

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 20430

(54) Procédé de production de L-arginine par fermentation.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 P 13/10.

(22) Date de dépôt 23 septembre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 12 du 26-3-1982.

(71) Déposant : Société dite : AJINOMOTO CO, INC., résidant au Japon.

(72) Invention de : Kunihiko Akashi, Yayoi Nakamura, Takayasu Tsuchida, Hiroe Yoshii et Shigeo Ikeda.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Beau de Loménie,
55, rue d'Amsterdam, 75008 Paris.

La présente invention concerne un procédé pour produire la L-arginine par fermentation.

On sait que la L-arginine est produite par un procédé de fermentation dans lequel on utilise des mutants du genre Brevibacterium ou Corynebacterium résistants à un médicament du type sulfamide ou à un antagoniste de l'arginine (demande de brevet japonaise publiée sans examen n° 48189/1975).

On a maintenant trouvé que la productivité de L-arginine est notablement accrue lorsque l'on rend résistants à l'acide céto-malonique, à l'acide fluoro-malonique, à l'acide monofluoro acétique ou à un antagoniste des aspartates les mutants connus qui appartiennent au genre Brevibacterium ou Corynebacterium et qui sont capables de produire la L-arginine.

Les micro-organismes utilisés selon l'invention sont les mutants qui appartiennent au genre Brevibacterium ou Corynebacterium, qui sont résistants à l'acide céto-malonique, à l'acide fluoro-malonique, à l'acide monofluoroacétique ou aux antagonistes des aspartates et qui sont capables de produire la L-arginine.

Les mutants tels que définis ci-dessus peuvent être produits à partir des souches mères du genre Brevibacterium ou Corynebacterium par des procédés classiques de mutation tels qu'irradiation par les ultraviolets ou exposition à la N-méthyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine et ensuite récolte des colonies qui sont formées sur le milieu à la gélose contenant la quantité des agents chimiques inhibant la croissance de la souche mère.

Comme souches mères on peut utiliser des mutants capables de produire la L-arginine ou des souches sauvages du genre Brevibacterium ou Corynebacterium. Lorsque l'on utilise comme souches mères des souches sauvages, la productivité de L-arginine est donnée aux souches sauvages avant ou après la résistance aux agents chimiques de l'invention.

Pour donner la productivité de la L-arginine aux micro-organismes du genre Brevibacterium ou Corynebacterium, comme on le sait, on donne aux micro-organismes la résistance aux antagonistes de la L-arginine tels que 2-thiazole alanine et arginine hydroxamate,

ou aux médicaments du type sulfamide. Les antagonistes de l'arginine sont des substances chimiques qui inhibent la croissance des micro-organismes du genre *Brevibacterium* et *Corynebacterium* et l'inhibition est supprimée lorsque le milieu contient de la

5 L-arginine.

Les sources sauvages préférées appartenant au genre *Brevibacterium* ou *Corynebacterium* sont des bactéries productrices d'acide L-glutamique coryne-formes, par exemple :

	<i>Brevibacterium divaricatum</i>	ATCC 14020,
10	<i>Brevibacterium flavum</i>	ATCC 14067,
	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	ATCC 13869,
	<i>Brevibacterium saccharolyticum</i>	ATCC 14066,
	<i>Brevibacterium roseum</i>	ATCC 13825,
	<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i>	ATCC 13870,
15	<i>Corynebacterium lilium</i>	ATCC 15990 et
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032.

Les antagonistes des aspartates de l'invention inhibent la croissance des micro-organismes du genre *Brevibacterium* ou *Corynebacterium* et l'inhibition est supprimée partiellement ou

20 complètement lorsque le milieu contient du L-aspartate; on peut citer par exemple la β -aspartylhydrazine, l'acide diamino succinique et l'hadacidine.

Des exemples des mutants de l'invention sont les suivants :

25	<i>Brevibacterium flavum</i>	AJ 11337, FERM-P 4940, NRRL B-12 235 (SD ^r , AspHd ^r)
	<i>Brevibacterium flavum</i>	AJ 11338, FERM-P 4941, NRRL B-12 236 (SD ^r , AS ^r)
30	<i>Brevibacterium flavum</i>	AJ 11339, FERM-P 4942, NRRL B-12 237 (SD ^r , HD ^r)
	<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i>	AJ 11341, FERM-P 4944, NRRL B-12 238 (SD ^r , AspHd ^r)
35	<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i>	AJ 11342, FERM-P 4945, NRRL B-12 239 (SD ^r , AS ^r)

