ROYAUME DU MAROC
---
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19)

المملكة المغربية
---
المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية
---

# (12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication :
**MA 38535 A1**

(51) Cl. internationale :
**C12P 13/00**

(43) Date de publication :
**28.02.2017**

(21) N° Dépôt :
**38535**

(22) Date de Dépôt :
**19.03.2014**

(30) Données de Priorité :
**22.03.2013 JP 2013-059431**

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
**PCT/JP2014/057500 21.10.2015**

(71) Demandeur(s) :
**COSMO OIL CO., LTD., 1-1-1, Shibaura 1-chome, Minato-ku, Tokyo 105-8528 (JP)**

(72) Inventeur(s) :
**SAITO, Masaru ; YAMAMOTO, Taishi ; KAWANO, Haruki**

(74) Mandataire :
**ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY TMP AGENTS**

(54) Titre : **PROCÉDÉ DE PRODUCTION D'ACIDE 5-AMINOLÉVULINIQUE OU D'UN SEL DE CELUI-CI**

(57) Abrégé : Cette invention concerne un procédé de production d'acide 5-aminolévulinique ou d'un sel de celui-ci à un rendement élevé à l'aide de micro-organismes producteurs d'acide 5-aminolévulinique, ledit procédé de production d'acide 5-aminolévulinique ou d'un sel de celui-ci étant caractérisé par la culture de micro-organismes producteurs d'acide 5-aminolévulinique dans un milieu contenant un ou plusieurs nutriments choisis parmi la L-arginine, l'acide glutamique, et leurs sels, la teneur en acide glutamique ou sel de celui-ci dans le milieu étant de 42-100 mM en termes d'acide glutamique.

MA 38535A1



# طريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه

## الملخص

يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه بناتج مرتفع باستخدام كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك . تشتمل الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه على استنبات كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك في وسط به واحد أو أكثر من المكونات التي يتم اختيارها من المجموعة التي تتكون من L-أرجينين، حمض جلوتاميك، وملح منه. يتراوح محتوى حمض جلوتاميك أو الملح منه من 42 إلى 100 مللي مولار في الوسط في صورة حمض الجلوتاميك.

MA 38535A1

N° 38535
du 21.10.2015



# طريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه

## المجال التقني للاختراع

[0001] يتعلق الاختراع الحالي بطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه بفعالية باستخدام كائنات دقيقة.

## الخلفية التقنية للاختراع

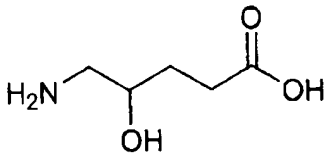
[0002] يوجد حمض 5-أمينو ليفولينيك على نطاق واسع في المجال الحيوي في صورة مركب وسيط تأيضي في المسار التخليقي الحيوي للخضاب الذي يخلّق حيويا مركبات تترا بيرول (مثل فيتامين $B_{12}$، هيم، وكلوروفيل) ويلعب دورا هاما داخل الخلية الحية. يتم تخليق حمض 5-أمينو ليفولينيك حيويا في الأنظمة الحيوية من جليسين وسسينيل CoA بواسطة حمض 5-أمينو ليفولينيك سنثاز أو من حمض جلوتاميك خلال جلوتاميل tRNA ويتم تحويله إلى مركبات بورفيرين مثل هيم وكلوروفيل عن طريق التأيض عقب حمض 5-أمينو ليفولينيك ديهيدراتاز. يتسم حمض 5-أمينو ليفولينيك بأنه قابل للتحلل بدرجة عالية ولا يتبقى في البيئة بشكل كبير وبالتالي من المتوقع أن يتم تطبيقه على مجموعة متنوعة من الصناعات (مراجع براءات الاختراع 1 و2).

[0003] هناك طريقة تستخدم مجموعة متنوعة من بكتيريا التمثيل الضوئي، بشكل محدد، بكتيريا تنتمي إلى Rhodobacter أو صور متغيرة منها وهذه الطريقة معروفة بأنها طريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه باستخدام كائنات دقيقة (مراجع البراءات 3 و4). بالإضافة إلى ذلك، على سبيل المثال، تم وصف طريقة لاستنبات مثل هذه الكائنات الدقيقة في ظل ظروف محدودة الأكسجين (مرجع البراءة 5)، طريقة تستخدم صورة بديلة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك في ظل ظروف معتدلة من ظروف محدودة الأكسجين (مرجع البراءة 6)، وطريقة تستخدم حالة الأكسجين المنشأة (مرجع البراءة 7).

[0004] برغم أنه قد تم وصف ظروف الاستنبات كما هو مبين أعلاه، فلم تكن هناك تقارير حول أوساط الاستنبات ومحسنات الإنتاجية لزيادة الإنتاجية باستثناء وصف كمية الحديد (مرجع البراءة 6).

[0005] بصفة عامة من الممكن بصورة اختيارية عزل حمض 5-أمينو ليفولينيك أو الملح منه الذي يُنتج بواسطة مستنبت كائنات دقيقة تم وصفه أعلاه، وتنقيته وفقا لطريقة معتادة مثل استشراب أو استخلاص بالتبادل الأيوني. لتحقيق نقاء مرتفع، هناك طريقة معروفة لعزل حمض 5-أمينو ليفولينيك من محلول مستنبت باستخدام راتنج تبادل كاتيوني (مرجع البراءة 8). يتم تنفيذ خطوة تنقية حمض 5-أمينو ليفولينيك باستخدام راتنج تبادل كاتيوني بواسطة منتج ثانوي، حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك له الصيغة (1). بمعنى، نظرا لأن حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك هذا له قيمة pKa وقيمة pI تقترب من تلك الخاصة بحمض حمض 5-أمينو ليفولينيك، أثناء التنقية بواسطة استشراب بالتبادل الأيوني، يتنافس حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك وحمض 5-أمينو ليفولينيك لمجموعات تبادل لراتنج التبادل الأيوني. بناء على ذلك، فإن تحقيق التنقية العالية لحمض 5-أمينو ليفولينيك يتطلب استخدام راتنج تبادل أيوني بكمية عالية بالنسبة لكمية حمض 5-أمينو ليفولينيك التي تمر خلال الراتنج. بالتالي، فإن تثبيط الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك في محلول المستنبت يكون فعالا لزيادة فعالية التنقية العالية لحمض 5-أمينو ليفولينيك بواسطة استشراب التبادل الأيوني.

