76.07mmol)、乙酸 (90.9mmol)、琥珀酸 (18.34mmol) 及富马酸 (8.19mmol), 如以下所述利用等电点晶化的精制工序而有效果地去除。即, 对于丙酮酸及乙酸, 经由等电点晶化的精制工序而去除100%, 对于富马酸也去除99.88%, 对于苹果酸及琥珀酸也去除超过90% (表2、图3A)。并且, 对于经过等电点晶化而获得的粗晶体 (B) 中残存的少量的富马酸、苹果酸及琥珀酸, 通过经过进一步的热再浆料化处理的精制工序, 去除100%的乙酸、琥珀酸及富马酸此三种, 对于苹果酸, 仅残存0.94mmol (残存率1.24%)、即滤液 (A) 中含有的总量 (76.07mmol) 中的98.76%被去除, 在最终生产物的晶体 (C) 中天冬氨酸纯度上升至99.00%, 从而获得高纯度的天冬氨酸晶体生成物 (表2、图2A ~ 图2C、图3A ~ 图3C)。

[0204] 此外, 将天冬氨酸粗晶体 (B) 的100g/L溶液与100mM氯化钡 (和光纯药工业股份有限公司制造) 等量混合时, 出现了白浊, 因此掌握到试样中包含硫酸根离子。相对于此, 将晶体 (C) 的100g/L溶液同样地与100mM氯化钡 (和光纯药工业股份有限公司制造) 等量混合时,

未发生白浊,因此掌握到紧跟着等电点的粗晶体(B)中残存的相当量的硫酸根离子也经由热再浆料化处理而被有效果地去除,从而作为最终生产物的晶体(C)几乎不含有硫酸根离子。

[0205] 进而,将在对粗晶体(B)的浆料试样进行加热处理(热再浆料化处理)的过程中对各粗晶体(B)的浆料试样进行拍摄而得的照片示于图4A中。对面左侧的烧杯内的试样是加热处理前的粗晶体(B)的浆料试样,右侧的烧杯内的试样是加热处理后经过规定时间的时点的粗晶体(B)的浆料试样。两种浆料试样均具有如从照片看到那样具有规定的浊度的浆料的外观,但加热处理前的粗晶体(B)的浆料试样(左侧的烧杯)具有白浊色的外观,相对于此,加热处理后的粗晶体(B)的浆料试样(右侧的烧杯)具有黄白浊色的外观。这些外观的差异是由于随着加热处理的时间经过而从白浊色的外观变化为黄白浊色而产生。

[0206] 进而,在所述热再浆料化处理中的规定的时点利用显微镜(奥林巴斯(Olympus)股份有限公司制造,型号CX41LF)对各晶体试样进行观察,结果,在加热开始后试样温度达到70℃的时点,如图4B的照片所示那样观察到微细的柱状的粗晶体。但是,之后,从加热开始后试样温度达到77℃的时点,如图4C的照片所示那样,开始从柱状的粗晶体生成比较大的板状晶体,在加热开始后试样温度达到100℃的时点,如图4D的照片所示那样,几乎所有的柱状粗晶体变化为板状晶体。

[0207] 所述显微镜观察的结果为,在粗晶体(B)中天冬氨酸以 β 型晶体的形态存在,在推测利用之后的加热处理,在晶体(C)中所述晶体型变化为 α 型时,如上所述,利用X射线衍射对粗晶体(B)及晶体(C)进行分析。其结果,在图5A所示的X射线衍射图中,在18.8°、19.7°及25.0°的各衍射角度确认到衍射X射线的峰值时,确认到粗晶体(B)中结晶出的天冬氨酸的晶体型为 β 型晶体,在图5B所示的X射线衍射图中,在21.65°及23.7°的各衍射角度确认到衍射X射线的峰值时,确认到晶体(C)中结晶出的天冬氨酸的晶体型为 α 型晶体。

[0208] 如以上所述,根据本发明的实施方式,示出即便在以利用使用了微生物的发酵法而获取的粗生成物作为起始材料的情况下,也可在保持天冬氨酸的高回收率的同时有效率地去除相当于杂质的其他氨基酸及有机酸以及硫酸根离子等,而且最终可以有用的 α 型晶体的形态来制造高纯度的天冬氨酸。

[0209] (试验例2)热再浆料化温度的研究

[0210] 在试验例1中,将试验试样的数量设为四个,如下述那样变更针对各试验试样的试验条件,除此以外,利用与试验例1相同的方法实施试验。即,相对于试验例1的流程,在本试验例中,对于各试样,将(4)一项“加热处理(热再浆料化法)”中的加热温度变更为70℃、80℃、90℃及100℃。此外,各试样中采用的加热时间如以下的结果所叙述那样。

[0211] <结果>

[0212] 热再浆料化处理的精制工序中的显微镜观察的结果,在以70℃、80℃、90℃及100℃分别进行了加热处理的各试样的任一个中均可见从 β 型晶体向 α 型晶体的变化。

[0213] 更详细而言,在以70℃进行了加热处理的试样中,加热开始后,在试样的温度达到70℃后经过一小时的时点,虽未可见晶体变化,但之后,在冷却至常温的中途确认到晶体变化。进而,在以80℃进行了加热处理的试样中,在试样的温度达到80℃后经过16分钟左右的时点确认到所述晶体变化。进而,在以90℃及100℃分别进行了加热处理的各试样中,在各试样的温度达到各自的加热温度后经过10分钟左右的时点确认到所述晶体变化。如此,根

据以70℃、80℃、90℃及100℃分别进行加热后的试样的结果,在任一试样中均确认到晶体变化,且确认到如下倾向:当加热温度比较高时,至产生晶体变化为止所需的加热时间变短,另一方面,随着加热温度变低,至产生晶体变化为止所需的加热时间变长。

[0214] 接着,将氨基酸分析及有机酸分析的结果示于表3及表4、以及图6、图7及图8A、图8B中。

[0215] [表3]

| | 发酵澄清液 (S) | | 粗晶体 (B) (干燥后) | |
|-----|----------------|--------------|------------------|--------------|
| | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) |
| Asp | 675.17 | 503.58 | 4.77 | 429.64 |
| Glu | 73.01 | 54.45 | 0.02 | 1.49 |
| Ala | 196.88 | 146.85 | 0.03 | 2.95 |
| Val | 23.08 | 17.21 | 0.01 | 0.93 |
| Pyr | 5.16 | 3.85 | 0.00 | 0.04 |
| Mal | 65.32 | 48.72 | 0.07 | 6.68 |
| Ace | 100.05 | 74.62 | 0.00 | 0.00 |
| Suc | 26.95 | 20.10 | 0.01 | 1.31 |
| Fum | 6.60 | 4.92 | 0.00 | 0.01 |

[0216]

[0217]

| | 晶体 (C) 70℃加热 | | 晶体 (C) 80℃加热 | | 晶体 (C) 90℃加热 | | 晶体 (C) 100℃加热 | |
|-----|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|------------------|--------------|
| | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) |
| Asp | 7.33 | 399.19 | 7.31 | 396.18 | 7.19 | 389.30 | 7.21 | 391.01 |
| Glu | 0.02 | 1.08 | 0.02 | 1.02 | 0.02 | 0.92 | 0.02 | 0.90 |
| Ala | 0.02 | 1.28 | 0.02 | 1.11 | 0.02 | 1.01 | 0.02 | 0.98 |
| Val | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Pyr | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Mal | 0.02 | 1.08 | 0.02 | 1.15 | 0.02 | 1.13 | 0.02 | 1.14 |
| Ace | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Suc | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Fum | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

[0218] [表4]

| | 粗晶体 (B) 残存率 (B/S) | 晶体 (C) 残存率 (C/S) | | | |
|-----|-------------------------|---------------------|--------|--------|--------|
| | | 70℃加热 | 80℃加热 | 90℃加热 | 100℃加热 |
| Asp | 85.32% | 79.27% | 78.67% | 77.31% | 77.65% |
| Glu | 2.74% | 1.98% | 1.87% | 1.69% | 1.65% |
| Ala | 2.01% | 0.87% | 0.76% | 0.69% | 0.67% |
| Val | 5.40% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Pyr | 1.04% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Mal | 13.71% | 2.22% | 2.36% | 2.32% | 2.34% |
| Ace | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Suc | 6.52% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Fum | 0.20% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |

[0220] ※相对于发酵澄清液 (S) 中的各成分总量而言的残存率。

[0221]

[0222] 如表3及图6所示,天冬氨酸的量在发酵澄清液 (S)、粗晶体 (B) 及晶体 (C) 中无大的

损失地以高水平推移,在粗晶体(B)中显示出85.32%的回收率,最终可在晶体(C)中以77%~80%的范围回收天冬氨酸(表4、图8A)。

[0223] 另一方面,在发酵澄清液(S)中,天冬氨酸以外的各种氨基酸、即谷氨酸、丙氨酸及缬氨酸如从表3以及图6能理解那样,若与天冬氨酸的总量相比则少但也混入了相当量,经由等电点晶化去除相当量,从而在粗晶体(B)中残存率减少至小于6%(表4、图8B)。进而,这些天冬氨酸以外的氨基酸在晶体(C)中残存率减少至小于2%,特别是对于缬氨酸,在所有的加热处理温度的试样中均被去除100%,其残存率显示出0%(表4、图9)。

[0224] 进而,如从表3及图7中能理解那样,发酵澄清液(S)中混入了相当量的有机酸的一种即丙酮酸、苹果酸、乙酸、琥珀酸及富马酸,但经由等电点晶化去除了相当量。更详细而言,在粗晶体(B)中,苹果酸的残存率虽说比较高,但减少至13.71%,丙酮酸及琥珀酸减少至小于10%,进而,对于富马酸,减少至0.20%,对于乙酸,被完全去除(表4、图8B)。

[0225] 进而,作为应关注的方面,经由热再浆料化处理,在70℃、80℃、90℃及100℃的加热处理中获取的任一晶体(C)中,乙酸、琥珀酸及富马酸全部均被完全去除,且确认到苹果酸的残存,但残存率仅为2.2%~2.4%左右,从而确认到晶体(C)的各试样作为天冬氨酸的精制品而具有高品质(表4、图9)。

[0226] 如以上所述,在试验例2中也显示出以高回收率回收天冬氨酸的 α 型晶体,特别是显示出,当在热再浆料化处理的精制工序中以比较高的温度进行处理时,可在短时间内生成天冬氨酸的 α 型晶体,且可有效果地去除天冬氨酸以外的氨基酸及各种有机酸。

[0227] (评价试验:聚合物化及着色试验)

[0228] 分别使用2g的在试验例2中获取的 β 型粗晶体(等电点晶化后)及通过进行利用100℃的加热处理(热再浆料化法)而获得的 α 型晶体、以及作为对照的市售的天冬氨酸粉末(协和发酵生物股份有限公司制造,高纯度等级),如下述那样进行聚合物化着色试验。

[0229] 将所述各试样2g与85%磷酸(富士胶片和光纯药股份有限公司制造)2mL在60mm玻璃培养皿上进行混合,将其投入至恒温干燥机(亚速旺(AS ONE)股份有限公司制造,型号OFW-300B)中,并以160℃加热16小时~20小时,由此使天冬氨酸聚合物化。利用目视对加热处理后的试样进行观察时,如图10A及图10B所示那样,在等电点晶化后的 β 型粗晶体的试样中确认到强褐色的着色,但在以100℃利用热再浆料化处理而获得的 α 型晶体试样中着色得到抑制,即便与作为对照的高纯度等级的天冬氨酸粉末相比,也保持了毫不逊色的品质。

[0230] (试验例3)