- Brevibacterium flavum AJ 11343, FERM-P 4946,
NRRL B-12240
(2TA^r, SG^r, His⁻, HD^r)
- 5 Brevibacterium flavum AJ 11595, FERM-P 5637,
NRRL B-12242
(SD^r, KM^r)
- Brevibacterium flavum AJ 11596, FERM-P 5638,
NRRL B-12243
(SD^r, FM^r)
- 10 Brevibacterium flavum AJ 11597, FERM-P 5639,
NRRL B-12244
(SD^r, FA^r)
- Corynebacterium acetoacidophilum AJ 11598, FERM-P 5640,
NRRL B-12245
(SD^r, KM^r)
- 15 Brevibacterium flavum AJ 11344, FERM-P 4947,
NRRL B-12241
(2TA^r, SG^r, His⁻, HD^r)
- 20 Corynebacterium acetoacidophilum AJ 11599, FERM-P 5641,
NRRL B-12246
(SD^r, FA^r)
- Brevibacterium flavum AJ 11600, FERM-P 5642,
NRRL B-12247
(2TA^r, SG^r, His⁻, FA^r)
- 25 SD^r : résistance à la sulfadiazine
2TA^r : résistance à la 2-thiazolealanine
SG^r : résistance à la sulfaguanidine
His⁻ : histidine nécessaire à la croissance
Asp Hd^r : résistance à l'aspartylhydrazine
- 30 AS^r : résistance à l'acide diaminosuccinique
HD^r : résistance à l'hadacidine
KM^r : résistance à l'acide céto-malonique
FM^r : résistance à l'acide fluoro-malonique
FA^r : résistance à l'acide monofluoro-acétique.

35 On indique ci-dessous la méthode de production
des mutants de l'invention :

Expérience 1

On traite *Brevibacterium flavum* AJ 3277 (SD^F), dérivé de ATCC 14067, avec 250 µg/ml de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine à 30°C pendant 30 minutes. On étale ensuite les cellules microbiennes sur un milieu de gélose contenant la quantité d'acide céto-malonique qui inhibe la croissance de la souche mère.

Après la culture, on reprend les colonies sur le milieu de gélose et on examine leur productivité de L-arginine.

Parmi les mutants ainsi obtenus on choisit *B. flavum* AJ 11595 qui peut produire une plus forte quantité de L-arginine que tous les autres mutants.

Les autres mutants de l'invention sont obtenus de manière analogue. Le degré de résistance des mutants de l'invention aux agents chimiques est déterminé par l'expérience suivante.

Expérience 2

On lave chacune des souches d'essai avec le milieu de culture aqueux indiqué dans le tableau I ci-après, on met les cellules en suspension dans le même milieu (la densité optique à 562 nm de la suspension à la dilution 26 fois est de 0,3 à 0,33), et on place 0,1 ml de la suspension dans 40 ml du même milieu qui contient en outre la quantité des agents chimiques indiqués dans les tableaux II et III et on place dans un petit tube à essais.

TABLEAU I

Composition du milieu à la gélose (pH : 7,2)

	<u>Composant</u>	<u>concentration</u>	<u>composant</u>	<u>concentration</u>
25	Glucose	2,0 g/dl	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg/dl
	Urée	0,3 g/dl	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	1,0 mg/dl
	Sulfate d'ammonium	1,0 g/dl	Biotine	10 mg/dl
	KH_2PO_4	0,1 g/dl	Thiamine, HCl	100 µg/l
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,04 g/dl		

On cultive à 31,5°C pendant 48 heures en agitant. On détermine ensuite la croissance de chaque souche en mesurant la densité optique à 562 nm des bouillons résultants et les résultats sont indiquées dans les tableaux II et III. Dans les tableaux II et III, le degré de résistance est représenté par les valeurs relatives de la croissance du témoin.

TABLEAU II

Degré de résistance

Agent chimique	Souches essayées	0	concentration (g/dl)				10
			1	2	4	5	
acide céto-malonique	AJ 3277	100	59			8	5
	AJ 11595	"	100			100	20
	AJ 3278	"	44			5	0
	AJ 11598	"	100			95	25
acide fluoro-malonique	AJ 3277	"	54			5	0
	AJ 11596	"	103			102	60
acide mono-fluoroacétique	AJ 3277	"		45	0	0	60
	AJ 11597	"		110	100	100	
	AJ 11193	"		53	4	0	
	AJ 11600	"		110	100	90	
	AJ 3278	"		47	0	0	
	AJ 11599	"		110	90	90	

TABLEAU III

Degré de résistance

Agent chimique	Souches essayées	0	Concentration		
			0,1	0,5	1,0 (g/dl)
β -aspartyl-hydrazine	AJ 3277	100	50	18	8
	AJ 11337	100	90	63	27
	AJ 3278	100	45	23	8
	AJ 11341	100	93	51	19
	AJ 11193	100	48	12	7
	AJ 11343	100	91	83	13
2,6-diamino succinate	AJ 3277	100	55	22	10
	AJ 11338	100	92	65	25
	AJ 3278	100	43	19	5
	AJ 11342	100	91	55	23
Hadacidine	AJ 3277	100	55	16	9
	AJ 11339	100	85	65	23
	AJ 11344	100	92	79	17
	AJ 11193	100	41	8	4

On cultive les mutants en conditions aérobies dans un milieu de culture classique contenant des sources de carbone, des sources d'azote et des ions organiques et si nécessaire des oligo-éléments.