[0006]




(1)

[قائمة الاستشهادات]

[مراجع البراءات]

[0007]

[مرجع البراءة 1] JP-A-S61-502814

[مرجع البراءة 2] JP-A-H02-138201

[مرجع البراءة 3] JP-A-H06-141875

[مرجع البراءة 4] JP-A-H06-153915

[مرجع البراءة 5] JP-A-H08-168391

[مرجع البراءة 6] JP-A-H11-42083

[مرجع البراءة 7] JP-A-2008-29272

[مرجع البراءة 8] JP-A-2007-84466

[الكشف عن الاختراع]

[المشكلة التقنية]

[0008] طبقا لما هو مبين أعلاه، لقد تم التحقق من مجموعة متنوعة من الطرق لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه، ولكن هناك حاجة إلى تحسين إضافي في الناتج.

يتمثل أحد أهداف هذا الاختراع في توفير طريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه بناتج مرتفع باستخدام كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك.

يتم أيضا تقديم طريقة لتثبيط تراكم حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك في عملية استنبات.

[حل المشكلة]

[0009] في ظل الظروف، تم إجراء مجموعة متنوعة من الدراسات على حالات، بشكل محدد، مكونات وسط، لاستنبات كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك . نتيجة لذلك، تم اكتشاف أنه يمكن إنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه بناتج أعلى من الطرق التقليدية، عبر استنبات كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك في وسط به L-أرجينين، كمية محددة سلفا من حمض جلوتاميك، أو ملح منه، بالإضافة إلى مكونات مغذية مثل خلاصة خميرة.

علاوة على ذلك، تم اكتشاف أنه يمكن تثبيط تراكم من حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك بواسطة استنبات كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك في وسط به L-أرجينين، كمية معينة من حمض جلوتاميك، أو ملح منه، بالإضافة إلى مكونات مغذية شائعة مثل خلاصة الخميرة. وبالتالي، تم تحقيق الاختراع الحالي.

[0010] بمعنى أكثر تحديدا، يقدم الاختراع الحالي ما يلي من [1] إلى [6]:

[1] طريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه، تشتمل على استنبات كائن دقيق منتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك في وسط به واحد أو أكثر من المكونات التي يتم اختيارها من L - أرجينين، حمض جلوتاميك، وملح منه، حيث يتراوح محتوى حمض جلوتاميك أو الملح منه من 42 إلى 100 مللي مولار في صورة حمض الجلوتاميك في الوسط ؛

[2]الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لـ [1]، حيث يتراوح محتوى L - أرجينين أو الملح منه 0.5 إلى 15 مللي مولار في صورة L-أرجينين في الوسط؛

[3] الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لـ [1] أو [2]، حيث يتراوح محتوى L - أرجينين أو الملح منه 0.01 إلى 30 مللي مولار في صورة L-أرجينين في الوسط؛

[4] الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لأي من [1] إلى [3]، حيث ينتمي الكائن الدقيق المنتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك إلى Rhodobacter؛

[5] الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لأي من [1] إلى [4]، حيث يكون الكائن الدقيق المنتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك عبارة عن Rhodobacter sphaeroides أو صورة متغيرة منه؛ و

[6] الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لأي من [1] إلى [5]، حيث يكون الكائن الدقيق المنتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك عبارة عن كائن دقيق يُدعى Rhodobacter sphaeroides CR-0072009 ويتم إيداعه بمقتضى FERM BP-6320.

[التأثير المفيد للاختراع]

[0011] الطريقة وفقا للاختراع الحالي تنتج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه بناتج مرتفع عن طريق استنبات كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك في وسط به L-أرجينين، من 42 إلى 100 مللي مولار حمض جلوتاميك، أو ملح منه.

[0012] علاوة على ذلك، يمكن تثبيط الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك، منتج ثانوي يؤثر في تنقية حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه، بواسطة استنبات كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك في وسط به L-أرجينين، من 42 إلى 100 مللي مولار حمض جلوتاميك، أو ملح منه.

[وصف التجسيدات]

[0013] الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا للاختراع الحالي تتميز باستخدام وسط يتضمن واحد أو أكثر من المكونات التي يتم اختيارها من L-أرجينين، حمض جلوتاميك، وملح منه (في حالة حمض جلوتاميك أو ملح منه، تتراوح الكمية من 42 إلى 100 مللي مولار في صورة حمض الجلوتاميك).

[0014] يُفضل أن يتراوح محتوى L-أرجينين أو الملح منه في الوسط بشكل مفضل من 0.01 إلى 30 مللي مولار، بشكل أكثر تفضيلا من 0.1 إلى 20 مللي مولار، بشكل أكثر تفضيلا أيضا من 0.3 إلى 15 مللي مولار، والأكثر تفضيلا من 0.5 إلى 15 مللي مولار في صورة L-أرجينين، من حيث إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك وتثبيط تراكم حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك. تتضمن أمثلة لملح من L-أرجينين ملح حمض معدني مثل هيدروكلوريد.

[0015] يتسم محتوى حمض جلوتاميك أو الملح منه في الوسط بأنه أعلى من التركيزات في وسط معروف وبشكل مفضل من 42 إلى 100 مللي مولار، بشكل أكثر تفضيلا من 47 إلى 90 مللي مولار، والأكثر تفضيلا على الإطلاق من 48 إلى 80 مللي مولار في صورة حمض الجلوتاميك، من حيث إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك.

[0016] في الاختراع الحالي، يشير مصطلح "في صورة حمض الجلوتاميك" والمصطلح " في صورة L-أرجينين" أن تركيزات الأملاح والهيدرات من هذه المركبات يتم حسابها عن طريق تحويل التركيزات إلى تلك الخاصة بحمض جلوتاميك وL-أرجينين بالترتيب. تتضمن أمثلة لأملاح حمض جلوتاميك أملاح فلز قلوية من حمض جلوتاميك، مثل صوديوم جلوتامات. أمثلة لأملاح من L-أرجينين تتضمن أملاح أرجينين من أملاح معدنية، مثل L-أرجينين هيدروكلوريد.

[0017] في الطريقة وفقا للاختراع الحالي، يمكن إضافة L-أرجينين، حمض جلوتاميك، أو ملح منه إلى وسط مستنبت في زمن تحضير الوسط. بشكل مفضل يمكن تعقيم L-أرجينين، حمض جلوتاميك، أو ملح منه من وسط مستنبت وإضافته إلى الوسط قبل بدء إنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك بواسطة الكائنات الدقيقة مباشرة. هنا، فإن الوقت قبل بدء إنتاج حمض 5-

أمينو ليفولينيك بواسطة الكائنات الدقيقة مباشرةً يتراوح بشكل مفضل من 10 إلى 45 ساعة بعد بدء التحضين، بشكل أكثر تفضيلا من 15 إلى 40 ساعة بعد بدء التحضين، والأكثر تفضيلا من 20 إلى 35 ساعة بعد بدء التحضين.