[0231] (1) 浓缩/活性炭处理

[0232] 首先,与试验例1的(1)一项所述的方法同样地,对所述重组型谷氨酸棒状杆菌的发酵澄清液5L进行减压浓缩,获取天冬氨酸浓度被估计为2.5M的浓缩液。接着,对于所获取的浓缩液,加入每100g的天冬氨酸为4g的粉末活性炭(大阪燃气化学股份有限公司制造的“卡巴拉芬(CARBORAFFIN)”),在常温下搅拌60分钟后,利用抽吸过滤法分离为活性炭与滤液(A)。

[0233] (2) 等电点晶化

[0234] 将所述滤液(A)向三个烧杯中分别各分注350mL,分别作为未添加晶种的试样(i)、添加晶种的试样(ii)及添加晶种的试样(iii)而供试于等电点晶化中。具体而言,对于各个试样,在常温、搅拌下缓慢地添加硫酸,并使用pH计(堀场制作所股份有限公司制造的“D-

71”)将各试样溶液的pH调整为天冬氨酸的等电点2.77附近,由此在各试样中使天冬氨酸结晶。此外,所添加的硫酸按未添加晶种的试样(i)、添加晶种的试样(ii)及添加晶种的试样(iii)的顺序分别为86.00g、86.69g及88.90g。此外,对于添加了晶种的试样(ii)及试样(iii),在各溶液的pH通过5.5时,添加了约0.1g的天冬氨酸粗晶体。进而,在进行等电点晶化时,各试样溶液的温度上升至70℃左右,因此一边进行搅拌一边放冷至常温,然后停止搅拌并将各试样冷却至4℃。

[0235] 对各试样(i)~(iii)的各溶液如上所述那样进行等电点晶化时,看出在等电点晶化前各溶液呈透明糖色,但在等电点晶化后变化为淡黄白浊色的溶液,在溶液中结晶出了粗晶体。此外,图11中分别示出等电点晶化前(左侧)及等电点晶化后(右侧)中的试样(i)的各外观照片。

[0236] 对生成有粗晶体的各试样,通过分别进行抽吸过滤法而分离为上清液与粗晶体(固体成分)。对于由此获得的各粗晶体试样,通过从上方喷洒超纯水450mL而将附着于晶体表面的杂质去除。将清洗后的各湿粗晶体试样转移至不锈钢方形槽中,投入至恒温干燥机(亚速旺(AS ONE)股份有限公司制造的“OFW-300B”)中,并以55℃进行干燥。进而,使用混合器(阪和股份有限公司制造的“BKE-07”)对干燥后的各粗晶体试样进行粉碎,并分别回收至塑料容器中。

[0237] 以如上方式获取源自未添加晶种的试样(i)的粗晶体(B1)116.17g、源自添加晶种的试样(ii)的粗晶体(B2)122.31g、及源自添加晶种的试样(iii)的粗晶体试样(B3)116.24g。

[0238] 此外,将所述粗晶体(B1)、粗晶体(B2)及粗晶体(B3)的一部分与试验例1同样地供试于氨基酸分析及有机酸分析中。

[0239] (3) 加热处理(热再浆料化处理)

[0240] 接着,对于所述粗晶体(B1)、粗晶体(B2)及粗晶体(B3)分别使用电子天平(岛津制作所股份有限公司制造的“UW6200H”)各测定取得100.0g。将测定取得的各粗晶体试样分别以最终容量成为334mL的方式悬浮于超纯水中,从而制备30%粗晶体浆料。使用热搅拌器(亚速旺(AS ONE)股份有限公司制造的“HS-360H”)对这些30%粗晶体浆料在烧杯内一边进行搅拌一边进行加热。从各试样的温度达到100℃的时点10分钟后停止加热,接着,一边进行搅拌一边放冷至常温。然后,停止搅拌,将各试样以4℃进行冷却。

[0241] 接着,对于各试样,通过分别进行抽吸过滤法而分离为上清液与晶体组分(固体成分)。对于由此获得的各晶体试样,通过从上方喷洒超纯水100mL而将附着于晶体表面的杂质去除。将清洗后的湿晶体试样转移至不锈钢方形槽中,投入至恒温干燥机(亚速旺(AS ONE)股份有限公司制造的“OFW-300B”)中,并以55℃干燥了一夜。接着,将各晶体试样分别使用药勺制成粉状并回收至塑料容器中。

[0242] 如此获取源自未添加晶种的试样(i)的晶体(C1)93.05g、源自添加晶种的试样(ii)的晶体(C2)88.98g、及源自添加晶种的试样(iii)的晶体试样(C3)93.22g。将所述晶体试样(C1)、晶体试样(C2)及晶体试样(C3)的一部分与试验例1同样地供试于氨基酸分析及有机酸分析中。

[0243] <结果>

[0244] 将各种氨基酸分析及有机酸分析的结果示于表5~表7、以及图12及图13中。详细

而言,表5中示出发酵澄清液(S)、利用减压浓缩处理而获得的发酵澄清液(S)的浓缩液、活性炭处理及抽吸过滤后的滤液(A)、利用等电点处理而获得的粗晶体(B1)~粗晶体(B3)以及利用热再浆料化处理而获得的晶体(C1)~晶体(C3)的各种成分的浓度及总量。进而,表6以及图12及图13中示出粗晶体(B1)~粗晶体(B3)以及晶体(C1)~晶体(C3)各自中的各种成分的残存率。此外,残存率相当于各粗晶体试样或晶体试样中的各成分的总量相对于供试于等电点晶化中的滤液(A)中的各成分的总量之比例(%)的值。此外,表7中示出各试样中的Asp总量、纯度(%)及回收率(%)。

[0245] [表5]

[0246]

| | 发酵澄清液 (S) | | 浓缩液 (活性炭处理/抽吸过滤前) | | 滤液 (A) (350 mL) | | 粗晶体 (B1) | | 粗晶体 (B2) | | 粗晶体 (B3) | |
|-----|----------------|--------------|----------------------|--------------|--------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) |
| Asp | 567.44 | 2837.20 | 2587.87 | 2872.53 | 2730.81 | 955.78 | 7.06 | 819.99 | 6.75 | 825.76 | 6.99 | 812.69 |
| Glu | 41.61 | 208.06 | 190.45 | 211.40 | 200.71 | 70.25 | 0.02 | 2.02 | 0.02 | 2.26 | 0.02 | 2.02 |
| Ala | 96.11 | 480.55 | 441.93 | 490.54 | 461.20 | 161.42 | 0.03 | 3.54 | 0.03 | 3.47 | 0.03 | 3.35 |
| Val | 12.07 | 60.33 | 62.81 | 69.72 | 64.64 | 22.62 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Pyr | 1.02 | 5.11 | 1.60 | 1.77 | 1.60 | 0.56 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Mal | 53.24 | 266.18 | 240.89 | 267.39 | 241.86 | 84.65 | 0.10 | 11.35 | 0.10 | 11.85 | 0.10 | 12.08 |
| Ace | 81.26 | 406.32 | 343.65 | 381.45 | 327.19 | 114.52 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Suc | 42.57 | 212.83 | 194.58 | 215.98 | 140.88 | 49.31 | 0.04 | 4.43 | 0.04 | 4.41 | 0.04 | 4.74 |
| Fum | 7.66 | 38.29 | 34.14 | 37.90 | 35.95 | 12.58 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.02 |

| | 晶体 (C1) | | 晶体 (C2) | | 晶体 (C3) | |
|-----|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) |
| Asp | 7.20 | 670.35 | 7.28 | 647.78 | 7.30 | 680.08 |
| Glu | 0.01 | 1.23 | 0.01 | 1.24 | 0.01 | 1.26 |
| Ala | 0.01 | 1.34 | 0.01 | 1.30 | 0.01 | 1.36 |
| Val | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Pyr | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Mal | 0.01 | 1.00 | 0.01 | 1.31 | 0.01 | 1.08 |
| Ace | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Suc | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Fum | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

※粗晶体 (B) 及晶体 (C) 以 1 g/10 mL 对分析试样进行调整, 并将其供试于 HPLC 分析中进行测定。

[0247]

[表 6]

| | 残存率 (粗晶体 B/过滤液 A) | | | 残存率 (晶体 C/过滤液 A) | | |
|-----|----------------------|----------|----------|---------------------|---------|---------|
| | 粗晶体 (B1) | 粗晶体 (B2) | 粗晶体 (B3) | 晶体 (C1) | 晶体 (C2) | 晶体 (C3) |
| Asp | 85.79% | 86.40% | 85.03% | 70.14% | 67.78% | 71.15% |
| Glu | 2.88% | 3.22% | 2.88% | 1.75% | 1.77% | 1.79% |
| Ala | 2.19% | 2.15% | 2.08% | 0.83% | 0.81% | 0.84% |
| Val | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Pyr | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Mal | 13.41% | 14.00% | 14.27% | 1.18% | 1.55% | 1.28% |
| Ace | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Suc | 8.98% | 8.94% | 9.61% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Fum | 0.16% | 0.32% | 0.16% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |

[0248]

[表 7]

| | 发酵澄清液 (S) | 浓缩液 | 滤液 (A) (350 mL) | 粗晶体 (B1) | 粗晶体 (B2) | 粗晶体 (B3) |
|----------------|-------------|---------------|--------------------|------------|------------|------------|
| 总固体 | - | 734.206 (g/L) | - | 99.67% | 99.65% | 99.73% |
| Asp 总量 (mmol) | 2837.20 | 2872.53 | 955.78 | 819.99 | 825.76 | 812.69 |
| Asp 浓度 | 75.53 (g/L) | 344.45 (g/L) | 363.47 (g/L) | 0.94 (g/g) | 0.90 (g/g) | 0.93 (g/g) |
| Asp 纯度 (%) #1 | - | 46.91% | - | 94.31% | 90.32% | 93.25% |
| Asp 回收率 (%) #2 | - | - | - | 85.79% | 86.40% | 85.03% |

| | 晶体 (C1) | 晶体 (C2) | 晶体 (C3) |
|----------------|------------|------------|------------|
| 总固体 | 100.01% | 99.99% | 100.00% |
| Asp 总量 (mmol) | 670.35 | 647.78 | 680.08 |
| Asp 浓度 | 0.96 (g/g) | 0.97 (g/g) | 0.97 (g/g) |
| Asp 纯度 (%) #1 | 95.99% | 97.01% | 97.00% |
| Asp 回收率 (%) #2 | 70.14% | 67.77% | 71.15% |

#1: 各 Asp 浓度/各总固体的百分比

#2: 各 Asp 总量 (mmol) / 滤液 (A) 350 mL 份的 Asp 总量 (955.78 mmol)

[0249] 如表6及图12所示,相对于供试于等电点晶化中的滤液(A)中的天冬氨酸的总量(955.78mmol),经由等电点晶化及热再浆料化处理的各精制工序,天冬氨酸以高比例得到

保持,最终可在晶体(C1)~晶体(C3)中以67%~71%左右的回收率制造天冬氨酸晶体。另一方面,对于供试于等电点晶化中的滤液(A)中混入的一定量的天冬氨酸以外的各种氨基酸,通过经过等电点晶化的精制工序,谷氨酸(70.25mmol)的残存率减少至3%左右,丙氨酸(161.42mmol)的残存率减少至2%左右,进而,缬氨酸(22.62mmol)在粗晶体(B1)~粗晶体(B3)的任一者中均被完全去除(表6、图12)。进而,粗晶体(B1)~粗晶体(B3)中残存的少量的谷氨酸及丙氨酸通过经过热再浆料化处理的精制工序,而分别依次在晶体(C1)~晶体(C3)中减少至约1.8%及约0.8%的残存率(图12)。

