

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

⑪ N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 459 832

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑫

N° 80 14132

⑤④ Procédé pour produire de la L-histidine par fermentation.

⑤① Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 P 13/24.

②② Date de dépôt..... 25 juin 1980.

③③ ③② ③① Priorité revendiquée : Japon, 25 juin 1979, n° 79851/79.

④① Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 3 du 16-1-1981.

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

⑦② Invention de : Kounosuke Sano et Takayasu Tsuchida.

⑦③ Titulaire : *Idem* ⑦①

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

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

On sait que des mutants auxotrophes ou résistant aux drogues appartenant, par exemple, aux genres Brevibacterium,
5 Corynebacterium (brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 716 453);
Escherichia (H.S. Moyed, M. Friedman : Science 129, 968 (1959)) et
Serratia (demande de brevet japonais non examinée publiée
n° 116 296/1973) sont utiles pour la production de L-histidine par
fermentation.

10 La demanderesse a choisi un mutant du genre
Escherichia résistant à un analogue de l'histidine comme donneur
d'acide désoxyribonucléique (appelé ci-après ADN) pour obtenir à
partir de ce mutant un fragment d'ADN possédant une information
génétique concernant la production de L-histidine et a finalement
15 inséré le fragment d'ADN dans un vecteur obtenu à partir d'Escherichia
coli. Le plasmide recombinant a été introduit avec succès dans un
micro-organisme du genre Escherichia. La demanderesse a découvert
que le micro-organisme de l'invention produit de la L-histidine
avec un rendement bien supérieur à celui des mutants connus produc-
20 teurs de L-histidine du genre Escherichia.

Les modes de réalisation préférés de l'invention
vont maintenant être décrits.

Le mutant du genre Escherichia résistant à un
analogue de l'histidine est connu (H.S. Moyed, F. Friedman : Science
25 129, 968 (1959)) et on l'obtient selon des techniques classiques de
mutation artificielle.

L'analogue de l'histidine que l'on utilise dans
l'invention inhibe la croissance des micro-organismes du genre
Escherichia, mais l'inhibition est empêchée en partie ou en tota-
30 lité par la présence de L-histidine. On peut citer comme exemples
d'analogues de l'histidine, la thiazolyl-2 alanine, la triazole-
1,2,4-alanine, la méthyl-2 histidine et l'histidine-hydroxamate.

Le donneur d'ADN que l'on utilise dans l'invention
peut également consister en un mutant résistant aux sulfamides,
35 tels que la sulfaguanidine, résistant à un analogue de la purine
tel que l'aza-8 guanine ou nécessitant un aminoacide tel que le
tryptophane ou la méthionine pour se développer, en même temps

qu'il résiste à un analogue de l'histidine. Généralement, plus le donneur d'ADN a un pouvoir élevé de production de la L-histidine, plus on obtient des résultats favorables.

5 On extrait l'ADN chromosomique du mutant de façon habituelle et on le traite avec une endonucléase de restriction selon le procédé habituel.

On traite également l'ADN de plasmide ou de phage que l'on utilise comme vecteur avec une endonucléase de restriction selon un mode de traitement analogue à celui de l'ADN chromosomique.
10 On peut utiliser divers types d'endonucléases de restriction pour effectuer une digestion partielle de l'ADN chromosomique.

Ensuite, on soumet l'ADN chromosomique ayant subi la digestion et l'ADN vecteur clivé à une réaction de recombinaison.

15 On peut également pour effectuer la recombinaison des fragments d'ADN, incorporer une terminaltransférase, de l'acide désoxyadénylique et de l'acide thymidylique ou de l'acide désoxyguanylique et de l'acide désoxycytidylique au fragment d'ADN chromosomique et à l'ADN vecteur clivé, puis soumettre le fragment d'ADN chromosomique modifié et le fragment d'ADN clivé à une recombinaison
20 cyclique.

Comme ADN vecteur, on peut utiliser un vecteur classique dérivant d'un plasmide ou d'un phage tel que Col EI, pSC 101, pBR 322 et R6K.