[0018] إن الكائنات الدقيقة المنتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك التي تُستخدم في طريقة الاختراع الحالي هي بكتيريا التمثيل الضوئي التي تكون عبارة عن كائنات دقيقة بدائية النواة، وتتضمن أمثلة لها الكائنات الدقيقة Rhodobacter والكائنات الدقيقة Rhodopseudomonas. يُفضل أن تكون الكائنات الدقيقة هي تلك التي تنتمي إلى Rhodobacter، بشكل أكثر تفضيلا sphaeroides أو صور متغيرة منها، وبشكل أكثر تفضيلا أيضا كائنات دقيقة تُدعى Rhodobacter sphaeroides CR-0072009 وتودع بمقتضى FERM BP-6320.

[0019] إن الوسط المستخدَم في الاختراع الحالي يحتوي بشكل مفضل على مكون واحد على الاقل يتم اختياره من خلاصة الخميرة، خميرة مجففة، ببتون، بولي ببتون، خلاصة لحم، وجبة سمك، حمض كاسامينو، خمور الذرة الحاد (CSL) ومرق ديكستروز البطاطس (PDB). ومن بين هذه المكونات، يُفضل مكون واحد على الأقل يتم اختياره من خلاصة الخميرة والخميرة المجففة، وبشكل محدد، خلاصة الخميرة. إن محتوى هذه المكونات هو 1 جم/لتر أو أكثر، بشكل أكثر تفضيلا من 1 إلى 20 جم/لتر، والأكثر تفضيلا على الإطلاق من 5 إلى 10 جم/لتر، إجمالًا.

[0020] علاوة على ذلك، فإن وسط المستنبت لطريقة الاختراع الحالي يحتوي بشكل مفضل على كمية ملائمة من مصدر كربون ومصدر نيتروجين يمكن استخدامه بواسطة الكائنات الدقيقة. تتضمن الأمثلة التي يمكن استخدامها لمصدر الكربون مركبات السكاريد مثل جلوكوز والأحماض مثل حمض أسيتيك وحمض ماليك وحمض لاكتيك وحمض سكسينيك. تتضمن الأمثلة التي يمكن استخدامها لمصدر النيتروجين مصادر النيتروجين غير العضوية، على سبيل المثال مركبات نيتروجين الأمونيا، مثل الأمونيا وسلفات الأمونيوم وكلوريد الأمونيوم وفوسفات الأمونيوم ومركبات نيتروجين النيترات، مثل نيترات الصوديوم ونيترات البوتاسيوم؛ ومركبات نيتروجين عضوية، مثل اليوريا وبولي ببتون وخلاصة الخميرة.

[0021] يمكن أن يحتوي وسط المستنبت لطريقة الاختراع الحالي أيضا بشكل ملائم، على سبيل المثال، على حمض أمينو مثل ألانين، ڤالين، لوسين، أيسولوسين، برولين، فينيل ألانين، تريبتوفان، ميثيونين، جليسين، سيرين، ثريونين، سيستيين، جلوتامين، أسباراجين، تيروسين، ليسين، هيستيدين، أو حمض أسبارتيك.

[0022] في الاختراع الحالي، يحتوي الوسط بشكل مفضل أيضا على مكونات صغيرة مثل ملح غير عضوي، بشكل محدد، منتج يتم تحضيره عن طريق التسخين عند 100 درجة مئوية أو أكثر أو الضغط عند 0.1 ميجا باسكال أو أكثر لخليط يحتوي على مركب فوسفور، مركب منجنيز، ومركب حديد، من حيث تحسين إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك. يمكن أن يكون مركب الفوسفور أي مركب يحتوي على عنصر فوسفور، وتتضمن أمثلة مفضلة منه حمض فوسفوريك، مركبات فوسفات، حمض بيروفوسفوريك. بشكل أكثر تحديدا، تشتمل أمثلة لمركب الفوسفور على فوسفات الكالسيوم (على سبيل المثال، $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ و$Ca_3(PO_4)_2$)، مونو صوديوم فوسفات، داي صوديوم فوسفات، حمض بيروفوسفوريك، مونو أمونيوم فوسفات، داي أمونيوم فوسفات، مونو بوتاسيوم فوسفات، داي بوتاسيوم فوسفات، فوسفات الحديد، وفوسفات المنجنيز. بشكل أكثر تحديدا، يتم تفضيل فوسفات الكالسيوم وحمض بيروفوسفوريك.

[0023] يمكن أن يكون مركب المنجنيز أي مركب يحتوي على عنصر منجنيز وتتضمن الأمثلة المفضلة عنصر المنجنيز الذي يتم تضمينه في المصادر المتغايرة، ملح منجنيز لحمض، منجنيز هاليد. وبشكل أكثر تحديدا، تتضمن أمثلة لمركب المنجنيز خلاصة خميرة تحتوي على Mn، سلفات منجنيز لامائي، بنتا هيدرات سلفات المنجنيز، كلوريد ، نيترات المنجنيز، كربونات المنجنيز، وثاني أكسيد المنجنيز؛ وبشكل أكثر تحديدا يتم تفضيل خلاصة خميرة تحتوي على Mn، منجنيز سلفات لامائي، وبنتا هيدرات سلفات المنجنيز.

[0024] يمكن أن يكون مركب الحديد أي مركب يحتوي على عنصر حديد، وتتضمن الأمثلة المفضلة ملح حديد لحمض، هاليد الحديد، وسلفيد الحديد. بشكل أكثر تحديدا، تتضمن أمثلة لمركب الحديد EDTA-حديد، حديد (II) كلوريد وهيدرات منه، حديد (III) كلوريد وهيدرات منه، سلفيد ، سيترات الحديد، أمونيوم سلفات الحديد، أسيتات الحديد، بروميد الحديد، لاكتات الحديد، نيترات الحديد، سلفات الحديد، فوسفات الحديد، سيترات أمونيوم

الحديد، حديد أوكسالات، وأوكسالات أمونيوم الحديد. يفضل بشكل محدد حديد (II) كلوريد وحديد (III) كلوريد.

[0025] يمكن أن يكون الخليط المراد تسخينه أو ضغطه عبارة عن وسط. الوسط، على سبيل المثال، هو سائل لا يحتوي بشكل كبير على أي مكون وسط ويكون عبارة عن ماء بشكل مفضل.

[0026] يتم إجراء تسخين الخليط عند 100 درجة مئوية، وتتراوح درجة حرارة التسخين بشكل مفضل من 110 درجة مئوية إلى 130 درجة مئوية. يتم إجراء ضغط الخليط عند 0.1 ميجا باسكال أو أكثر، ويتراوح الضغط المفضل من 0.13 إلى 0.20 ميجا باسكال بشكل مفضل. يتم بشكل مفضل تسخين وضغط الخليط. هناك حاجة إلى مثل هذا التسخين والضغط بعد خلط مركب فوسفور، مركب منجنيز، ومركب حديد. يمكن أن يوفر التسخين والضغط قبل الخلط تأثيرا ممتازا لتحسين تكاثر كائنات دقيقة منتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك ويحدِث تحسنا فعالا في أنشطة الكائنات الدقيقة مثل القدرة على إنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك ونشاط أكسيداز. يتراوح زمن التسخين والضغط بشكل مفضل من 10 إلى 30 دقيقة.