[0250] 进而,对于在滤液(A)中混入的一定量的各种有机酸、即丙酮酸(0.56mmol)、苹果酸(84.65mmol)、乙酸(114.52mmol)、琥珀酸(49.31mmol)及富马酸(12.58mmol),也如表6及图13所示那样有效果地去除。即,对于丙酮酸及乙酸,经由等电点晶化的精制工序而被去除100%(图13)。进而,对于琥珀酸及富马酸,虽在粗晶体(B)中残存一定量,但在晶体(C1)~晶体(C3)中被完全去除(图13)。此外,苹果酸在粗晶体(B)及晶体(C1)~晶体(C3)中残存少量,但在作为最终生产物的晶体(C1)~晶体(C3)中,其残存率低于2%(图13),在任一晶体试样中,天冬氨酸纯度均显示出约96%~97%的高值,从而获取高纯度的天冬氨酸的 α 型晶体(表7)。

[0251] 作为在本试验例中应关注的方面之一,在未添加任何晶种的试样(i)中,也与添加了晶种的试样(ii)及(iii)一样,根据本发明的一实施方式,示出可在精制所期望的天冬氨酸的晶体型的同时,将混入至利用发酵法获得的粗生成物中的天冬氨酸以外的各种氨基酸或有机酸有效果地去除。

[0252] (试验例4)等电点晶化温度的研究

[0253] 在试验例1中,使用水浴或油浴将(2)一项的“等电点晶化”中的溶液的温度以30℃、50℃及80℃分别进行维持控制来实施试验,除此以外利用与试验例1的(1)~(6)相同的方法实施试验。

[0254] <结果>

[0255] 对以30℃、50℃及80℃的各温度进行维持控制并分别进行等电点晶化而制备出的粗晶体(B)的各试样进行分析,结果确认到,任一试样均以高比例包含天冬氨酸。进而,确认到,任一试样均包含天冬氨酸以外的各种氨基酸、即谷氨酸、丙氨酸及缬氨酸,且包含天冬氨酸以外的有机酸。在粗晶体(B)的各试样的X射线衍射图中,以任一温度进行处理后的试样均与图5A所示的图同样地在18.8°、19.7°及25.0°的各衍射角度显示出衍射X射线的峰值。因此,确认到粗晶体(B)的各试样中结晶出的天冬氨酸的晶体型均为 β 型晶体。

[0256] 对于以如上方式制备出的粗晶体(B)的各试样,按照试验例1的(4)中记载的方法进行加热处理(热再浆料化处理)时,与试验例1同样地,在任一试样中均确认到晶体形状的变化。即,当利用显微镜对加热处理前的浆料试样的外观进行观察时,观察到微细的柱状结晶体,相对于此,在进行加热处理后,最晚在加热开始后试样温度达到100℃的时点,观察到几乎所有的柱状结晶体变化为板状结晶体。

[0257] 进而,对在加热处理后进行晶体分离而获得的各晶体(C)的各试样进行分析时,确认到任一试样的天冬氨酸纯度均为99.00%以上,从而获得高纯度的天冬氨酸晶体。另外,确认到,经由加热处理的作为最终生成物的晶体(C)的各试样均几乎不含有硫酸根离子。此外,当利用X射线衍射对各试样进行分析时,在任一试样的X射线衍射图中,均与图5B所示的

图同样地在 21.65° 及 23.7° 的各衍射角度确认到衍射X射线的峰值。因此,掌握到晶体(C)的各试样中的天冬氨酸的晶体型均为 α 型晶体。

[0258] 如以上所述,确认到,即便将等电点晶化处理的工序在 30°C 、 50°C 、 80°C 等广温度范围内进行控制并实施的情况下,也可获得 β 型晶体型的天冬氨酸。总之,也能够将在此种广温度范围内实施的等电点晶化处理工序与后续的热再浆料化处理工序加以组合,根据本发明的一实施方式,示出可以使用了微生物的发酵法而获取的粗生成物作为起始材料,并由所述起始材料最终以有用的 α 型晶体的形态来制造高纯度的天冬氨酸。

[0259] (试验例5)热再浆料化温度的研究

[0260] (1) 浓缩/活性炭处理

[0261] 作为供试于浓缩处理中的起始材料,使用试验例1中使用的产生Asp的棒状杆菌培养物的发酵澄清液3L,将添加了粉末活性炭的试样一边保温为 60°C 一边搅拌60分钟以上,由此进行活性炭处理,除此以外,利用与试验例1相同的方法进行浓缩/活性炭处理。此外,所获得的浓缩液(滤液(A))量为720mL。

[0262] (2) 等电点晶化

[0263] 首先,使用微生物培养装置(爱博乐(ABLE)股份有限公司制造,型号BMJ-01NC),将如上所述获取的浓缩液加热至 50°C 。然后,使加热器停止,一边进行搅拌一边历时50分钟向试样中添加硫酸55g,将pH调整为2.73附近以便冷却后的常温下的试样的pH成为2.77附近,由此使天冬氨酸结晶。此外,在进行所述pH调整时,在pH为5.0及4.7的时点分别向试样中添加各0.05g的天冬氨酸粗晶体作为晶种。在向试样中加入晶种时,试样的温度上升至 60°C 左右,因此一边对试样进行搅拌一边放冷至常温后,将晶体取出至烧杯中并以 4°C 进行冷却。

[0264] 此外,与试验例1同样地对各阶段的试样进行了各种分析,但不仅是各种氨基酸/有机酸的分析,而且利用HPLC常规方法对能够成为着色物质的二羟基丙酮(Dihydroxyacetone,DHA)的混入进行了分析及评价。

[0265] 此外,这些以外的试验条件与试验例1相同。

[0266] (3) 晶体分离

[0267] 在试验例1的晶体分离的操作中,对于利用所述等电点晶化而获取的晶体生成物,通过从上方分五次流动超纯水400mL来对晶体进行清洗,以将附着于其表面的杂质去除,除此以外在与试验例1相同的条件下获取粗晶体试样。此外,所获得的粗晶体试样的量为87.91g。

[0268] (4) 加热处理(热再浆料化处理)

[0269] 从所述(3)一项中获取的粗晶体试样中利用电子天平(岛津制作所股份有限公司制造,型号UW6200H)测定取得30.0g的干燥粗晶体,向其中加入超纯水70g,从而制备30%(w/w%)粗晶体浆料试样。使用水浴(东台科技(Taitec)股份有限公司制造,型号SM-05N)与搅拌器(日伸理化股份有限公司制造,型号SW-501J),将这些粗晶体浆料试样分别保温为 40°C 、 45°C 、 60°C 及 70°C 且进行搅拌,同时使用显微镜(奥林巴斯(Olympus)股份有限公司制造,型号CX41LF)对各试样观察其晶体变化。此外,关于加温时间,加温开始后,在试样中确认到晶体变化的时点中止加温,一旦可确认到晶体变化,便一边进行搅拌一边放冷至常温为止,接着,停止搅拌并将各试样以 4°C 进行冷却。

[0270] 将各试样冷却后,利用抽吸过滤法进行固液分离,对于所获得的各固体试样,通过

从上方流动超纯水30mL来对晶体进行清洗以将附着于表面的杂质去除。将清洗后的湿晶体转移至铝方形槽中并使用恒温干燥机(亚速旺(AS ONE)股份有限公司制造,型号OFW-300B)以55℃进行干燥后,利用药勺进行粉碎并回收至塑料容器中,将各试样供试于氨基酸/有机酸分析中,算出杂质的残存率。

[0271] <结果>

[0272] 将氨基酸及各种有机酸/二羟基丙酮(DHA)的分析结果示于表8~表10以及图14、图15、图16A及图16B、图17中。

[0273] [表8]

| | 发酵澄清液 (S) | | 粗晶体 (B) (干燥后) | |
|-----|----------------|--------------|------------------|--------------|
| | 浓度 (mmol/L) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) |
| Asp | 606.51 | 247.84 | 6.94 | 208.32 |
| Glu | 8.81 | 3.60 | 0.00 | 0.04 |
| Ala | 71.11 | 29.06 | 0.01 | 0.30 |
| Val | 10.48 | 4.28 | 0.00 | 0.01 |
| Pyr | 2.33 | 0.95 | 0.00 | 0.00 |
| DHA | 1.80 | 0.73 | 0.00 | 0.00 |
| Mal | 29.20 | 11.93 | 0.08 | 2.48 |
| Ace | 61.94 | 25.31 | 0.00 | 0.00 |
| Suc | 13.10 | 5.35 | 0.00 | 0.00 |
| Fum | 3.23 | 1.32 | 0.00 | 0.00 |

| | 晶体 (C) 40℃加热 | | 晶体 (C) 45℃加热 | | 晶体 (C) 60℃加热 | | 晶体 (C) 70℃加热 | |
|-----|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
| | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) | 浓度 (mmol/g) | 总量 (mmol) |
| Asp | 7.09 | 202.12 | 7.07 | 200.60 | 7.18 | 206.64 | 7.18 | 202.91 |
| Glu | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.04 | 0.00 | 0.04 |
| Ala | 0.01 | 0.15 | 0.00 | 0.14 | 0.00 | 0.13 | 0.00 | 0.12 |
| Val | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 |
| Pyr | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| DHA | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Mal | 0.01 | 0.17 | 0.00 | 0.12 | 0.01 | 0.15 | 0.00 | 0.08 |
| Ace | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Suc | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| Fum | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |

[0276] [表9]

| | 粗晶体 (B) 残存率 (B/S) | 晶体 (C) 残存率 (C/S) | | | |
|-----|-------------------------|---------------------|--------|--------|--------|
| | | 40℃加热 | 45℃加热 | 60℃加热 | 70℃加热 |
| Asp | 84.06% | 81.55% | 80.94% | 83.37% | 81.87% |
| Glu | 1.23% | 1.11% | 1.09% | 1.10% | 1.06% |
| Ala | 1.03% | 0.52% | 0.49% | 0.44% | 0.41% |
| Val | 0.25% | 0.24% | 0.23% | 0.22% | 0.21% |
| Pyr | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| DHA | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Mal | 20.78% | 1.44% | 0.97% | 1.25% | 0.65% |
| Ace | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Suc | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |
| Fum | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% | 0.00% |

[0278] ※相对于发酵澄清液(S)中的各成分总量而言的残存率。

[0279] [表10]

| | 热再浆料化处理温度 | | | |
|-------------------------|-----------|--------|--------|--------|
| | 40℃加热 | 45℃ | 60℃ | 70℃ |
| [0280] 粗晶体(B)中 Asp 量(g) | 27.73 | 27.73 | 27.73 | 27.73 |
| 晶体(C)中 Asp 量(g) | 26.91 | 26.70 | 27.51 | 27.01 |
| Asp 回收率 | 97.04% | 96.29% | 99.21% | 97.40% |

[0281] 在分别采用40℃、45℃、60℃、70℃作为热再浆料化处理温度的任一试样中,天冬氨酸的量均在发酵澄清液(S)、粗晶体(B)以及晶体(C)中无大的损失地以高水平推移(表8、图14),在粗晶体(B)中显示出84.06%的残存率,最终在晶体(C)中显示出80%左右的天冬氨酸残存率(表9、图16A)。进而,如从表10所掌握那样,就晶体(C)中的天冬氨酸相对于粗晶体(B)的回收率来看,在采用了所述热再浆料化处理温度的任一试样中均可实现95%左右的高回收率。