25 On peut incorporer l'ADN hybride ainsi obtenu à un micro-organisme du genre Escherichia selon une technique classique de transformation. On sélectionne le transformant désiré avec un milieu sur lequel peut seulement se développer un clone possédant les caractéristiques de production de la L-histidine du fragment d'ADN chromosomique et/ou les caractéristiques que possède l'ADN
30 vecteur.

Comme receveur de l'ADN hybride, on peut utiliser une souche quelconque du genre Escherichia.

35 Pour accroître la productivité, il est souhaitable que le receveur présente des besoins nutritionnels, par exemple en L-isoleucine, L-proline, L-arginine, L-méthionine, L-tryptophane, L-leucine, L-tyrosine, L-lysine, guanine et xanthine et une résistance, par exemple, à la sulfaméthomidine, à l'éthionine, à l'amino-2 benzothiazole, à l'aza-8 guanine, à l'aza-8 adénine, à la diamino-2,6

purine, au méthionine-sulfoxyde, à l' amino-4 pyrazole-3,4-dipyridine, à la triazole-1,2,4-alanine, isolément ou en combinaison. Il est souhaitable d'utiliser comme receveur un mutant ayant un fort pouvoir de production de la L-histidine.

5 On préfère que le donneur d'ADN présente également la résistance ou le besoin nutritionnel précité.

Les procédés de culture de la souche productrice de L-histidine ainsi obtenue sont classiques et semblables aux procédés de culture des micro-organismes connus producteurs de L-his-
10 tidine. Donc, le milieu de culture est un milieu classique contenant des sources de carbone, des sources d'azote, des ions minéraux et, lorsqu'il est nécessaire, des substances nutritives organiques secondaires, telles que des vitamines ou des aminoacides. On peut citer comme exemples de sources de carbone, le glucose, le fructose, le
15 saccharose et le lactose et des matières brutes contenant des sources de carbone, telles que les hydrolysats d'amidon et les mélasses. On peut utiliser comme sources d'azote, l'ammoniac gazeux, l'ammoniaque aqueuse, des sels d'ammonium et d'autres sources classiques d'azote. On obtient les meilleurs résultats lorsqu'on
20 ajoute au milieu plus de 50 mg/dl de dérivé de purine tel que l'adénine, l'adénosine, l'acide adénylique, l'hypoxanthine, l'inosine et l'acide inosinique.

On effectue la culture en aérobiose en ajustant le pH et la température du milieu à des valeurs appropriées et on
25 poursuit la culture jusqu'à ce que la formation de L-histidine cesse pratiquement.

On peut récupérer de façon classique la L-histidine accumulée dans le milieu de culture.

Selon l'invention, on peut produire la L-histidine
30 avec un rendement supérieur à ceux des procédés connus utilisant des souches d'Escherichia. De plus, la quantité d'acides formés comme sous-produits est faible et, par conséquent, on peut récupérer de façon simple la L-histidine avec un rendement élevé.

L'invention est illustrée par l'exemple non limitatif
35 suivant.

EXEMPLE(1) Préparation d'ADN chromosomique possédant une information génétique concernant la production de L-histidine

On cultive à 37°C en agitant Escherichia coli R-344, mutant résistant à la thiazolyl-2 alanine (2TA) et induit à partir de la souche K-12 (ATCC 10798) dans 1 litre de milieu L contenant 1 g/dl de peptone, 0,5 g/dl d'extrait de levure, 0,1 g/dl de glucose et 0,5 g/dl de chlorure de sodium (pH ajusté à 7,2) et on recueille les cellules bactériennes de la phase de croissance exponentielle. On extrait l'ADN chromosomique selon le procédé classique au phénol et on obtient 5,3 mg d'ADN purifié.

(2) Préparation de l'ADN vecteur

Comme vecteur, on prépare de la façon suivante de l'ADN du plasmide pBR 322, qui contient comme marqueurs des gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline.