[0027] بالإضافة إلى ذلك، خلال طريقة الإنتاج وفقا للاختراع الحالي، يتم بشكل مفضل إضافة جليسين أو حمض ليفولينيك إلى الوسط. تتراوح كمية الجليسين بشكل مفضل من 10 إلى 1000 مللي مولار، بشكل محدد، من 10 إلى 400 مللي مولار، بناء على إجمالي كمية الوسط. تتراوح كمية الجليسين المضافة كل مرة بشكل مفضل من 10 إلى 200 مللي مولار بناء على إجمالي الوسط ويُضاف الجليسين بمثل تلك الكمية بشكل مفضل عدة مرات.

تتراوح كمية ليفولينيك بشكل مفضل من 0.01 إلى 20 مللي مولار، بشكل محدد، من 0.1 إلى 10 مللي مولار، بناء على إجمالي كمية الوسط. يمكن أن تؤدي إضافة جليسين وحمض ليفولينيك إلى تقليل معدل تكاثر الكائنات الدقيقة المنتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك. بناء على ذلك، في مثل تلك الحالة، يتم إضافة الجليسين وحمض الليفولينيك بشكل مفضل عندما يتم تكاثر الكائنات الدقيقة نوعا ما.

[0028] يمكن أن تكون درجة حرارة تحضين الرقم الهيدروجيني للوسط هي تلك التي تنمو عندها الكائنات الدقيقة المنتجة لحمض 5-أمينو ليفولينيك . على سبيل المثال، تتراوح درجة حرارة المستنبت بشكل مفضل من 10 درجة مئوية إلى 40 درجة مئوية، بشكل محدد، من

20 درجة مئوية إلى 35 درجة مئوية. يتراوح الرقم الهيدروجيني للوسط بشكل مفضل من 4 إلى 9، بشكل محدد، من 5 إلى 8. إذا تفاوت الرقم الهيدروجيني خلال التحضين، يتم تعديل الرقم الهيدروجيني بشكل مفضل بواسطة محلول قلوي مثل صوديوم هيدروكسيد، أمونيوم أو بوتاسيوم هيدروكسيد، أو حمض مثل حمض هيدروكلوريك، حمض سلفريك، أو حمض فوسفوريك. لا يتم إجراء التحضين بالضرورة بواسطة التشعيع الضوئي.

[0029] بالتالي فإن حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه بالطريقة التي تم الحصول بها عليه في محلول المستنبت يمكن تنقيته باستخدام طريقة عادية. على سبيل المثال، يمكن اختياريا عزل حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وتنقيته بواسطة طريقة عادية مثل استشراب أو استخلاص بالتبادل الأيوني، ويُفضل تنقية حمض 5-أمينو ليفولينيك عن طريق معالجة براتنج تبادل كاتيوني ثم إزالة الشوائب وبالتزامن تجميع حمض 5-أمينو ليفولينيك عالي النقاء أو الملح منه عن طريق عملية بلورة. يحتوي محلول المستنبت الذي تم الحصول عليه عن طريق الاختراع الحالي على تركيز مرتفع من حمض 5-أمينو ليفولينيك، بينما يتم تثبيط تراكم حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك، الذي بالتالي يؤدي إلى عملية تنقية. تشتمل أمثلة لملح من حمض 5-أمينو ليفولينيك على هيدروكلوريد، فوسفات، نيترات وما شابه.

[الأمثلة]

[0030] سيتم الآن وصف الاختراع الحالي بالتفصيل بالإشارة إلى الأمثلة. من المقرر أن تكون هذه الأمثلة عبارة عن شروحات، والاختراع الحالي غير مقيد بها.

[0031] (مثال الإنتاج 1)

تم وضع وسط 1 (200 ملليلتر، الصيغة مبينة في الجدول 1) في دورق مخروطي سعة2-L لتر وتم تعقيمه عند 121 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة، متبوعا بتبريده. تم تحضين Rhodobacter sphaeroides CR0072009 (FERM BP-6320) في الوسط 1. تم تحضين الخليط بالرج عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 24 ساعة.

[0032] [الجدول 1]

| الوسط 1 | التركيز (جم/لتر) |
|---|---|
| صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات | 7.6 |
| $Na_2HPO_4$ | 1.73 |
| $NaH_2PO_4$ | 0.94 |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 1.6 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.4 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.106 |
| خلاصة خميرة تحتوي على Mn | $10.9 \times 10^{-3}$ |
| حمض نيكوتينيك | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| (+)-بيوتين | $2.0 \times 10^{-5}$ |
| ثيامين هيدروكلوريد | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| خلاصة الخميرة | 3 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | $5.44 \times 10^{-3}$ |
| جلوكوز | 27 |

[0033] تم تحضين المستنبت الناتج مرة أخرى في 200 ملليلتر من الوسط 1 الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 2 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.2 وتم إخضاعه للتحضين تحت التقليب عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 24 ساعة.

[0034] (المثال المقارن 1)

تم تحضين المستنبت الذي تم الحصول عليه في مثال الإنتاج 1 في الوسط 2 (30 ملليلتر، الصيغة مبينة في الجدول 2) الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 300 ملليلتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.5 وتم إخضاعه للتحضين تحت التقليب عند 28 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 24 إلى 26 ساعة. وفيما بعد، تم إضافة جليسين وحمض ليفولينيك لإعطاء تركيزات تبلغ 60 ملي

مولار و5 مللي مولار، بالترتيب . بعد تعديل الرقم الهيدروجيني في المدى من 6.4 إلى 6.5 باستخدام حمض سلفريك، تم توزيع 5 ملليلتر من محلول المستنبت الناتج إلى كل من خمس أنابيب اختبار بقطر 20 مم. تم إيقاف التحضين عند النقطة الزمنية 18 ساعة بعد إضافة جليسين وحمض ليفولينيك. يبين الجدول 3 الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك بعد التحضين لمدة 18 ساعة.

[0035] [الجدول 2]

| الوسط 2 | التركيز (جم/لتر) |
|---|---|
| صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات | 7.6 |
| $Na_2HPO_4$ | 1.73 |
| $NaH_2PO_4$ | 0.94 |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 1.6 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.4 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.106 |
| خلاصة خميرة تحتوي على Mn | $10.9 \times 10^{-3}$ |
| حمض نيكوتينيك | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| (+)-بيوتين | $2.0 \times 10^{-5}$ |
| ثيامين هيدروكلوريد | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| خلاصة الخميرة | 8 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | $5.44 \times 10^{-3}$ |
| جلوكوز | 45 |

[0036] (المثال 1)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 1 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 0.5 مللي مولار. يبين الجدول 3 الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-

أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك عندما تم إيقاف التحضين عند النقطة الزمنية 18 ساعة بعد إضافة جليسين وحمض ليفولينيك.