[0282] 另一方面,在发酵澄清液(S)中,混入了与天冬氨酸的总量相比少但为相当量的天冬氨酸以外的各种氨基酸以及各种有机酸及二羟基丙酮(DHA),但与试验例2同样地,掌握到,经由等电点晶化及后续的热再浆料化的各工序,各混入物的相当量被去除(表8、图14、图15)。详细而言,掌握到,关于天冬氨酸以外的各种氨基酸,在粗晶体(B)的时点,谷氨酸及丙氨酸显示出1%左右的残存率,缬氨酸显示出仅0.25%的残存率,在等电点晶化的工序中几乎被去除,并且在采用了各热再浆料化处理温度的任一晶体(C)试样中均确认到各残存率的进一步的降低(表9、图14)。进而,当对粗晶体(B)的各试样中的各种有机酸的残存率进行观察时,虽确认到混入了20%左右的相当量的苹果酸,但其他各有机酸显示出0%的值而未被检测到(表9以及图16B)。进而,确认到,通过经由分别采用了所述各处理温度的热再浆料化的工序,在作为生成物的晶体(C)的各试样中,苹果酸也减少至1%左右(表9、图17)。进而此外,关于成为着色的原因物质的二羟基丙酮(DHA),在发酵澄清液(S)中确认到混入(表8、图15),在经过等电点晶化而获取的粗晶体(B)的时点显示出0%的值,掌握到经由等电点晶化而被高度地去除(表8、表9、图15、图16)。

[0283] 接着,将对于分别采用了所述热再浆料化处理温度(40℃、45℃、60℃、70℃)的各试样,在热再浆料化处理的期间,随时间地利用显微镜进行观察而得的结果示于图18中。此外,各热再浆料化处理温度下的显微镜照片的处于上部的数字表示从加热开始起的经过时间,其单位为时间(时间(h):分钟(min))。

[0284] 通过分别采用所述热再浆料化处理温度而获取的晶体(C)各试样的任一者中,在热再浆料化处理的极初期均确认到微细的柱状结晶体,但当开始进行加热处理时,观察到随着时间的经过,柱状结晶体(β 型结晶体)变化为板状结晶体(α 型结晶体)的情形。详细而言,在分别采用了可谓比较高的温度的60℃、70℃作为热再浆料化处理温度的试样中,在分别依次经过1小时左右、30分钟左右的时点,晶体粒子几乎完全变化为板状结晶体(α 型结晶体)。进而,在采用了可谓比较高的温度的45℃、40℃作为热再浆料化处理温度的各试样中,也在分别依次经过21小时、91小时的时点,晶体粒子几乎完全变化为板状结晶体(α 型结晶体)。

[0285] 此外,在本试验例中,也与试验例1同样地,对于粗晶体(B)及晶体(C)的各试样,利

用X射线衍射对其晶体型进行分析。其结果,与图5A所示的图同样地,对于粗晶体(B)的各试样,在 18.8° 、 19.7° 及 25.0° 的各衍射角度确认到衍射X射线的峰值时,掌握到各试样中结晶出的天冬氨酸的晶体型均为 β 型晶体。进而,关于晶体(C)的各试样,也与图5B所示的图同样地,在 21.65° 及 23.7° 的各衍射角度确认到衍射X射线的峰值时,掌握到各试样中的天冬氨酸的晶体型均为 α 型晶体。

[0286] 根据本试验例,示出,即便在不仅在 70°C 以上的高温范围内,而且在包含 40°C 、 45°C 、 60°C 等的比较低的温度范围内进行热再浆料化处理的情况下,通过设定相当的加热处理时间,也能够使 β 型晶体转换为 α 型晶体,且经由本发明规定的工序,能够以高回收率且高纯度进行天冬氨酸的 α 型晶体的回收。

[0287] 如以上所述,根据本发明的实施方式,再现性良好地示出,即便在使用通过利用了微生物的发酵法而获取的粗生成物作为起始材料的情况下,无论是否添加晶种,均可在维持天冬氨酸的高回收率的同时有效率地去除相当于杂质的其他氨基酸及有机酸以及硫酸根离子等,而且最终可以有用的 α 型晶体的形态来制造天冬氨酸。