On incube une souche d'Escherichia coli K-12 hébergeant le plasmide pBR 322, à 37°C, dans 1 litre de milieu glucose-"casaminoacid"--sels minéraux contenant par litre 2 g de glucose, 1 g de chlorure d'ammonium, 6 g de phosphate disodique, 3 g de phosphate monopotassique, 5 g de chlorure de sodium, 0,1 g de sulfate de magnésium heptahydraté, 0,015 g de chlorure de calcium dihydraté, 20 g de "casaminoacid" (hydrolysate de caséine), 0,05 g de L-tryptophane, 0,05 g de thymine et 100 µg de chlorhydrate de thiamine (pH ajusté à 7,2). Après incubation jusqu'à un stade avancé de la phase logarithmique, on ajoute 170 µg/ml de chloramphénicol au milieu de culture. Ces opérations provoquent le développement et l'accumulation abondante de l'ADN de plasmide dans les cellules bactériennes.

Après 16 h d'incubation, on recueille les cellules, puis on les lyse par traitement par le lysozyme et le dodécylsulfate de sodium. On centrifuge le lysat à 30 000 x g pendant 1 h pour obtenir un surnageant. Après concentration du surnageant, on obtient 580 µg d'ADN de plasmide par fractionnement par centrifugation avec un gradient de densité à base de chlorure de césium-bromure d'éthidium en équilibre.

(3) Insertion du fragment d'ADN chromosomique dans le vecteur

On traite 10 µg de l'ADN chromosomique avec l'une des endonucléases de restriction EcoRI, Pst I et Hind III à 37°C

pendant 5, 10, 20, 30 et 60 min pour cliver les chaînes d'ADN, puis on chauffe à 65°C pendant 5 min. On traite également 10 µg de l'ADN vecteur avec l'une des endonucléases de restriction EcoRI, Pst I et Hind III à 37°C pendant 1 h pour cliver totalement l'ADN, puis on chauffe à 65°C pendant 5 min.

On mélange la solution d'ADN chromosomique ayant subi la digestion et la solution d'ADN vecteur clivé et on effectue la réaction de recombinaison des fragments d'ADN au moyen de l'ADN-ligase de phage T₄ en présence d'ATP et de dithiothréitol à 10°C pendant 24 h. On traite ensuite le mélange réactionnel à 65°C pendant 5 min et on ajoute un volume double d'éthanol. On récupère l'ADN recombinant précipité.

(4) Transformation génétique avec le plasmide hybride hébergeant l'information génétique concernant la production de L-histidine

On cultive dans 10 ml de milieu L à 37°C et en agitant une souche de Escherichia coli H-13 nécessitant de la L-histidine dérivant par mutagénèse provoquée par la N-méthyl N'-nitro N-nitrosoguanidine d'Escherichia coli K-12. On recueille les cellules dans la phase de croissance exponentielle et on les met en suspension dans une solution 0,1 M en chlorure de magnésium, puis dans une solution 0,1 M en chlorure de calcium au bain-marie glacé pour préparer ainsi des cellules "compétentes" capables de fixer l'ADN.

On ajoute à la suspension de cellules compétentes l'ADN obtenu dans le stade (3) qui contient le plasmide hybride vecteur d'ADN étranger. On maintient la suspension au bain-marie glacé pendant 30 min, puis on chauffe à 42°C pendant 2 min et on laisse à nouveau reposer au bain-marie glacé pendant 30 min, puis on ensemence du milieu L avec les cellules qui ont ainsi incorporé le plasmide hybride vecteur d'ADN étranger et on agite à 37°C pendant 3 h pour achever la réaction de transformation. On recueille les cellules, on les lave et on les remet en suspension. On étale une petite portion de la suspension cellulaire sur une boîte de gélose contenant par litre 2 g de glucose, 1 g de sulfate d'ammonium, 7 g de phosphate dipotassique, 2 g de phosphate monopotassique, 0,1 g de sulfate de magnésium heptahydraté, 0,5 g de citrate de sodium dihydraté et 2 g de gélose (pH ajusté à 7,2). On incube la boîte à

37°C. Après trois jours d'incubation, on prélève toutes les colonies apparues, on les purifie et on les isole.