[0037] (المثال 2)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 1 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 1 مللي مولار. يبين الجدول 3 الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك عندما تم إيقاف التحضين عند النقطة الزمنية 18 ساعة بعد إضافة جليسين وحمض ليفولينيك.

[0038] (المثال 3)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 1 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 2 مللي مولار. يبين الجدول 3 الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك عندما تم إيقاف التحضين عند النقطة الزمنية 18 ساعة بعد إضافة جليسين وحمض ليفولينيك.

[0039] (المثال 4)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 1 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 5 مللي مولار. يبين الجدول 3 الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك عندما تم إيقاف التحضين عند النقطة الزمنية 18 ساعة بعد إضافة جليسين وحمض ليفولينيك.

[0040] (المثال 5)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 1 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 10 مللي مولار. يبين الجدول 3 الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك عندما تم إيقاف التحضين عند النقطة الزمنية 18 ساعة بعد إضافة جليسين وحمض ليفولينيك.

[0041] [الجدول 3]

| | التركيز النهائي للمحلول المضاف L-أرجينين (ملي مولار) | عند نقطة إيقاف التحضين | | |
|---|---|---|---|---|
| | | الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك (ملي مولار) | الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك (ملي مولار) | نسبة الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك/حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك (ملي مولار/ملي مولار) |
| المثال المقارن 1 | صفر | 22.7 | 0.45 | 50.4 |
| المثال 1 | 0.5 | 23.6 | 0.33 | 71.5 |
| المثال 2 | 1 | 23.6 | 0.32 | 73.8 |
| المثال 3 | 2 | 23.7 | 0.30 | 79.0 |
| المثال 4 | 5 | 23.4 | 0.32 | 73.1 |
| المثال 5 | 10 | 23.8 | 0.35 | 68.0 |

[0042] كما هو مبين بوضوح في الجدول 3، إن إضافة L-أرجينين عملت على تحسين إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك وزادت نسبة الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك إلى تلك الخاصة بحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك حتى حوالي 60%.

[0043](مثال الإنتاج 2)

تم وضع وسط 1 (200 ملليلتر) في دورق مخروطي سعة 2 لتر وتم تعقيمه عند 121 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة، متبوعا بتبريده. تم تحضين Rhodobacter sphaeroides CR0072009 (FERM BP-6320) في الوسط 1. تم تحضين الخليط بالرج عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 26 ساعة.

[0044] تم تحضين المستنبت الناتج مرة أخرى في 200 ملليلتر من الوسط 1 الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 2 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4 وتم إخضاعه للتحضين تحت التقليب عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 20 ساعة.

[0045] (المثال المقارن 2)

تم تحضين المستنبت الذي تم الحصول عليه في مثال الإنتاج 2 في وسط 3 (1.8 L، الصيغة مبينة في الجدول 4) الذي تم تحضيره في وعاء مستنبت سعة 3 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4 وتم إخضاعه للتحضين في ظل التهوية والتقليب عند 28 درجة مئوية، في حيث بلغ معدل التهوية 1.8 لتر/دقيقة بحيث بلغ الحد الأدنى لتركيز الأكسجين المذاب 5.% جليسين وحمض ليفولينيك تم إضافة لإعطاء تركيزات تبلغ 65 مللي مولار و5 مللي مولار بالترتيب عند النقطة الزمنية 24 إلى 26 ساعة بعد بدء التحضين. تم استمرار التحضين في ظل سرعة دوران تقليب تبلغ 420 دورة في الدقيقة مع الاحتفاظ بالرقم الهيدروجيني في المدى من 6.4 إلى 6.5 باستخدام حمض سلفريك. علاوة على ذلك، تم إضافة جليسين للحصول على تركيز قدره 65 مللي مولار عند كل نقطة زمنية تمثل 12 ساعة (ثلاث مرات، بعد النقطة 40 ساعة بعد بدء التحضين، وتم إيقاف التحضين عند النقطة الزمنية 52 ساعة بعد الإضافة الأولى لجليسين. يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في الجدول 5.

[0046][الجدول 4]

| الوسط 3 | التركيز (جم/لتر) |
|---|---|
| صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات | 9.3 |
| $Na_2HPO_4$ | 1.73 |
| $NaH_2PO_4$ | 0.94 |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 1.6 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.4 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.106 |
| خلاصة خميرة تحتوي على Mn | $10.9 \times 10^{-3}$ |
| حمض نيكوتينيك | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| (+)-بيوتين | $2.0 \times 10^{-5}$ |
| ثيامين هيدروكلوريد | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| خلاصة الخميرة | 7.5 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | $5.44 \times 10^{-3}$ |
| جلوكوز | 45 |

[0047] (المثال 6)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 2 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 5 مللي مولار. يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في الجدول 5.

[0048] (المثال 7)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 2 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 7.5 مللي مولار. يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في الجدول 5.

[0049] (المثال 8)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 2 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 10 مللي مولار. يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في الجدول 5.

[0050][الجدول 5]

| | التركيز النهائي للمحلول المضاف L-أرجينين (مللي مولار) | عند نقطة إيقاف التحضين كمية متراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك (مللي مولار) |
|---|---|---|
| المثال المقارن 2 | 0 | 69.0 |
| المثال 6 | 5 | 71.2 |
| المثال 7 | 7.5 | 71.2 |
| المثال 8 | 10 | 69.8 |

[0051] كما هو مبين بوضوح في الجدول 5، إن إضافة L-أرجينين عملت على زيادة الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك.

[0052] (مثال الإنتاج 3)

تم وضع وسط 1 (200 ملليلتر) في دورق مخروطي سعة 2 لتر وتم تعقيمه عند 121 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة، متبوعا بتبريده. تم تحضين Rhodobacter sphaeroides CR0072009 (FERM BP-6320) في الوسط 1. تم تحضين الخليط بالرج عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 26 ساعة.

[0053] تم تحضين المستنبت الناتج مرة أخرى في 200 ملليلتر من الوسط 1 الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 2 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4 وتم إخضاعه للتحضين تحت التقليب عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 20 ساعة.