[0288] 工业上的可利用性

[0289] 天冬氨酸例如能够在制造食品、化妆品、医药品、吸水性/生物降解性氨基酸聚合物等化学合成材料的方面用作原料,因此本发明具有高的工业上的可利用性。

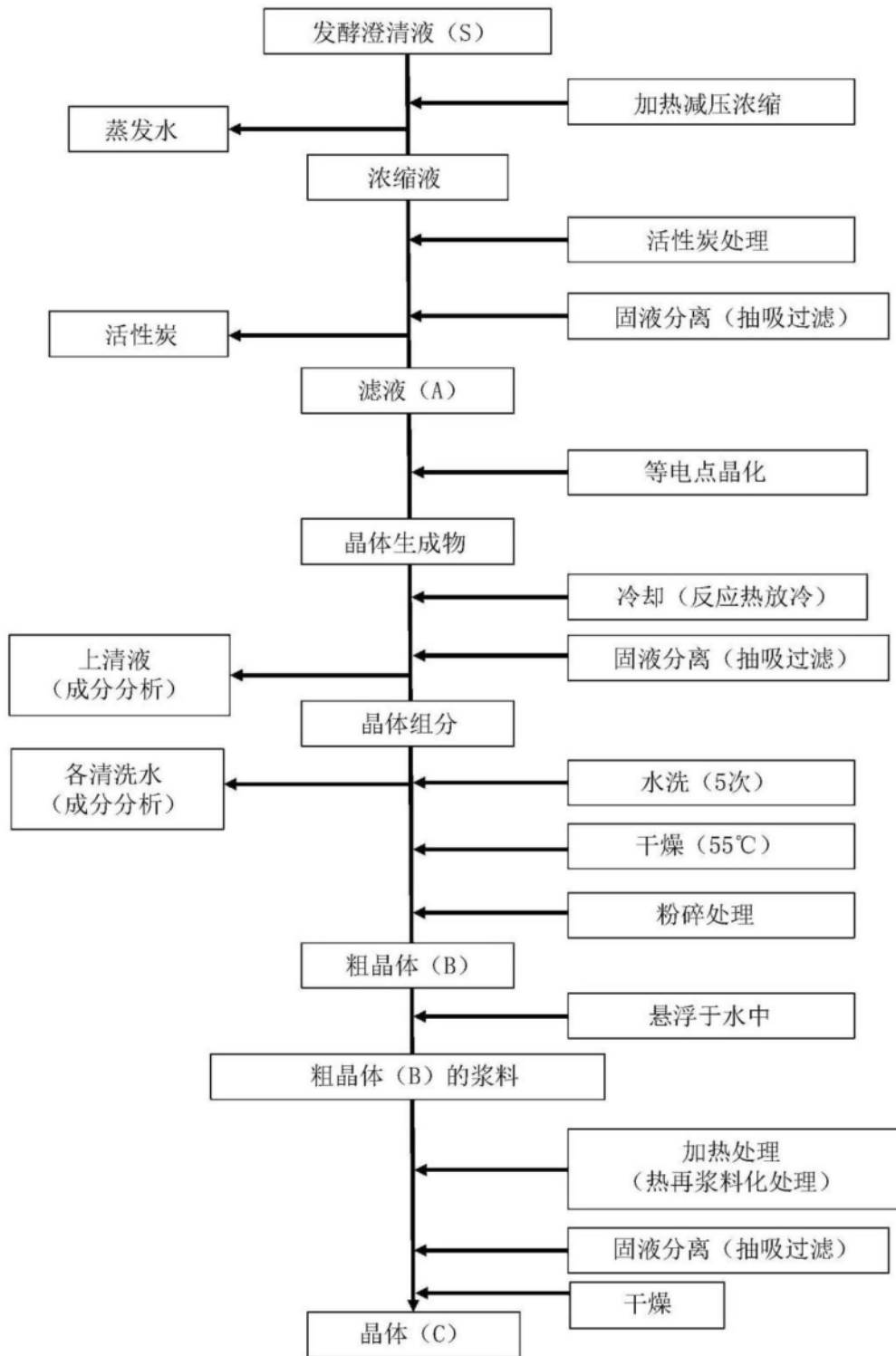


图1

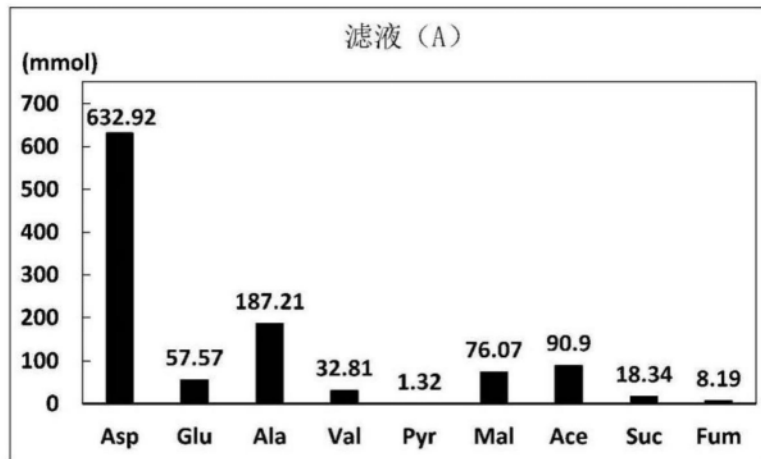


图2A

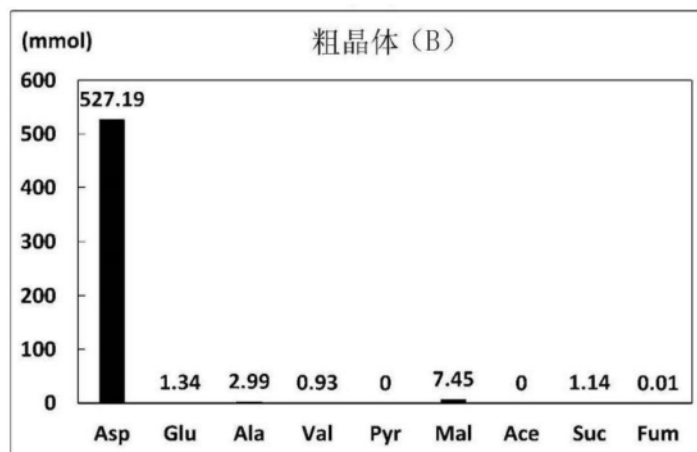


图2B

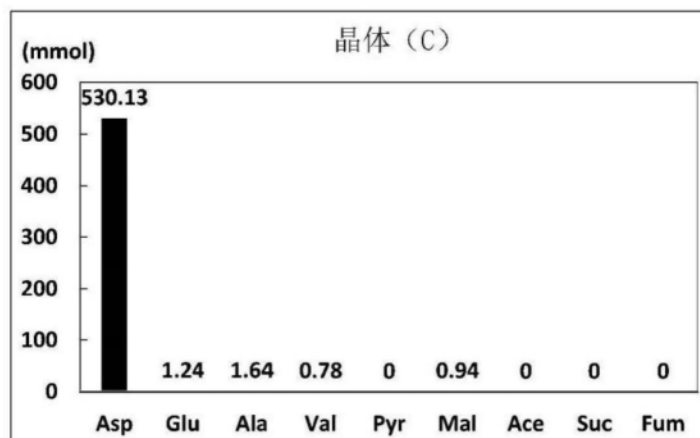


图2C

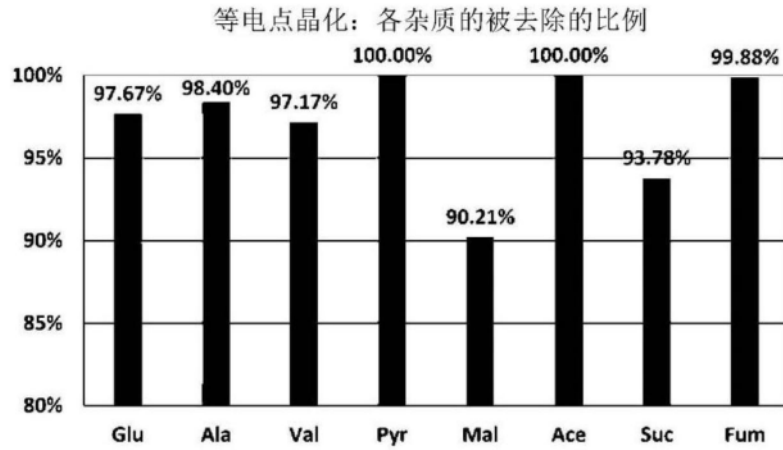


图3A