Les colonies de transformants sont celles qui résistent à au moins l'un des deux antibiotiques que sont l'ampicilline et la tétracycline et qui sont capables de produire de la L-histidine. On détermine la résistance à l'ampicilline (50 µg/ml) et à la tétracycline (5 µg/ml) avec le milieu gélosé L et on détermine la capacité de production de la L-histidine sur un milieu gélosé minimal sur lequel on a préalablement étalé la souche mutante H-13 nécessitant de la L-histidine.

On obtient ainsi la souche AJ 11378 (FERM-P 5038, NRRL B-12116) contenant le plasmide traité par l'Hind III, la souche AJ 11385 (FERM-P 5045, NRRL B-12118) contenant le plasmide traité par l'EcoRI et la souche AJ 11386 (FERM-P 5046, NRRL B-12119) contenant le plasmide traité par le Pst I.

(5) Production de L-histidine par les nouvelles souches productrices de L-histidine

La partie A du tableau ci-après montre les résultats expérimentaux de la production par fermentation de L-histidine avec les souches AJ 11378, AJ 11385 et AJ 11386 par comparaison avec la souche donneuse d'ADN R-344.

La partie B du tableau ci-après montre les résultats de la production par fermentation de L-histidine avec d'autres souches nouvelles productrices de L-histidine obtenues de la façon suivante.

On extrait de la souche AJ 11378 le plasmide hébergeant l'information génétique concernant la production de L-histidine. On confère à la souche R-344 la résistance à la triazole-1,2,4-alanine pour obtenir la souche R-344-34.

Pour obtenir les souches AJ 11387 (FERM-P 5047, NRRL B-12120) et AJ 11388 (FERM-P 5048, NRRL B-12121), on incorpore le plasmide hybride respectivement à la souche R-344 et à la souche R-344-34.

Le milieu de fermentation utilisé contient 5 g/dl de glucose, 2,5 g/dl de sulfate d'ammonium, 0,2 g/dl de phosphate monopotassique, 0,1 g/dl de sulfate de magnésium heptahydraté, 0,5 g/dl d'extrait de levure, 100 µg/dl de chlorhydrate de thiamine, 1 µg/dl de sulfate ferreux heptahydraté, 1 mg/dl de sulfate de manganèse

tétrahydraté et 2,5 g/dl de carbonate de calcium (stérilisé séparément) et le pH est ajusté à 7,0.

On introduit dans des flacons de 500 ml des portions de 20 ml du milieu de fermentation, on ensemence avec une
5 anse d'inoculum des micro-organismes à étudier et on cultive à 31°C pendant 72 h.

On détermine par méthode microbiologique la concentration en L-histidine du bouillon de fermentation surnageant.

Bien entendu, diverses modifications peuvent être
10 apportées par l'homme de l'art aux dispositifs ou procédés qui viennent d'être décrits uniquement à titre d'exemple non limitatif sans sortir du cadre de l'invention.

TABLEAU

Micro-organisme étudié		L-histidine produite (mg/dl)
A	R-344	6,0
	AJ 11378	15
	AJ 11385	25
	AJ 11386	18
B	AJ 11378	10
	AJ 11387	42
	AJ 11388	255

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

1. Procédé pour produire de la L-histidine par fermentation, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver dans un milieu de culture un micro-organisme producteur de L-histidine formé
5 par incorporation d'un plasmide hybride à une souche receveuse du genre Escherichia et à récupérer la L-histidine accumulée dans le milieu de culture, ce plasmide hybride ayant reçu un fragment d'acide désoxy-ribonucléique possédant une information génétique concernant la production de L-histidine et obtenu à partir d'un mutant du genre
10 Escherichia résistant à un analogue de l'histidine.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le micro-organisme producteur de L-histidine est Escherichia coli NRRL B-12116, Escherichia coli NRRL B-12118, Escherichia coli NRRL B-12119, Escherichia coli NRRL B-12120 ou Escherichia coli
15 NRRL B-12121.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'analogue de l'histidine est la thiazolyl-2 alanine, la triazole-1,2,4-alanine ou l'histidine-hydroxamate.
4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé
20 en ce que le receveur appartient à Escherichia coli.
5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mutant appartient à Escherichia coli.