[0054] (المثال المقارن 3)

تم تحضين المستنبت الذي تم الحصول عليه في مثال الإنتاج 3 في الوسط 4 (1.8 L، الصيغة مبينة في الجدول 6) الذي تم تحضيره في وعاء مستنبت سعة 3 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4. تم إخضاع الخليط إلى تحضين في ظل التهوية والتقليب عند 28 درجة مئوية، في حيث بلغ معدل التهوية 1.8 لتر/دقيقة بحيث بلغ الحد الأدنى لتركيز الأكسجين المذاب 5%. تم إضافة جليسين وحمض ليفولينيك لإعطاء تركيزات تبلغ 65 مللي مولار و5 مللي مولار، بالترتيب، عند النقطة الزمنية 24 إلى 26 ساعة بعد بدء التحضين، وتم استمرار التحضين عند سرعة دوران تقليب تبلغ 420 دورة في الدقيقة مع الاحتفاظ بthe الرقم الهيدروجيني في المدى من 6.4 إلى 6.5 باستخدام حمض سلفريك. علاوة على ذلك، تم إضافة جليسين للحصول على تركيز يبلغ 65 مللي مولار عند النقاط التي تبلغ 40 ساعة و52 ساعة بعد بدء التحضين، وتم إيقاف التحضين 40 ساعة بعد الإضافة الأولى لجليسين. يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في الجدول 7.

[0055] [الجدول 6]

| الوسط 4 | التركيز (جم/لتر) |
|---|---|
| صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات | 7.6 |
| $Na_2HPO_4$ | 1.73 |
| $NaH_2PO_4$ | 0.94 |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 1.6 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.4 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.106 |
| خلاصة خميرة تحتوي على Mn | $10.9 \times 10^{-3}$ |
| حمض نيكوتينيك | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| (+)-بيوتين | $2.0 \times 10^{-5}$ |
| ثيامين هيدروكلوريد | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| خلاصة الخميرة | 7 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | $5.44 \times 10^{-3}$ |
| جلوكوز | 45 |

[0056] (المثال 9)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 3 باستثناء أنه بعد التحضين عند 28 درجة مئوية لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز يبلغ 4.5 مللي مولار. يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في الجدول 7.

[0057] [الجدول 7]

| | التركيز النهائي للمحلول المضاف L-أرجينين (ملي مولار) | عند نقطة إيقاف التحضين كمية متراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك (ملي مولار) |
|---|---|---|
| المثال المقارن 3 | 0 | 58.7 |
| المثال 9 | 4.5 | 62.7 |

[0058] كما هو مبين بوضوح في الجدول 7، إن إضافة L-أرجينين عملت على تحسين إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك.

[0059](المثال المقارن 4)

تم وضع الوسط 1 (200 ملليلتر) في دورق مخروطي سعة 2 لتر وتم تعقيمه عند 121 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة، متبوعا بتبريده. تم تحضين Rhodobacter sphaeroides CR0072009 (FERM BP-6320) في وسط 1. تم تحضين الخليط بالرج عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 26 ساعة.

[0060] تم تحضين المستنبت الناتج مرة أخرى في 200 ملليلتر من الوسط 1 الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 2 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4 وتم إخضاعه للتحضين تحت التقليب عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 20 ساعة.

[0061] (المثال المقارن 4)

تم تحضين المستنبت الذي تم الحصول عليه في مثال الإنتاج 4 في وسط 5 (1.8 L، الصيغة مبينة في الجدول 8) الذي تم تحضيره في وعاء مستنبت سعة 3 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4. تم إخضاع الخليط إلى تحضين في ظل التهوية والتقليب عند 28 درجة مئوية، في حيث بلغ معدل التهوية 1.8 لتر/دقيقة بحيث بلغ الحد الأدنى لتركيز الأكسجين المذاب 5%. تم إضافة جليسين وحمض ليفولينيك لإعطاء تركيزات تبلغ 65 ملي مولار و5 ملي مولار، بالترتيب، عند النقطة الزمنية 24 إلى 26 ساعة بعد بدء التحضين، وتم استمرار التحضين عند سرعة دوران

تقليب تبلغ 420 دورة في الدقيقة مع الاحتفاظ بالرقم الهيدروجيني من 6.4 إلى 6.5 باستخدام حمض سلفريك. علاوة على ذلك، تم إضافة جليسين للحصول على تركيز يبلغ 65 مللي مولار كل 12 ساعة بعد التحضين لمدة 40 ساعة، وتم إيقاف التحضين 52 ساعة بعد الإضافة الأولى لجليسين. يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك بعد إيقاف التحضين في الجدول 9. يتم التعبير عن المبينة في الجدول 9 بالنسبة إلى الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في المثال المقارن 4، تمثيلا بنسبة 100%.

[0062][الجدول 8]

| الوسط 5 | التركيز (جم/لتر) |
|---|---|
| صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات | 7.6 |
| $Na_2HPO_4$ | 1.73 |
| $NaH_2PO_4$ | 0.94 |
| $(NH_4)_2HPO_4$ | 1.6 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.4 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.106 |
| خلاصة خميرة تحتوي على Mn | $10.9 \times 10^{-3}$ |
| حمض نيكوتينيك | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| (+)-بيوتين | $2.0 \times 10^{-5}$ |
| ثيامين هيدروكلوريد | $2.0 \times 10^{-3}$ |
| خلاصة الخميرة | 7.5 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | $5.44 \times 10^{-3}$ |
| جلوكوز | 45 |

[0063] (المثال 10)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 4 باستثناء أن تركيز صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات المضافة إلى الوسط بلغ 8.4 جم/لتر (تركيز من حمض L-

جلوتاميك: 44.9 مللي مولار). يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك عندما تم إيقاف التحضين، عند 52 ساعة بعد إضافة جليسين، في الجدول 9.

[0064] (المثال 11)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 4 باستثناء أن تركيز صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات المضافة إلى الوسط بلغ 9.3 جم/لتر (تركيز من حمض L-جلوتاميك: 49.7 مللي مولار). يتم بيان الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك عندما تم إيقاف التحضين، عند 52 ساعة بعد إضافة جليسين، في الجدول 9.

[0065] (المثال 12)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 4 باستثناء أن تركيز صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات المضافة إلى الوسط بلغ 11.4 جم/لتر (تركيز من حمض L-جلوتاميك: 60.9 مللي مولار). الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك عندما تم إيقاف التحضين عند 52 ساعة، بعد إضافة جليسين، يتم بيان في الجدول 9.

[0066] [الجدول 9]

| | تركيز صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات (جم/لتر) | تركيز حمض L-جلوتاميك (مللي مولار) | كمية متراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك (مللي مولار) | إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك (%) |
|---|---|---|---|---|
| المثال المقارن 4 | 7.6 | 40.6 | 65.7 | 100.0 |
| مثال 10 | 8.4 | 44.9 | 67.5 | 102.7 |
| مثال 11 | 9.3 | 49.7 | 69.0 | 105.0 |
| مثال 12 | 11.4 | 60.9 | 70.2 | 106.8 |

[0067] كما هو مبين بوضوح في الجدول 9، تحسنت إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك بزيادة تركيز حمض L-جلوتاميك.