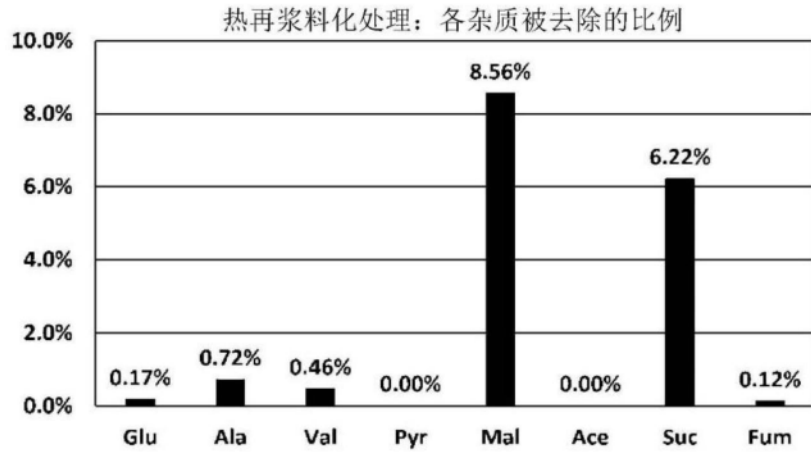


图3B

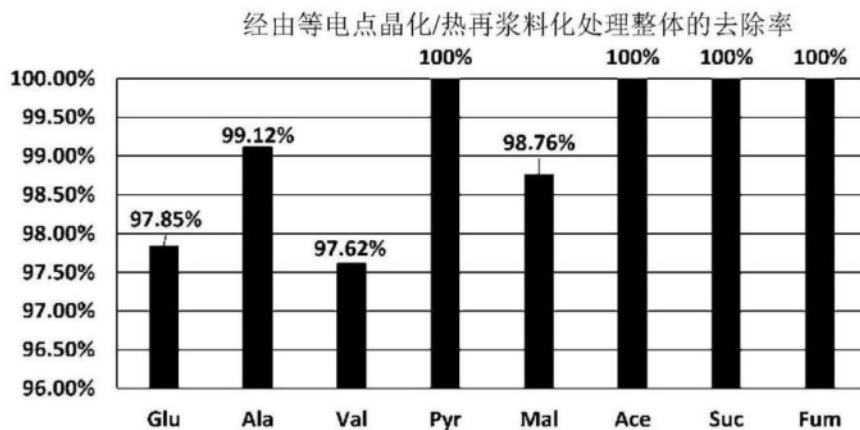


图3C



图4A

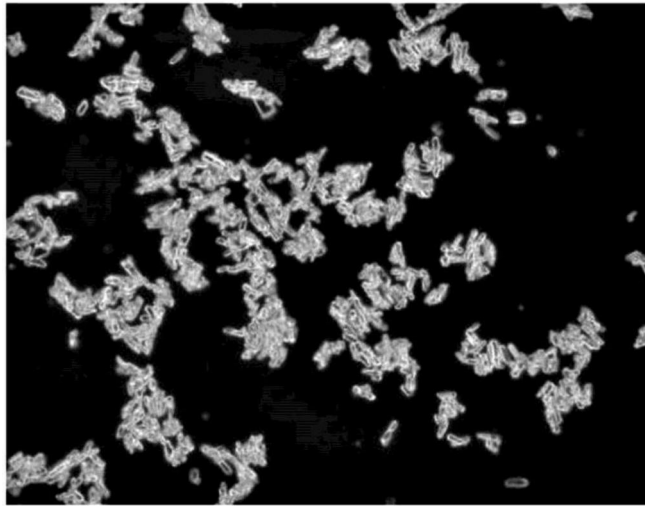


图4B

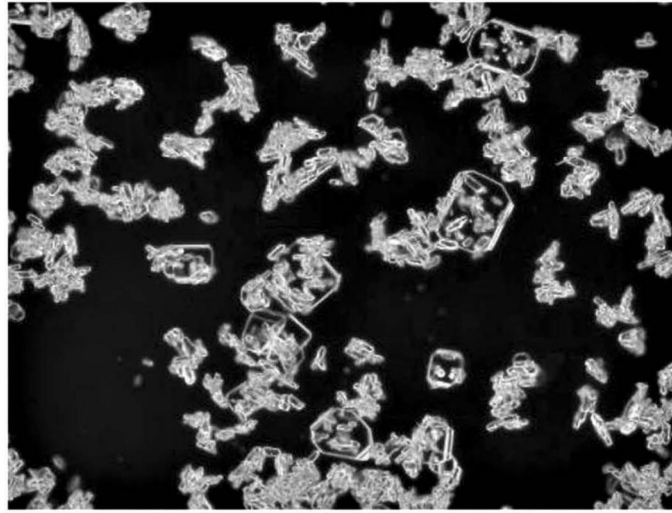


图4C

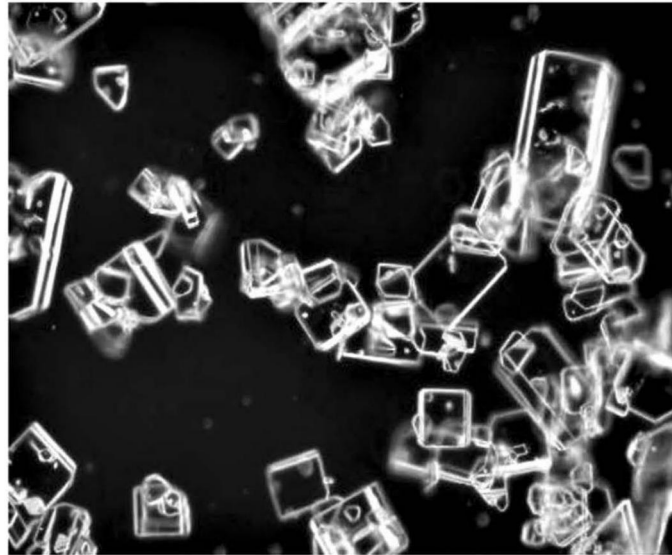


图4D

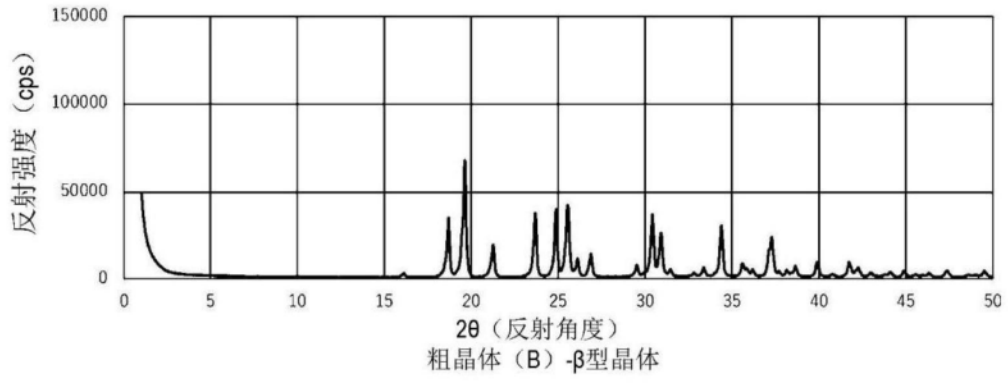


图5A

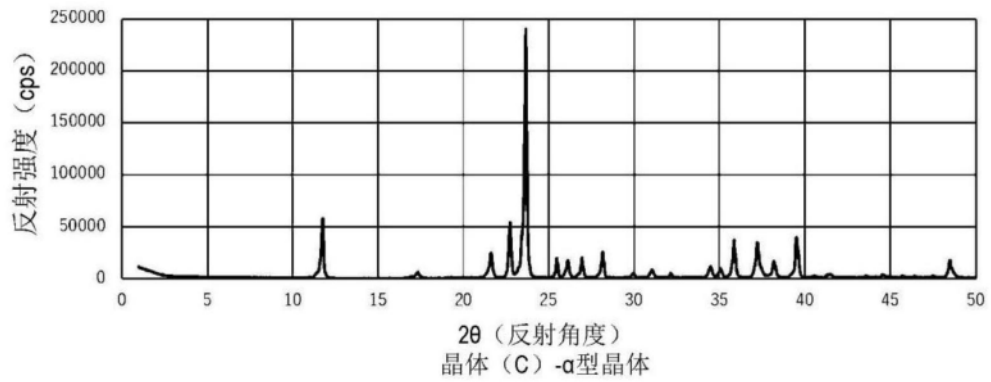


图5B

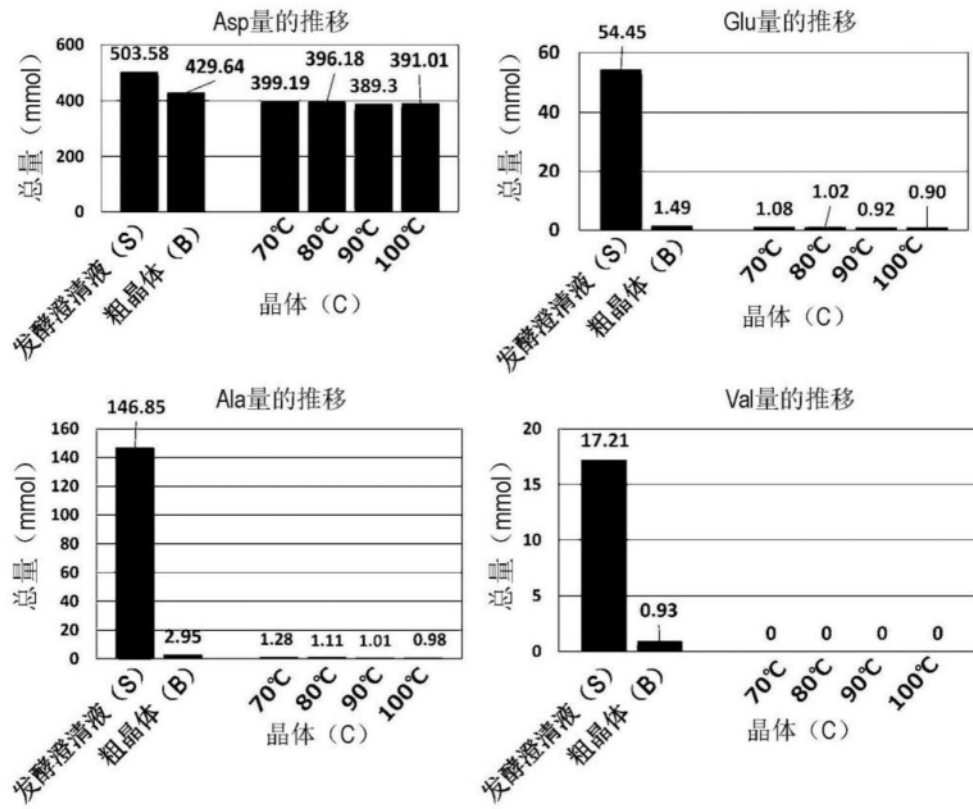