5 Comme sources de carbone, on peut utiliser de préférence des saccharides tels que glucose, fructose et saccharose et des mélasses et l'amidon hydrolysé contenant ces saccharides, des acides organiques tels qu'acide acétique et acide propionique et des alcools. Les sources d'azote sont, par exemple, le sulfate
10 d'ammonium, le gaz ammoniac et l'urée.

La culture est effectuée de préférence en condition aérobies pendant 2 à 7 jours et la température du milieu de culture est réglée entre 24 et 37°C, en ajustant de préférence le pH du milieu à 5,0-9,0 au moyen d'un acide ou d'un alcali organique
15 ou inorganique. A cet effet on peut aussi utiliser l'urée, le carbonate de calcium ou le gaz ammoniac.

La L-arginine accumulée dans le bouillon de culture peut être récupérée par une méthode tout à fait classique, utilisant par exemple une résine échangeuse d'ions.

20 Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

Exemple 1

Dans des fioles de 500 ml on place 25 ml du milieu de culture (A) dont la composition est donnée dans le tableau IV ci-après, et on chauffe à 110°C pendant 5 minutes pour
25 stériliser. On ajoute ensuite dans chaque fiole 1,0 g de CaCO_3 stérilisé séparément.

TABLEAU IV

Composition du milieu de culture

	Composant		Milieu			
			A	B	C	D
5	Glucose	(g/dl)	10,0	3,0	-	-
	Ethanol	(g/dl)	-	-	1,0	1,5
	Sulfate d'ammonium	(g/dl)	6,0	2,0	0,5	-
	Acétate d'ammonium	(g/dl)	-	0,5	-	0,3
	Urée	(g/dl)	-	0,2	0,2	-
10	KH ₂ PO ₄	(g/dl)	0,1	0,1	0,1	0,1
	MgSO ₄	(g/dl)	0,04	0,04	0,04	0,04
	FeSO ₄	(mg/dl)	1,0	1,0	1,0	1,0
	MnSO ₄	(mg/dl)	1,0	1,0	1,0	1,0
	Biotine	(µg/l)	50	50	50	50
15	Thiamine, HCl	(µg/l)	20	20	50	200
	Hydrolysate de protéines de soja (7,0 %)	(ml/dl)	1,0	2,5	2,5	1,5
	CaCO ₃	(g/dl)	5,0	-	-	-
	pH		7,0	7,5	7,5	7,5

- 20 On inocule *Brevibacterium flavum* AJ 11600 et AJ 11343 préalablement cultivés sur des tranches de gélose au bouillon dans chaque lot du milieu de culture et on cultive en agitant à 31°C pendant 72 heures. Après 72 heures de culture, on détermine par colorimétrie la L-arginine accumulée dans le bouillon de culture résultant et les résultats sont indiqués dans le tableau V ci-dessous.

TABLEAU V

	Souche	L-arginine accumulée
30	AJ 11600	3,6 g/dl
	AJ 11343	3,5 g/dl

On recueille un litre de bouillon de culture de AJ 11600 préparé de la même manière que ci-dessus et on centrifuge pour séparer les cellules microbiennes et le CaCO_3 solide. On fait passer 1 litre de solution surnageante ainsi obtenue sur une colonne de résine Amberlite C-50 sous la forme NH_4^+ , la L-arginine étant adsorbée sur la résine, et on élue par l'ammoniaque aqueuse de 2N. On évapore l'éluat et on refroidit la solution concentrée à faible température, suffisamment pour cristalliser la L-arginine. Lorsque la cristallisation est terminée, on sépare de la liqueur mère 23,3 g de L-arginine cristallisée.

De manière semblable, on obtient 22,7 g de L-arginine cristallisée à partir du bouillon de culture de AJ 11343.