[0068](مثال الإنتاج 5)

تم وضع الوسط 1 (200 ملليلتر) في دورق مخروطي سعة 2 لتر وتم تعقيمه عند 121 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة، متبوعا بتبريده. تم تحضين Rhodobacter sphaeroides CR0072009 (FERM BP-6320) في الوسط 1. تم تحضين الخليط بالرج عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 24 ساعة.

[0069] تم تحضين المستنبت الناتج مرة أخرى في 200 ملليلتر من الوسط 1 الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 2 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.2. تم إخضاع الخليط إلى تحضين تحت التقليب عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 24 ساعة.

[0070] تم تحضين المستنبت الناتج في 30 ملليلتر من الوسط 2 الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 300 ملليلتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.5. تم إخضاع الخليط إلى تحضين تحت التقليب عند 28 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 24 إلى 26 ساعة. وفيما بعد، تم إضافة جليسين وحمض ليفولينيك لإعطاء تركيزات تبلغ 60 مللي مولار و5 مللي مولار، بالترتيب . بعد تعديل الرقم الهيدروجيني في المدى من 6.4 إلى 6.5 باستخدام حمض سلفريك، 5 ملليلتر من تم توزيع محلول المستنبت إلى كل من خمس أنابيب اختبار بقطر 20 مم. تم إيقاف التحضين عند 18 ساعة بعد إضافة جليسين. عندما تم إضافة جليسين وحمض ليفولينيك، تم أيضا إضافة أي مجموعة متنوعة من أحماض أمينية للحصول على تركيز قدره 5 مللي مولار. يتم بيان النتائج في الجدول 10. يتم التعبير عن الإنتاج المبينة في الجدول 10 بالنسبة إلى الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك في نظام الاختبار الذي لا يحتوي على أحماض أمينية، تمثيلًا بنسبة 100%.

[0071][الجدول 10]

| الحمض الأميني المضاف | نسبة إنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك (%) |
|---|---|
| لا توجد إضافة | 100.0 |
| مثيونين | 95.5 |
| ليسين | 99.0 |
| ثريونين | 100.2 |
| أورنيثين | 99.8 |
| سيترولين | 98.7 |
| أرجينين | 106.2 |

[0072] كما هو مبين بوضوح في الجدول 9، تحسنت إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك بزيادة تركيز من حمض جلوتاميك. بالإضافة إلى ذلك، كما هو مبين بوضوح في الجدول 10، تحسنت إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك بواسطة الأرجينين، بينما لم تتحسن بواسطة ميثيونين، ليسين، ثريونين، أونيثين، أو سيترولين.

[0073](مثال الإنتاج 6)

تم وضع وسط 1 (200 ملليلتر) في دورق مخروطي سعة 2 لتر وتم تعقيمه عند 121 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة، متبوعا بتبريده. تم تحضين Rhodobacter sphaeroides CR0072009 (FERM BP-6320) في وسط 1. تم تحضين الخليط بالرج عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 26 ساعة.

[0074] تم تحضين المستنبت الناتج مرة أخرى في 200 ملليلتر من الوسط 1 الذي تم تحضيره في دورق مخروطي سعة 2 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4 وتم إخضاع الخليط إلى تحضين تحت التقليب عند 32 درجة مئوية في مكان مظلم لمدة 20 ساعة.

[0075] (المثال المقارن 5)

تم تحضين المستنبت الذي تم الحصول عليه في مثال الإنتاج 6 في 1.8 لتر من وسط 5 الذي تم تحضيره في وعاء مستنبت سعة 3 لتر بحيث أن التركيز البكتيري الأولي (القطر الخارجي: 660 نانو متر) بلغ 0.4. تم إخضاع الخليط إلى تحضين في ظل التهوية

والتقليب عند 28 درجة مئوية، بمعدل تهوية 1.8 لتر/دقيقة بحيث بلغ الحد الأدنى لتركيز الأكسجين المذاب 5%. تم إضافة جليسين وحمض ليفولينيك لإعطاء تركيزات تبلغ 65 مللي مولار و5 مللي مولار، بالترتيب، عند الوقت 24 إلى 26 ساعة بعد بدء التحضين، وتم استمرار التحضين عند سرعة دوران تقليب تبلغ 420 دورة في الدقيقة مع الاحتفاظ بالرقم الهيدروجيني of من 6.4 إلى 6.5 باستخدام حمض سلفريك. علاوة على ذلك، جليسين تم إضافة للحصول على تركيز قدره 65 مللي مولار كل 12 ساعة بعد التحضين لمدة 40 ساعة، وتم إيقاف التحضين 52 ساعة بعد الإضافة الأولى لجليسين. الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك كما هو مبين في الجدول 11.

[0076] (المثال المقارن 6)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 5 بحيث أنه تم إضافة صوديوم L-جلوتامات مونو هيدرات للحصول على تركيز قدره 9.3 جم/لتر. الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك كما هو مبين في الجدول 11.

[0077] (المثال 13)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 6 باستثناء أنه بعد التحضين لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز قدره 5 مللي مولار. الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك كما هو مبين في الجدول 11.

[0078] (المثال 14)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 6 باستثناء أنه بعد التحضين لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز يبلغ 7.5 مللي مولار. الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك كما هو مبين في الجدول 11.

[0079] (المثال 15)

تم تنفيذ نفس الإجراء المبين في المثال المقارن 6 باستثناء أنه بعد التحضين لمدة 24 إلى 26 ساعة، تم إضافة L-أرجينين للحصول على تركيز يبلغ 10 مللي مولار. الكميات المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك وحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك كما هو مبين في الجدول 11.

[0080] [الجدول 11]

| | تركيز من حمض L-جلوتاميك (مللي مولار) | التركيز النهائي للمحلول المضاف L-أرجينين (مللي مولار) | عند نقطة إيقاف التحضين | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | كمية متراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك (مللي مولار) | كمية متراكمة من حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك (مللي مولار) | نسبة الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك/حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك (مللي مولار/مللي مولار) |
| المثال المقارن 5 | 40.6 | 0 | 65.8 | 2.75 | 23.9 |
| المثال المقارن 6 | 49.7 | 0 | 69.0 | 2.92 | 23.6 |
| المثال 13 | 49.7 | 5 | 71.2 | 2.39 | 29.8 |
| المثال 14 | 49.7 | 7.5 | 71.2 | 2.10 | 33.9 |
| المثال 15 | 49.7 | 10 | 69.8 | 2.01 | 34.7 |

[0081] كما هو مبين بوضوح في الجدول 11، إن إضافة L-أرجينين عملت على تحسين إنتاجية حمض 5-أمينو ليفولينيك وأيضا تثبيط الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك عند النقطة الزمنية 52 ساعة بعد إضافة جليسين. ونتيجة لذلك،

زادت نسبة الكمية المتراكمة من حمض 5-أمينو ليفولينيك إلى تلك الخاصة بحمض 5-أمينو -4-هيدروكسي بنتانويك حتى حوالي 50%.