图6

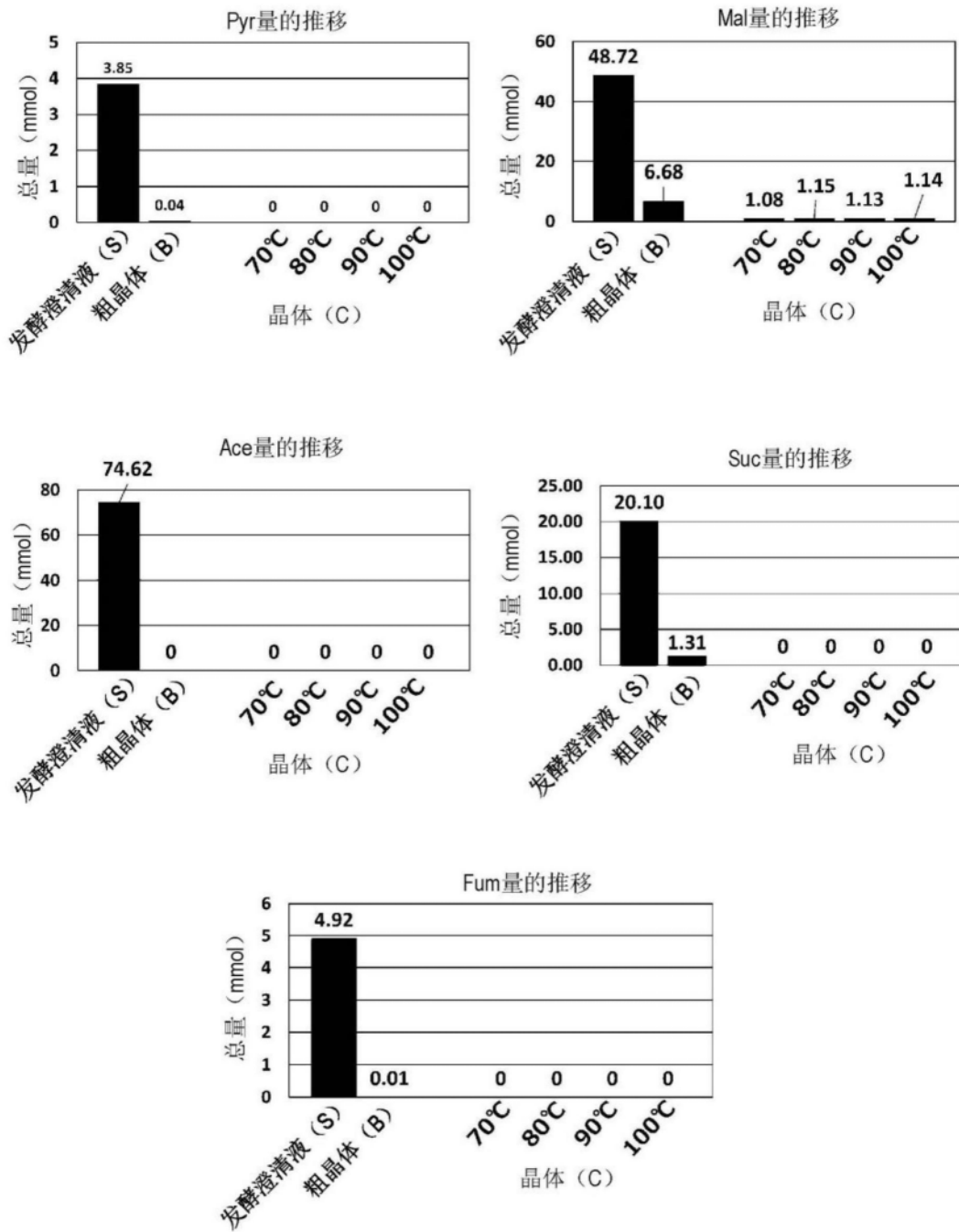


图7

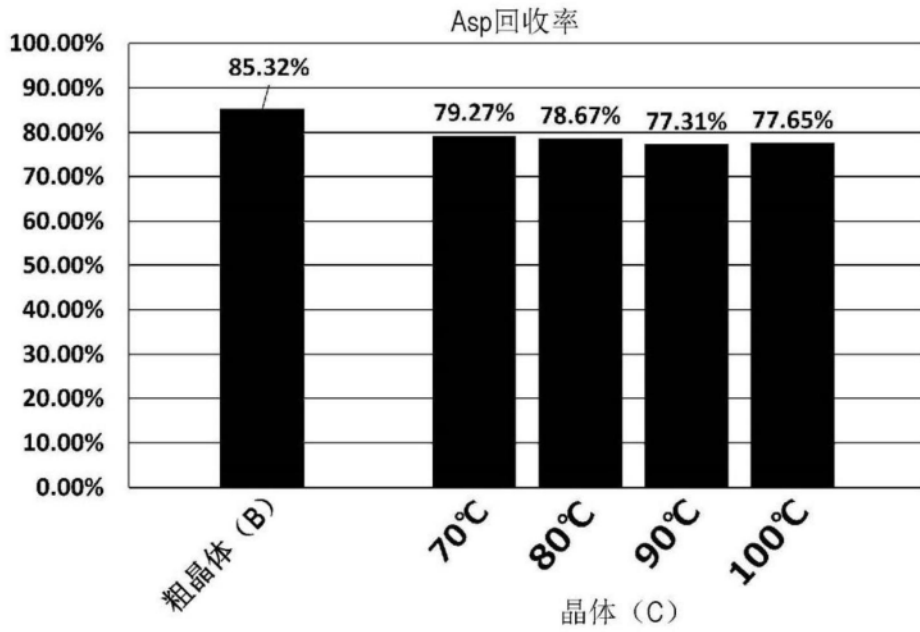


图8A

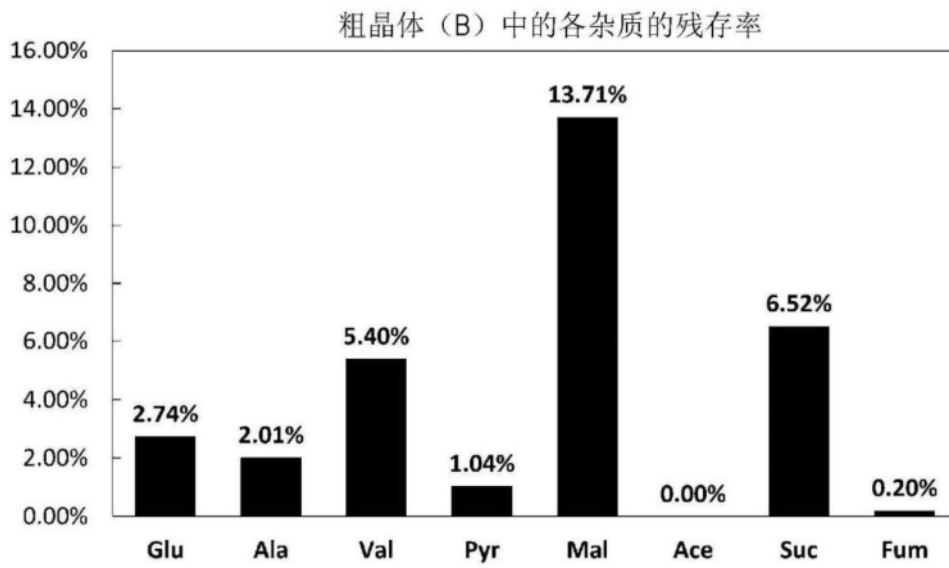


图8B

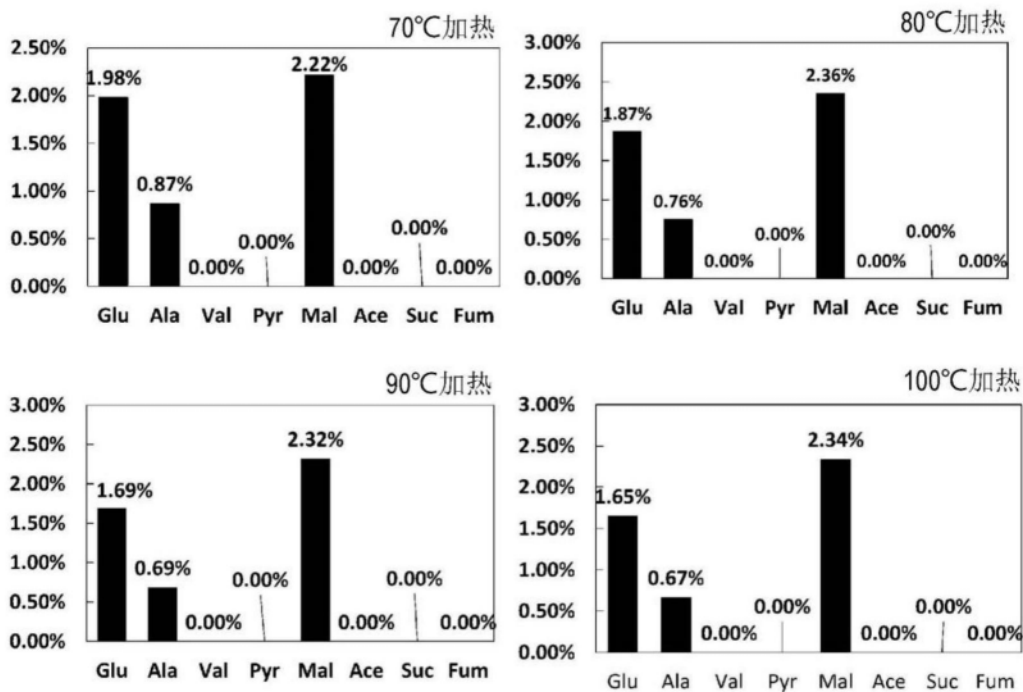


图9

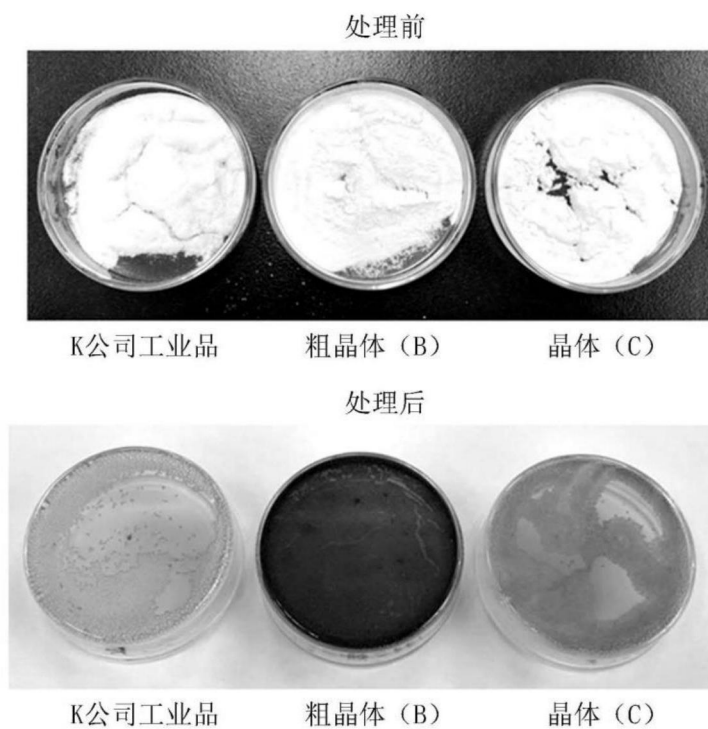


图10

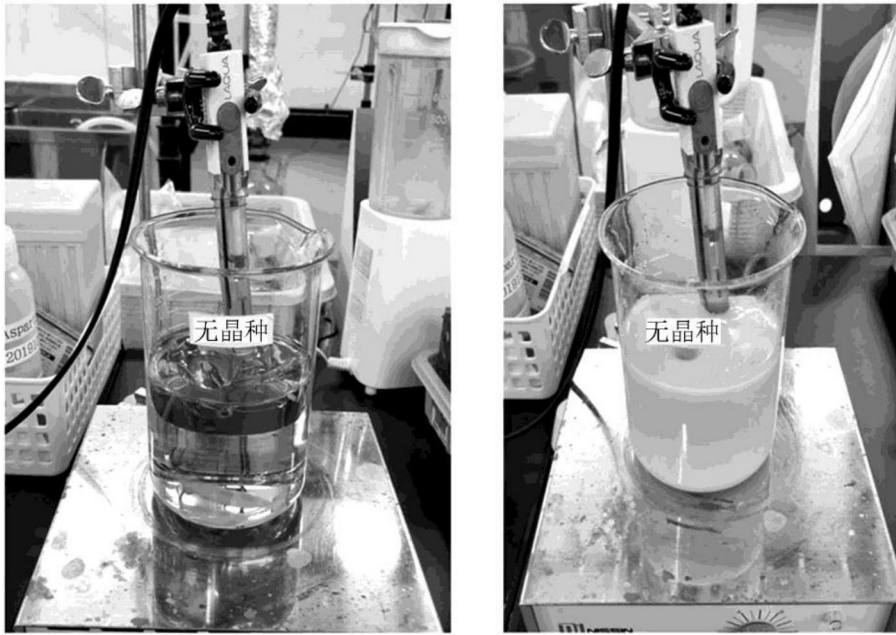


图11

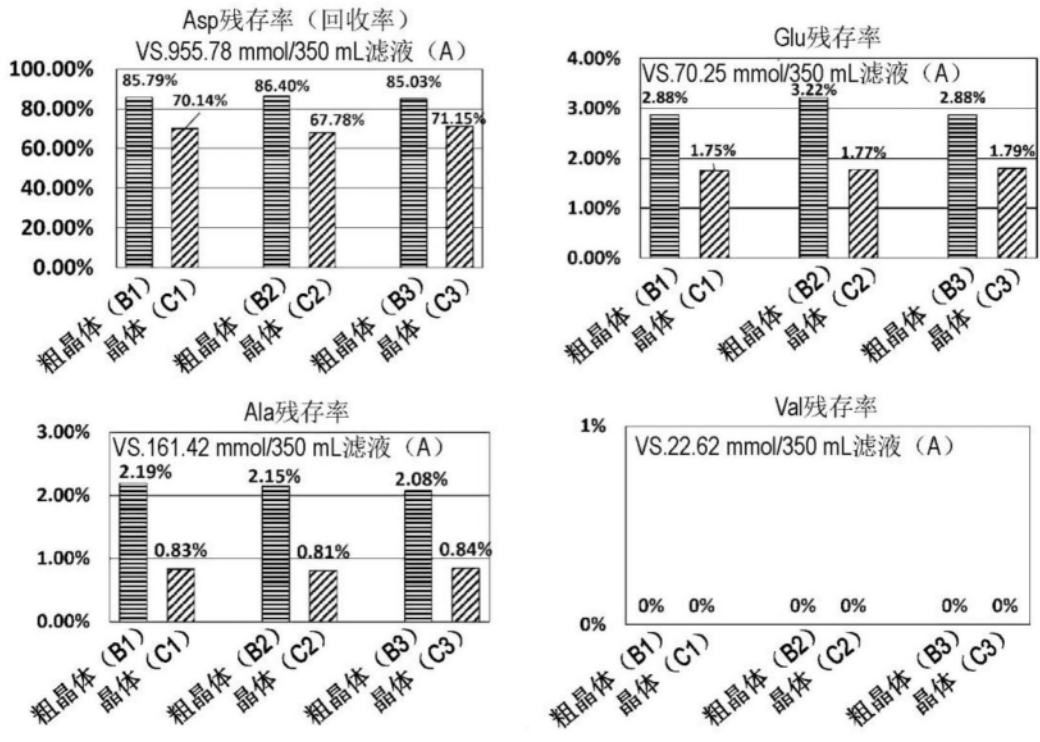


图12

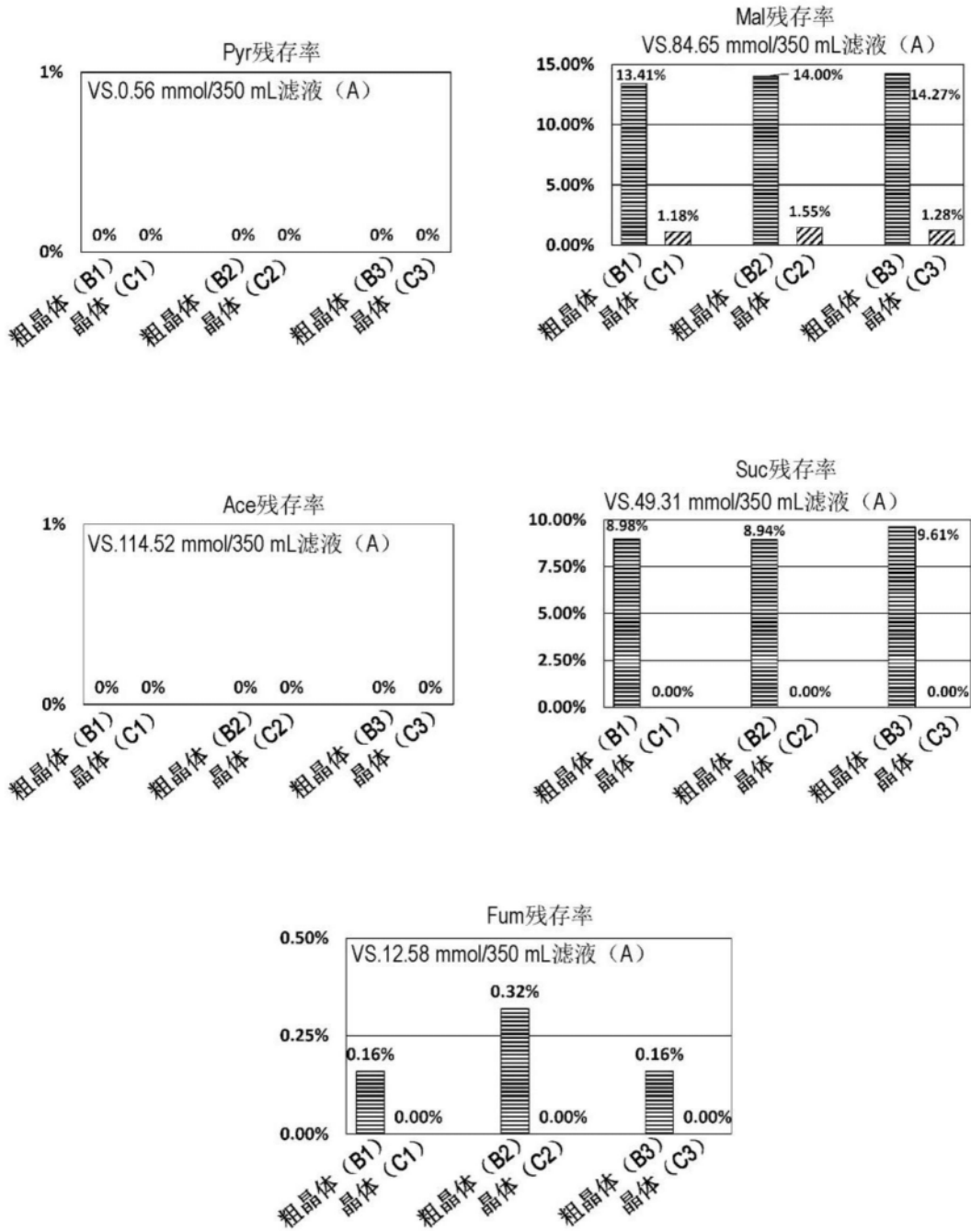


图13

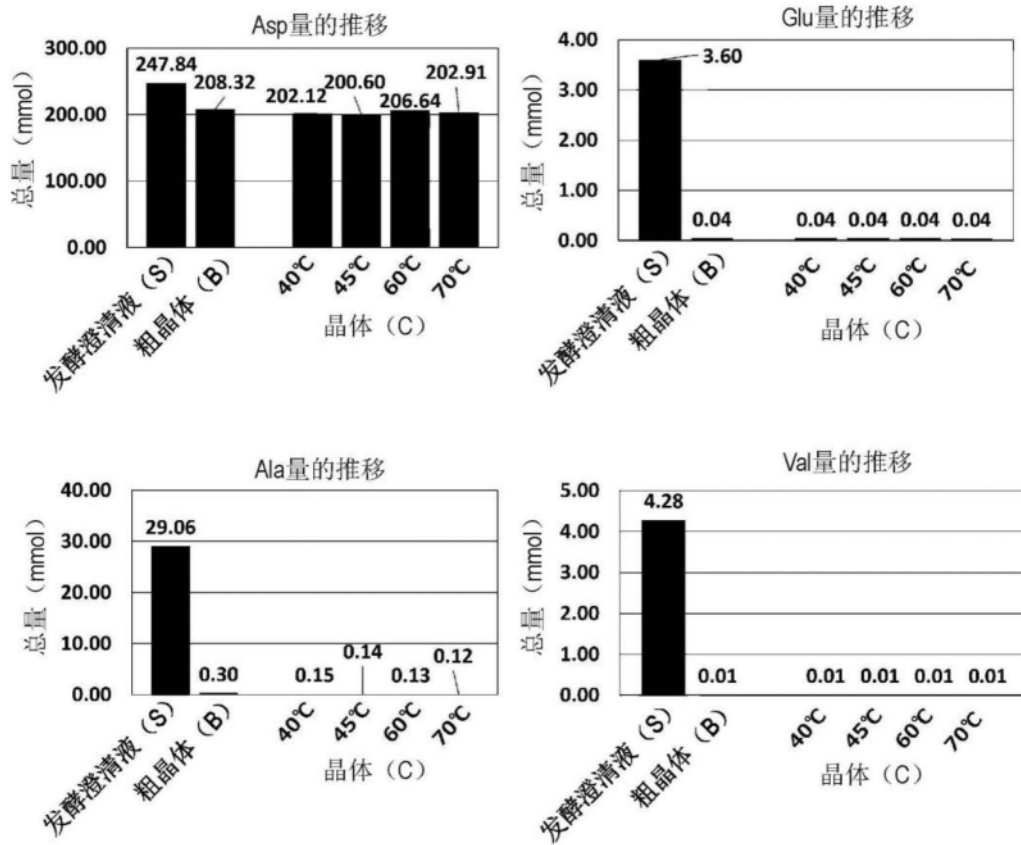


图14

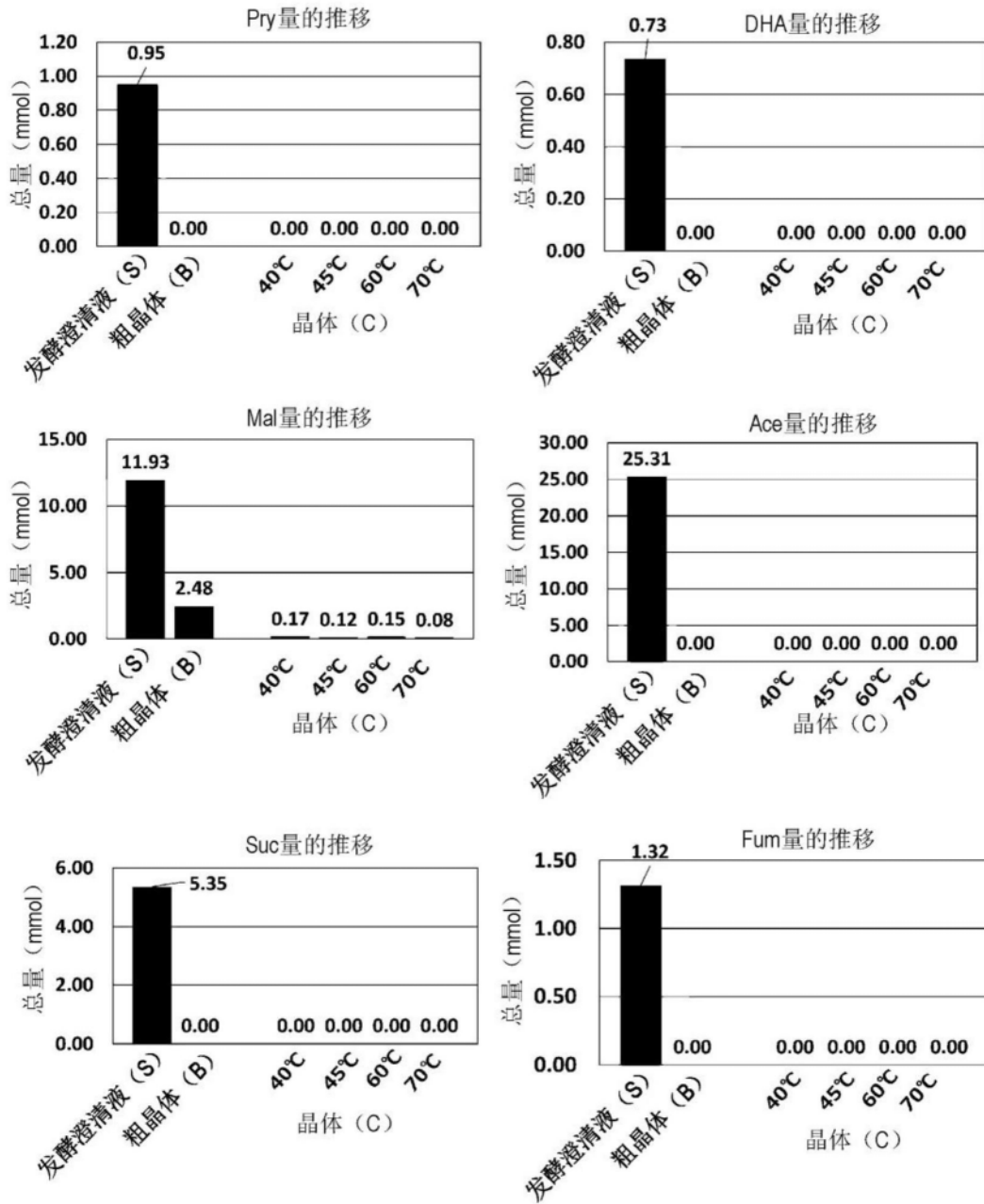


图15

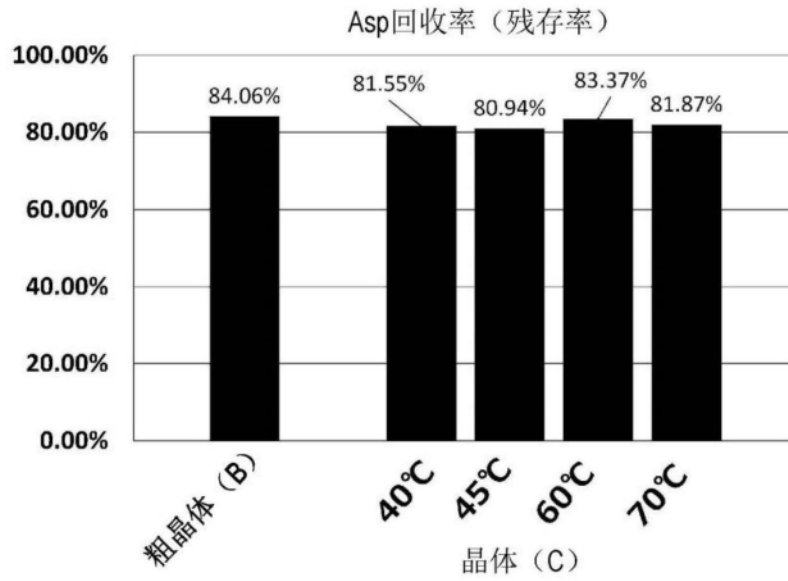


图16A

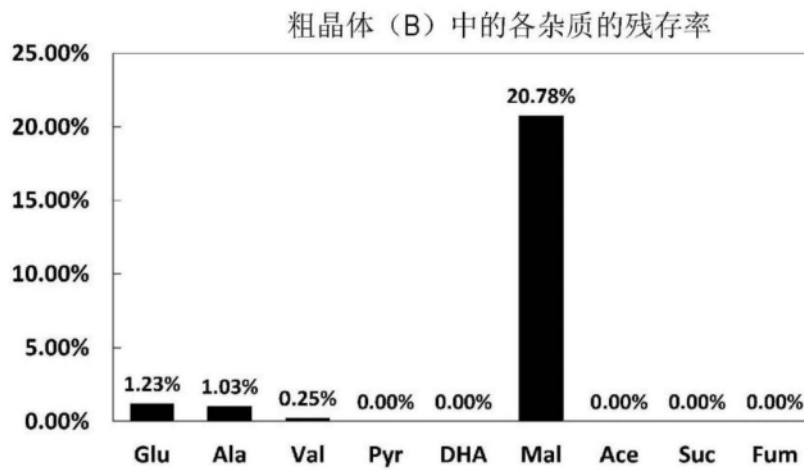
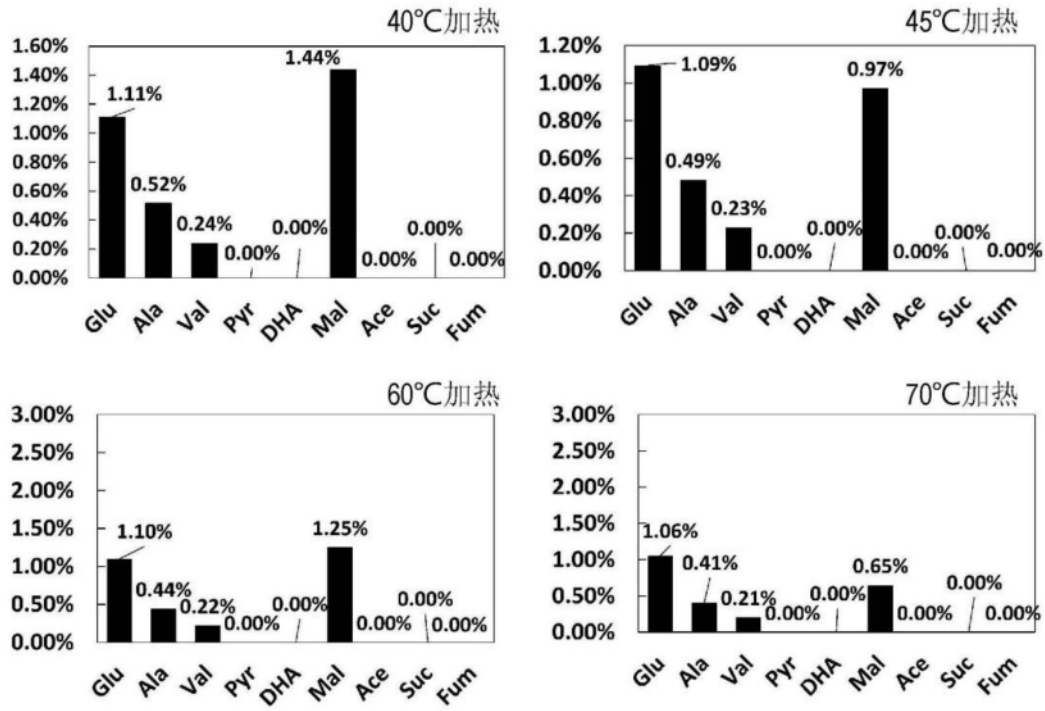


图16B



晶体 (C) 中的各杂质的残存率

图17

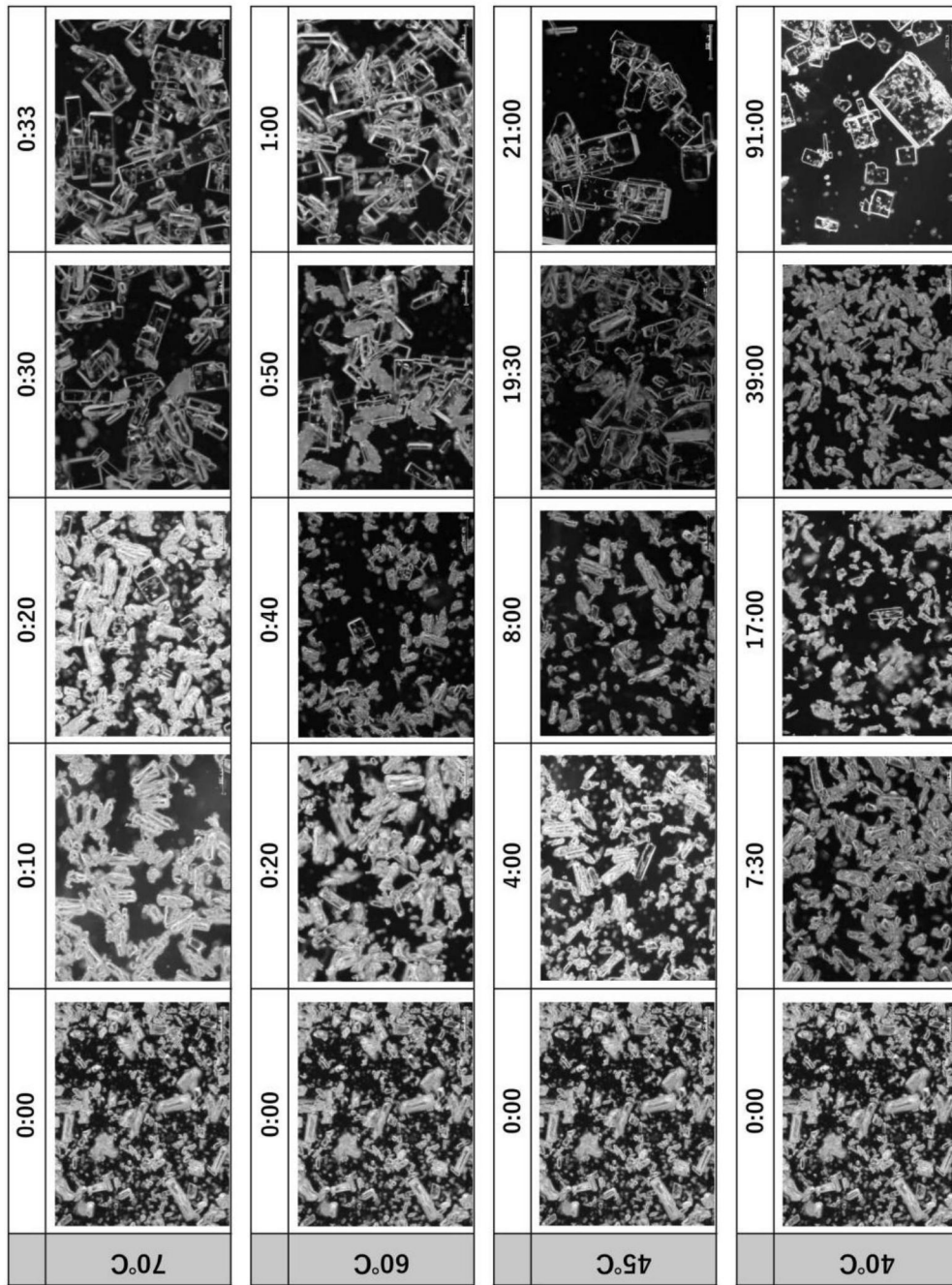


图18