Exemple 2

On cultive de la même manière que décrit à l'exemple 1 chacune des souches énumérées dans le tableau V ci-après précédemment cultivées sur une tranche de gélose au bouillon, et on détermine la quantité de L-arginine accumulée dans le bouillon de culture. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU VI

	Souche	L-arginine accumulée (g/dl)
20	AJ 3277	1,80
	AJ 11595	1,92
	AJ 11596	1,84
	AJ 11597	1,90
25	AJ 11337	2,00
	AJ 11338	1,90
	AJ 11339	1,85
	AJ 3278	1,70
	AJ 11598	1,86
30	AJ 11599	1,91
	AJ 11341	1,90
	AJ 11342	1,85
	AJ 11193	3,30
	AJ 11600	3,60
35	AJ 11344	3,45

Exemple 3

On place 300 ml de milieu (C) indiqué dans le tableau IV dans un fermenteur de 1,0 l et on chauffe à 110°C pendant 5 minutes pour stériliser. On l'inocule ensuite avec 15 ml
5 de bouillon de culture d'ensemencement de *Brevibacterium flavum* AJ 11599 préalablement cultivés dans le milieu (D) en conditions aérobies à 31°C avec agitation et aération.

Pendant la culture, on maintient le pH du milieu dans l'intervalle de 7,2 à 8,0 avec addition d'acide acétique et
10 de solution d'acide acétique.

Après 55 heures de culture, il s'est accumulé dans le bouillon de culture 4,24 g/dl de L-arginine. Le volume de solution d'acide acétique utilisé pendant la culture est de 20 % du volume initial du milieu de culture. A partir de 300 ml du bouil-
15 lon de culture ainsi préparé, on obtient 9,20 g de L-arginine cristallisée de la même manière que décrit à l'exemple 1.

Exemple 4

On cultive *Brevibacterium flavum* AJ 11343 dans le milieu (D) indiqué dans le tableau IV à 31°C pendant 18 heures avec
20 agitation et aération pour préparer un bouillon de culture d'ensemencement.

On place ensuite 300 ml de milieu (C) dans un fermenteur de 1,0 litre, on stérilise à 110°C pendant 5 minutes, on inocule avec 15 ml du bouillon de culture d'ensemencement et
25 on maintient à une température de 31°C avec agitation et aération. Pendant la culture on maintient le pH du milieu entre 7,2 et 7,8 au moyen de gaz ammoniac. La concentration de l'éthanol dans le milieu est déterminée par chromatographie gazeuse et on introduit de petites portions d'éthanol dans le milieu lorsque la concentration en éthanol
30 atteint environ 0,3 %. Après 48 heures de culture, on a consommé 48 g d'éthanol et on trouve 2,57 g/dl de L-arginine dans le bouillon de culture. On récupère 4,75 g de L-arginine de la manière indiquée à l'exemple 1.

Il est entendu que l'invention n'est pas limitée
35 aux modes de réalisation préférés décrits ci-dessus à titre d'illustration et que l'homme de l'art peut y apporter diverses modifications et divers changements sans toutefois s'écarter du cadre et de l'esprit de l'invention.

RE V E N D I C A T I O N S

1. Procédé pour la production de L-arginine par fermentation, consistant
 - (a) à cultiver en conditions aérobies dans un milieu de culture un mutant capable de produire la L-arginine appartenant au genre
- 5 Brevibacterium ou Corynebacterium, et
 - (b) à récupérer la L-arginine accumulée dans le milieu de culture, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant à l'acide céto-malonique, à l'acide fluoro-malonique, à l'acide monofluoro-acétique ou aux antagonistes des aspartates.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mutant appartient à l'espèce Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium divaricatum, Corynebacterium glutamicum ou Corynebacterium acetoacidophilum.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en
- 15 ce que ledit mutant est résistant à l'aspartylhydrazine, à l'acide diaminosuccinique ou l'hadacidine.
5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant aux médicaments du type sulfamide ou aux antagonistes de l'arginine.
- 20 6. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant aux médicaments du type sulfamide ou aux antagonistes de l'arginine.
7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant aux médicaments du type sulfadiazine, sulfaguanidine ou 2-thiazolealanine.
- 25 8. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant aux médicaments du type sulfadiazine, sulfaguanidine ou 2-thiazolealanine.
9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en
- 30 ce que ledit mutant est résistant à la 2-thiazolealanine et la sulfaguanidine.
10. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant à la 2-thiazolealanine et la sulfaguanidine.

11. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant à la sulfadiazine et à la β -aspartylhydrazine, à la sulfadiazine et à l'acide diaminosuccinique, à la sulfadiazine et l'hadacidine, à la 2-thiazolealanine et à la sulfaguanidine et à la β -aspartylhydrazine, ou à la 2-thiazolealanine, à la sulfaguanidine et à l'hadacidine.

12. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mutant est résistant à la sulfadiazine et à l'acide céto-malonique, à la sulfadiazine et à l'acide fluoro-malonique, à la sulfadiazine et à l'acide monofluoro-acétique, ou à la 2-thiazolealanine et à la sulfaguanidine et à l'acide monofluoro-acétique.