## عناصر الحماية

1. طريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه، تشتمل على استنبات كائن دقيق منتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك في وسط به واحد أو أكثر من المكونات التي يتم اختيارها من L-أرجينين، حمض جلوتاميك، وملح منه، حيث

يتراوح محتوى حمض جلوتاميك أو الملح منه من 42 إلى 100 مللي مولار في الوسط في صورة حمض الجلوتاميك.

2. الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لعنصر الحماية 1، حيث

يتراوح محتوى L-أرجينين أو الملح منه 0.01 إلى 30 مللي مولار في الوسط في صورة L-أرجينين.

3. الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث

يتراوح محتوى L-أرجينين أو الملح منه 0.5 إلى 15 مللي مولار في الوسط في صورة L-أرجينين.

4. الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لأي من عناصر الحماية 1 إلى 3، حيث

ينتمي الكائن الدقيق المنتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك إلى Rhodobacter.

5. الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لأي من عناصر الحماية 1 إلى 4، حيث

يكون الكائن الدقيق المنتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك عبارة عن Rhodobacter sphaeroides أو صورة متغيرة منه.

6. الطريقة لإنتاج حمض 5-أمينو ليفولينيك أو ملح منه وفقا لأي من عناصر الحماية 1 إلى 5، حيث

يكون الكائن الدقيق المنتج لحمض 5-أمينو ليفولينيك عبارة عن كائن دقيق يُدعى Rhodobacter sphaeroides CR-0072009 ويُودع بمقتضى FERM BP-6320.

MA 38535A1

ROYAUME DU MAROC
*******
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
*******

المملكة المغربية
---
المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية
---

# *RAPPORT DE RECHERCHE AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE*

***(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13)***

| **Renseignements relatifs à la demande** | |
|---|---|
| N° de la demande : 38535 | Date de dépôt : 19/03/2014 ;<br>Date d'entrée en phase nationale : 21/10/2015 |
| Déposant : COSMO ALA CO., LTD. | Date de priorité: 22/03/2013 |
| Intitulé de l'invention : PROCÉDÉ DE PRODUCTION D'ACIDE 5-AMINOLÉVULINIQUE OU D'UN SEL DE CELUI-CI | |

Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site http://worldwide.espacenet.com, et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.

Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :

Partie 1 : Considérations générales
- ☒ Cadre 1 : Base du présent rapport
- ☐ Cadre 2 : Priorité
- ☐ Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés

Partie 2 : Rapport de recherche

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité
- ☐ Cadre 4 : Remarques de clarté
- ☒ Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle
- ☐ Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée
- ☐ Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention

| | |
|---|---|
| **Examinateur:** M. Bendaoud | **Date d'établissement du rapport** : 09/12/2016 |
| **Téléphone:** **212 5 22 58 64 14/00** | |

**Partie 1 : Considérations générales**

*Cadre 1 : base du présent rapport*

Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :

- Description
  26 Pages
- Revendications
  6

**Partie 2 : Rapport de recherche**

**Classement de l'objet de la demande :**

CIB : C 12P 13/00

Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :

**EPOQUE, Orbit**

| Catégorie* | Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | N° des revendications visées |
|---|---|---|
| X | EP1018546; 12/07/2000 ; COSMO SOGO KENKYUSHO KK [JP]; COSMO OIL CO LTD [JP] COSMO RESEARCH INSTITUTE, ; COSMO OIL CO., LTD | 1 ; 4-6 |
| X | EP0718405; 26/06/1996; COSMO SOGO KENKYUSHO KK [JP]; COSMO OIL CO LTD [JP]; COSMO RESEARCH INSTITUTE, ; COSMO OIL COMPANY, LTD | 1-5. |
| A | "Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria", 05/1987; K. Sasaki<br>Abrégé | 1-6 |
| A | "Effect of Culture pH on the Extracellular Production of 5-Aminolevulinic Acid by Rhodobacter Sphaeroides from Volatile Fatty acids", 08/1993; K. Sasaki<br>Abrégé | 1-6 |

***Catégories spéciales de documents cités :**

-« **X** » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
-« **Y** » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
-« **A** » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
-« **P** » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs
-« **E** » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté

**Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité**

*Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle*

| | | |
|---|---|---|
| Nouveauté (N) | Revendications 2-3<br>Revendications 1 ; 4-6 | Oui<br>Non |
| Activité inventive (AI) | Revendications aucune<br>Revendications 1-6 | Oui<br>Non |
| Possibilité d'application Industrielle (PAI) | Revendications 1-6<br>Revendications aucune | Oui<br>Non |

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : EP1018546; 12/07/2000 ; COSMO SOGO KENKYUSHO KK [JP]; COSMO OIL CO LTD [JP] COSMO RESEARCH INSTITUTE, ; COSMO OIL CO., LTD
D2 : EP0718405; 26/06/1996; COSMO SOGO KENKYUSHO KK [JP]; COSMO OIL CO LTD [JP]; COSMO RESEARCH INSTITUTE, ; COSMO OIL COMPANY, LTD

1. **Nouveauté (N) :**

D1 décrit un procédé de production d'acide 5-aminolévulinique, comprenant la culture d'un microorganisme produisant de l'acide 5-aminolévulinique ayant une activité synthase de l'acide 5-aminolévulinique de 2 à 7 (nmol / min / mg de protéine) dans des conditions de culture aérobies ayant une concentration en oxygène dissous de 0,70 à 6,60 ppm et la récupération de l'acide 5-aminolévulinique à partir de la culture résultante. Le micro-organisme est Rhodobacter sphaeroides CR-0072009 (FERM BP-6320), étant le microorganisme utilisé dans les exemples de la présente demande. Le milieu de culture comprend du glutamate de sodium (tableaux 1 à 3). Le milieu 3 (voir le tableau 3) contient 7,6 g / L de glutamate de sodium, les mêmes quantités d'acide glutamique de la présente demande. Les revendications 1, 4-6 ne sont donc pas nouvelles et ne remplissent pas les conditions énoncées dans l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

Aucun des brevets mentionnés ci-dessus ne décrit l'utilisation de L-arginine avec les concentrations revendiquées, d'où l'objet des revendications 2 et 3 est nouveau.

2. **Activité inventive (AI) :**

Le document D2 qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 2 diffère de D2 par la concentration d'acide aminé du milieu de culture.

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme fournir un milieu de culture alternatif.
Le document D2 divulgue l'utilisation de L- arginine dans le milieu de culture, l'ajustement de concentration dans la formulation pour obtenir les concentrations revendiquées reste une opération de routine évidente pour l'homme du métier.
La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, l'objet des revendications 2 et 3 n'étant pas conforme au critère d'activité inventive.

3. **Possibilité d'application industrielle (PAI) :**

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible