

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 661 191

②1 N° d'enregistrement national :

91 04890

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 P 13/08/(C 12 P 13/08)(C 12 R 1/15)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 19.04.91.

③0 Priorité : 20.04.90 JP 10445990.

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 25.10.91 Bulletin 91/43.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société dite: AJINOMOTO CO., INC*
— JP.

⑦2 Inventeur(s) : Murakami Yutaka, Miwa Harufumi et Nakamori Shigeru.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Beau de Loménie.

⑤4 Procédé de production de L-Lysine par fermentation et mutant pour la mise en œuvre du procédé.

⑤7 Procédé de production de L-lysine par fermentation, qui comprend la culture dans un milieu d'un mutant producteur de L-lysine appartenant au genre *Corynebacterium* capable de croître même à 40°C ou à une température supérieure et présentant une résistance à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine pour produire et accumuler de la L-lysine dans le milieu de culture, et la récupération de la L-lysine à partir du milieu de culture, et mutant correspondant.

FR 2 661 191 - A1



La présente invention concerne un procédé de production de L-lysine par fermentation qui comprend la culture dans un milieu de culture d'un mutant producteur de L-lysine appartenant au genre *Corynebacterium*, capable de croître même à 40°C ou à des températures plus élevées et qui présente une résistance à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine, pour produire et accumuler de la L-lysine dans le milieu de culture, et la récupération de la L-lysine à partir du milieu de culture, ainsi qu'un nouveau mutant producteur de L-lysine qui peut être utilisé de façon avantageuse pour un tel procédé de production de L-lysine par fermentation.

La L-lysine, qui est importante comme additif pour aliments pour le bétail, est préparée principalement par fermentation.

Dans la préparation industrielle de la L-lysine par fermentation, il existe certains facteurs techniques qui permettent une amélioration du point de vue économique. Ces facteurs sont, par exemple, une amélioration du rendement par rapport au sucre, une amélioration de la concentration de L-lysine accumulée, un raccourcissement des durées de culture, etc.

En outre, il est important d'augmenter la température de culture. En général, la culture est réalisée à une température optimale pour la production de L-lysine par fermentation. Lorsque l'on utilise des bactéries productrices de L-lysine classiques, cette température est en général comprise entre 28 et 35°C. Au début de la culture, il y a dégagement de chaleur de fermentation de sorte que, lorsque le système est laissé au repos, la température du milieu de culture augmente si bien que la formation de L-lysine décroît fortement. Afin de maintenir la température du milieu de culture dans la gamme optimale, il est nécessaire de monter un échangeur de chaleur dans un réservoir de fermentation et de prévoir un circuit d'eau refroidie dans le réservoir. Pour obtenir de l'eau refroidie, il est nécessaire d'utiliser un condenseur. Cependant, du fait que la chaleur de fermentation dégagée est très importante, l'énergie électrique consommée par le condenseur devient importante elle aussi. Ainsi, si la température de culture pour la production de L-lysine par fermentation augmente, la charge

de refroidissement diminue, si bien que la production de L-lysine à l'échelle industrielle peut être améliorée du point de vue économique.

05 On a proposé un procédé, décrit dans le brevet coréen
publié n° 85-1231 (publié le 23 août 1985) pour augmenter la tempé-
rature de culture lors de la production de L-lysine par fermenta-
tion. Ce procédé comprend l'utilisation d'un variant producteur de
L-lysine TR-3579 (KFCC 10065) appartenant au genre *Corynebacterium*,
présentant une résistance aux analogues de lysine et à la tempéra-
10 ture et exigeant de l'homosérine, de la leucine et de la valine en
combinaison, et la culture du variant dans un milieu à température
élevée (37 à 45°C) pour produire et accumuler de la L-lysine dans
le milieu de culture.

15 Le variant producteur de L-lysine utilisé dans ce procédé
étant obtenu par amélioration de bactéries productrices de L-lysine
classiques (cultivées entre 30 et 35°C) par un traitement mutagène
pour produire de la L-lysine à haute température (37 à 45°C),
le variant présente une auxotrophie complexe pour l'homosérine, la
leucine et la valine comme évoqué ci-dessus, du fait du traitement
20 mutagène en plusieurs étapes. Ce procédé ne peut donc pas être mis
en oeuvre dans la pratique.

La demande de brevet japonais mise à la disposition du
public n° 58-170487 décrit un procédé de production de L-lysine par
fermentation qui comprend la culture dans un milieu de culture d'un
25 mutant appartenant au genre *Corynebacterium*, qui a une activité de
pyruvate kinase réduite, capable de produire de la L-lysine et qui
présente également éventuellement une résistance à la S-(2-amino-
éthyl)-L-cystéine, pour produire et accumuler de la L-lysine dans
le bouillon de culture, puis la récupération de la L-lysine.

30 Dans ce procédé, la température pour la fermentation est
réglée entre 20 et 40°C comme cela ressort du seul exemple de mise
en oeuvre (exemple 1) dans lequel on adopte une température de
30°C et, comme le présent inventeur a pu le confirmer en repro-
duisant ce procédé, la croissance des bactéries utilisées n'est
35 pas notable à environ 40°C, température qui constitue la limite
supérieure de la gamme de températures pour la fermentation. En

outre, on ne note pas de formation et d'accumulation marquée de L-lysine.

05 La présente invention a pour objet de fournir des bactéries capables de produire de la L-lysine par fermentation à haute température qui soient susceptibles d'être utilisée dans la pratique ainsi qu'un procédé de production de L-lysine par fermentation à haute température qui soit susceptible d'être utilisé dans la pratique.

10 A la suite de recherches approfondies pour résoudre les problèmes ci-dessus, on a constaté qu'en utilisant le mutant bactérien modifié pour produire de la L-lysine en communiquant une résistance à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine à des bactéries thermophiles appartenant au genre *Corynebacterium* capables de croître à 40°C ou à des températures supérieures, il est possible d'atteindre
15 les objets décrits ci-dessus. La présente invention est basée sur cette constatation.

Le mutant producteur de L-lysine appartenant au genre *Corynebacterium*, capable de croître à 40°C ou à des températures supérieures, présentant une résistance à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine, qui peut être utilisé dans la présente invention, peut
20 être obtenu en soumettant des bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* et capables de croître à 40°C ou à des températures supérieures, par exemple des bactéries productrices d'acide L-glutamique, en tant que souche parentale, à un traitement mutagène.
25

Comme souche parentale de ce type, on peut citer par exemple les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* thermaminogènes qui sont décrites dans la demande de brevet japonais mise à la disposition du public n° 63-240779 et qui proviennent de
30 sources naturelles.

Il n'est pas particulièrement difficile de recueillir le mutant producteur de L-lysine après avoir soumis la souche parentale à un traitement mutagène, et on peut appliquer un procédé connu classique pour recueillir un mutant résistant du point de vue
35 chimique. Par exemple, la souche parentale qui a été soumise à un

traitement mutagène avec la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (250 µg/ml, 30°C, 30 min), etc., est inoculée sur un milieu constitué par des plaques d'agar ordinaires contenant 1 à 2 g/dl de S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine dans lequel la souche parentale ne
05 peut pas croître, et est cultivée à 40°C ou à une température supérieure, par exemple 43°C. La colonie obtenue est recueillie pour obtenir le mutant souhaité.

Des exemples de mutants producteurs de L-lysine ainsi recueillis sont les suivants :

10 Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12521, Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12522, Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12523 et Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12524.

Les propriétés bactériologiques de ces mutants sont présentées dans le tableau 1 sous les rubriques 1 à 6.

15 A titre d'information, les bactéries Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12308 et AJ 12309 qui sont les souches parentales ont été déposées au niveau international auprès de l'Institut de Recherches sur les Fermentations de l'Agence des Sciences et Technologies Industrielles du Japon (Fermentation Research
20 Institute of the Agency of Industrial Science and Technology of Japan) sous les numéros de dépôt FERM BP-1540 et FERM BP-1541, respectivement. De plus, les mutants Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12521, AJ 12522, AJ 12523 et AJ 12524 ont également été déposés au niveau international auprès du même organisme sous les
25 numéros de dépôt FERM BP-3304, FERM BP-3305, FERM BP-3306 et FERM BP-3307, respectivement.

T A B L E A U 1-1

	<u>Souche parentale</u>	<u>Mutant</u>	<u>Souche parentale</u>	<u>Mutant</u>
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12309	AJ 12523
	<u>FERM BP-1540</u>	<u>FERM BP-3304</u>	<u>FERM BP-1541</u>	<u>FERM BP-3306</u>
		AJ 12522		AJ 12524
		<u>FERM BP-3305</u>		<u>FERM BP-3307</u>
Forme :				
(1) Forme et taille des cellules	Bâtonnet de 0,7-1,0 x 1,0-4,0 µm ; les bords des cellules sont arrondis. On note une configuration en V due à une division.	idem	idem	idem
(2) Polymorphisme	On ne note pas de polymorphisme mais parfois, selon la phase d'incubation, des cellules en bâtonnets allongés, des cellules en filaments et des cellules prématurément ramifiées.	idem	idem	idem
(3) Mobilité	aucune	idem	idem	idem
(4) Spore	aucun	idem	idem	idem
(5) Coloration Gram	positive	idem	idem	idem
(6) Antiacide	négatif	idem	idem	idem

T A B L E A U 1-2

	<u>Souche parentale</u>		<u>Mutant</u>		<u>Souche parentale</u>		<u>Mutant</u>	
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309	AJ 12523	AJ 12524		
Propriétés physiologiques :								
(1) Culture sur plaques de milieu gélosé	Croissance abondante ou modérée ; les colonies sont circulaires, lisses, totalement convexes, brillantes, opaques ou translucides, jaune mat butyreux.	idem	idem	idem	idem	idem		
(2) Culture sur milieu gélosé incliné	Croissance abondante ou modérée ; colonies filiformes, brillantes, jaune mat.	idem	idem	idem	idem	idem		
(3) Culture en milieu Liquide	Croissance modérée ; Les colonies deviennent troubles, presque uniformément, mais certaines cellules précipitent.	idem	idem	idem	idem	idem		
(4) Culture sur milieu de gélatine piqué*	Croissance modérée ; pas de gélatine liquéfiée	idem	idem	idem	idem	idem		
(5) Lait de tournesol	Légèrement alcalin ; on ne note ni liquéfaction, ni solidification.	idem	idem	idem	idem	idem		

* Un milieu de culture solidifié par addition de gélatine est piqué avec un fil de platine sur lequel se trouvent des cellules de micro-organisme, puis cultivé et on observe la croissance de la souche et la liquéfaction du milieu.

T A B L E A U 1-3

	<u>Souche parentale</u>		<u>Mutant</u>		<u>Souche parentale</u>		<u>Mutant</u>	
	AJ 12308		AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309	AJ 12523	AJ 12524	
Propriétés physiologiques :								
(1) Réduction de nitrates	positive	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(2) Denitration	négative	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(3) Test au rouge de méthyle	négatif ou légèrement positif	idem	idem	idem	négatif	idem	idem	
(4) Test de Voges-Proskauer	positif	idem	idem	idem	négatif	idem	idem	
(5) Formation d'indole	négative	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(6) Formation de sulfure d'hydrogène	positive	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(7) Hydrolyse de l'amidon	négative	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(8) Utilisation du citrate	Ne croît pas dans le milieu de Koser, mais croît dans le milieu de Christensen ; rend le milieu alcalin.	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(9) Utilisation de l'azote inorganique	N'utilise pas les nitrates, mais utilise les sels d'ammonium.	idem	idem	idem	idem	idem	idem	

T A B L E A U 1-4

	<u>Souche parentale</u>	<u>Mutant</u>	<u>Souche parentale</u>	<u>Mutant</u>
(10) Formation de pigment	AJ 12308 pas de formation extracellulaire de pigment	AJ 12521 idem	AJ 12309 idem	AJ 12523 idem
(11) Test à l'urée	négatif ou légèrement positif	idem	idem	idem
(12) Oxydase	négative	idem	idem	idem
(13) Catalase	positive	idem	idem	idem
(14) Domaine de croissance	croît bien à pH 7-8,5 ; croît bien à 35-45°C croît légèrement à 46-50°C	idem	idem	idem
(15) Comportement vis-à-vis de l'oxygène	aérobie ou facultativement anaérobie	idem	idem	idem
(16) Test d'oxydation- fermentation (glucose)	croît par fermentation pour former de l'acide	idem	idem	idem

T A B L E A U 1-5

	<u>Souche parentale</u>	<u>Mutant</u>	<u>Souche parentale</u>	<u>Mutant</u>
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12309	AJ 12523
(17) Formation d'acide à partir d'un sucre :				
1 L-arabinose	négative	idem	idem	idem
2 D-xylose	négative	idem	idem	idem
3 D-glucose	positive	idem	idem	idem
4 D-mannose	positive	idem	idem	idem
5 D-fructose	positive	idem	idem	idem
6 D-galactose	négative	idem	idem	idem
7 maltose	positive	idem	idem	idem
8 saccharose	positive	idem	idem	idem
9 lactose	négative	idem	idem	idem
10 tréhalose	négative	idem	idem	idem
11 D-sorbitol	négative	idem	idem	idem
12 D-mannitol	négative	idem	idem	idem
13 inositol	négative	idem	idem	idem
14 glycérine	négative	idem	idem	idem
15 amidon	négative	idem	idem	idem

T A B L E A U 1-6

	<u>Souche parentale</u>		<u>Mutant</u>		<u>Souche parentale</u>		<u>Mutant</u>	
	AJ 12308	AJ 12521	AJ 12522	AJ 12309	AJ 12523	AJ 12524		
Autres caractéristiques :								
(1) Résistance à la température	par méthode capillaire dans le lait écrémé : vivante à 60°C, 10 min morte à 65°C, 10 min	idem idem	idem idem	par méthode capillaire dans le lait écrémé : vivante à 60°C, 10 min morte à 65°C, 10 min	idem idem	idem idem	idem idem	
(2) Résistance au chlorure de sodium	croît dans un milieu contenant 5 % de solution salée	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(3) Auxotrophie pour la substance nutritive	exige de la biotine pour croître	idem	idem	idem	idem	idem	idem	10
(4) Composition des nucléotides de l'ADN (méthode Tm)*	60,2 % G+C	idem	idem	59,5 % G+C	idem	idem	idem	
(5) Acide aminé dibasique contenu dans la paroi cellulaire	acide mésodiaminopimélique	idem	idem	idem	idem	idem	idem	
(6) Source	fruits	-	-	légumes	-	-	-	

* Méthode pour déterminer la teneur de l'ADN en G+C (guanine plus cytosine), dans laquelle on mesure la température de fusion de la double chaîne d'ADN.

Les milieux utilisés pour produire et accumuler la L-lysine au moyen du mutant producteur de L-lysine, c'est-à-dire les milieux utilisés dans la présente invention, peuvent être des milieux connus de manière classique pour produire la L-lysine. On peut utiliser des milieux classiques contenant des sources de carbone, des sources d'azote, des sels inorganiques et, si nécessaire, d'autres éléments nutritifs à l'état de traces qui sont nécessaires pour le micro-organisme. On peut utiliser des sources de carbone quelconques dans la mesure où le mutant peut les utiliser. Les sources de carbone sont par exemple le glucose, le saccharose, le maltose, les hydrolysats d'amidon contenant ces sucres, des sucres tels que les mélasses, etc. ; les alcools tels que l'éthanol, le propanol, etc. ; des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide propionique, etc. De plus, on peut utiliser également des paraffines normales seules ou en combinaison avec d'autres sources de carbone, en fonction de la souche. Comme sources d'azote, on peut utiliser des sources d'azote inorganique ou organique, par exemple des sels d'ammonium tels que l'acétate d'ammonium, le chlorure d'ammonium, le phosphate d'ammonium, etc. ; des nitrates, l'urée, l'ammoniac et en outre des extraits de viande, etc. Comme sels inorganiques, on peut utiliser KH_2PO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 et analogues qui sont utilisés habituellement. Comme substances nutritives organiques à l'état de traces, on peut utiliser des vitamines, des acides gras ou des acides nucléiques, la peptone, l'acide casaminique, des extraits de levure ou des hydrolysats de protéines les contenant.

On effectue l'incubation de préférence dans des conditions aérobies. En réalisant une culture secouée ou une culture aérobie tournante (méthode de culture aérobie caractérisée en ce que l'on fait tourner la solution de culture dans un ballon muni d'une plaque formant chicane en mélangeant cette solution de culture) pendant 2 à 4 jours, tout en réglant le pH du milieu entre 5 et 9, de préférence entre 7 et 8,5, à la température de croissance des bactéries utilisées, à savoir à une température d'environ 25 à environ 50°C, de préférence d'environ 35 à environ 45°C, pour maintenir une forte productivité de L-lysine, il est possible de

produire et d'accumuler la L-lysine dans le milieu de culture en une quantité notable.

On applique différents procédés classiques pour recueillir la L-lysine à partir du milieu de culture. Par exemple, 05 il est possible de recueillir la L-lysine par un procédé classique faisant intervenir des résines échangeuses d'ions, par cristallisation, etc., en combinant ces techniques de manière appropriée.

Comme indiqué ci-dessus, la température qui règne lors de la production de L-lysine par fermentation selon la présente 10 invention est la température de croissance des bactéries utilisées, c'est-à-dire une température d'environ 25 à environ 50°C, de préférence de 35 à 45°C, à laquelle la productivité de la L-lysine augmente. Les exemples 2 et 3 ci-dessous démontrent qu'il est possible d'obtenir la formation et l'accumulation de L-lysine en 15 quantité notable en réglant la température de fermentation à 43°C à l'échelle du laboratoire.

On a calculé par des essais, sur la base des résultats expérimentaux, la charge de refroidissement nécessaire pour éliminer la chaleur dégagée lors d'une fermentation à l'échelle 20 commerciale. Dans le cas où l'on a réalisé une production de L-lysine par fermentation au moyen d'un réservoir de fermentation d'un volume de 200 kl par exemple, la charge de refroidissement nécessaire pour maintenir la température optimale de fermentation, par exemple 30°C, pour les bactéries productrices de L-lysine était de 125,5 x 10⁶ kJ (30 x 10⁶ kcal) par passe, tandis que, selon la 25 présente invention, la charge de refroidissement nécessaire pour maintenir la température de fermentation au plus égale à 43°C était de 12,55 x 10⁶ kJ (3 x 10⁶ kcal) par passe, lorsque l'on a utilisé le mutant producteur de L-lysine selon la présente invention. 30 Ainsi, selon la présente invention, la charge de refroidissement peut être réduite de 90 %.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux dans la description détaillée qui suit et se réfère aux exemples non limitatifs suivants.

Exemple 1 (Récolte du mutant)

La souche *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12308 ayant été traitée par la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (250 µg/ml, 30°C, 30 min) de manière classique, on a effectué une incubation à 43°C dans un milieu obtenu en ajoutant 1,5 g/dl de S-(2-amino-éthyl)-L-cystéine au milieu minimum présenté ci-dessous. On a récolté les colonies cultivées à 43°C dans ce milieu.

Composition du milieu minimum

	Glucose	2,0 g/dl
10	Urée	0,25 g/dl
	Sulfate d'ammonium	1,0 g/dl
	KH_2PO_4	0,1 g/dl
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/dl
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/dl
15	L-alanine	50 mg/dl
	Nicotinamide	0,5 mg/dl
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/dl
	Biotine	5,0 µg/dl
	Chlorhydrate de thiamine	10 µg/dl
20	NaCl	5 mg/dl
	pH 7,2	

Parmi les mutants ainsi obtenus, on a récolté AJ 12521 et AJ 12522 en tant que mutants ayant une excellente productivité de L-lysine.

On a récolté de même AJ 12523 et AJ 12524 en utilisant comme souche parentale *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12309.

On a fait croître au préalable les quatre mutants ainsi obtenus sur un milieu gélosé contenant du glucose à 43°C. On a inoculé des parties aliquotes d'une boucle de platine sur 20 ml de milieu stérile introduit dans un flacon secoué de 500 ml et présentant la composition suivante :

Composition du milieu

	Mélasse raffinée	10 g/dl
35	Sulfate d'ammonium	5 g/dl

	KH_2PO_4	0,1 g/dl
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 mg/dl
	Biotine	50 $\mu\text{g}/\text{dl}$
05	Carbonate de calcium (stérilisé et ajouté séparément)	5 g/dl
	pH 7,0	

On a cultivé ces mutants à 43°C pendant 72 h. La lysine s'est accumulée comme le montre le tableau 2.

10

TABLEAU 2

	Souche	Concentration de la L-lysine accumulée (g/dl)
	AJ 12521	3,2
15	AJ 12522	2,9
	AJ 12523	2,8
	AJ 12524	3,0

Exemple 2

20 Dans un flacon secoué de 500 ml, on a introduit séparément 20 ml d'un milieu aqueux ayant la composition suivante puis on a stérilisé à la vapeur à 110°C pendant 10 min.

<u>Composition du milieu</u>		
25	Glucose	10 g/dl
	Sulfate d'ammonium	4,5 g/dl
	KH_2PO_4	0,1 g/dl
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/dl
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/dl
30	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/dl
	Biotine	5,0 $\mu\text{g}/\text{dl}$
	Chlorhydrate de thiamine	20 $\mu\text{g}/\text{dl}$
	Concentré d'hydrolysate de protéines de soja par l'acide chlorhydrique (azote total : 7 %)	1,5 ml/dl
35	Carbonate de calcium (stérilisé et ajouté séparément)	5 g/dl
	pH 7,0	

On a inoculé sur le milieu ainsi préparé, introduit dans un ballon, une boucle de platine de *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12521 qui avait été cultivée au préalable sur un milieu de culture de gélose inclinée contenant de l'extrait de viande et du glucose, puis on a réalisé une culture secouée à 43°C pendant 72 h.

On a déterminé colorimétriquement par la réaction à la ninhydrine la quantité de L-lysine produite dans le milieu après 72 h de culture. Les résultats indiquent une production de L-lysine de 3,0 g/dl.

En outre, on a recueilli les solutions correspondant à 50 ballons cultivées de la même manière et dont l'incubation était complète, et on a retiré par centrifugation les cellules et le sel de calcium. On a fait passer environ 1 l du surnageant ainsi obtenu sur une résine échangeuse d'ions fortement acide ("AMBERLITE" IR-120 (type OH)) pour adsorber la L-lysine sur celle-ci. On a élué la L-lysine adsorbée avec de l'ammoniaque à 3 % et on a concentré l'éluat sous pression réduite. Après avoir ajouté de l'acide chlorhydrique au concentré, on a refroidi le mélange et la L-lysine a précipité sous forme de chlorhydrate de L-lysine dihydraté pour donner 26,5 g de cristaux.

Exemple 3

On a prélevé sur la culture inclinée une boucle de platine de *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12523 et une boucle de platine de la souche parentale AJ 12309 que l'on a inocuées sur 50 ml de milieu de culture d'ensemencement aqueux décrit ci-dessous. On a effectué une culture aérobie tournante à 43°C pendant 18 h pour préparer un milieu de culture d'ensemencement.

Composition du milieu de culture d'ensemencement :

	Glucose	1,5 g/dl
	Sulfate d'ammonium	0,3 g/dl
	Urée	0,1 g/dl
	KH_2PO_4	0,1 g/dl
35	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/dl
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 mg/dl

	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,0 mg/dl
	Biotine	5,0 µg/dl
	Chlorhydrate de thiamine	20 µg/dl
05	Concentré d'hydrolysate de protéines de soja par l'acide chlorhydrique (azote total : 7 %)	2,0 ml/dl
	pH 7,5	

10 D'autre part, on a introduit dans un fermenteur en verre de 1 l stérilisé de manière classique des parties aliquotes de 300 ml d'un milieu aqueux pour fermentation principale de composition donnée ci-dessous.

15 Sur celles-ci, on a inoculé à chaque fois 15 ml du milieu de culture d'ensemencement et on a amorcé une culture aérobie tournante à 43°C.

Composition du milieu de fermentation principale

	Glucose	2,0 g/dl
	Sulfate d'ammonium	0,5 g/dl
20	Urée	0,2 g/dl
	KH ₂ PO ₄	0,1 g/dl
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,04 g/dl
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 mg/dl
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1,0 mg/dl
25	Biotine	5,0 µg/l
	Chlorhydrate de thiamine	50 µg/l
	Nicotinamide	1,0 mg/l
	Concentré d'hydrolysate de protéines de soja par l'acide chlorhydrique (azote total : 7 %)	3,0 ml/dl
30	pH 7,2	

35 Pour maintenir le pH du milieu de culture entre 7,2 et 8,0, on lui a ajouté un mélange d'acide acétique et d'acétate d'ammonium (le rapport molaire acide acétique:acétate d'ammonium du mélange était de 1:0,25 et la concentration en acide acétique du

mélange était de 60 %). On a effectué une incubation à 43°C pendant 55 h.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

05

TABLEAU 3

	<u>Souche utilisée</u>	<u>Quantité de L-lysine accumulée (g/dl)</u>
	AJ 12523	3,2
10	AJ 12309 (parentale)	0,03

15

A partir de 300 ml de la solution obtenue après achèvement de la fermentation de AJ 12323, on a obtenu 1,0 g de chlorhydrate de L-lysine dihydraté sous forme de cristaux d'une manière analogue à l'exemple 2.

Exemple 4

20

Dans un flacon secoué de 500 ml, on a introduit 20 ml du même milieu que celui utilisé dans l'exemple 2, puis on a stérilisé à 110°C pendant 10 min à la vapeur. On a inoculé sur le milieu une boucle de platine de *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12524 qui avait été cultivée auparavant sur un milieu de gélose inclinée contenant de l'extrait de viande et du glucose, puis on a effectué

25

une culture secouée à 43°C pendant 50 h.

Après avoir introduit 0,2 ml de milieu de culture dans un fermenteur en verre, on a ajouté 5 ml de sérum physiologique refroidi. Après avoir agité, on a centrifugé le mélange à 4 500 tr/min pendant 10 min et on a rejeté le surnageant.

30

On a ajouté un mélange de 1,5 ml de tampon phosphate 0,2 M (pH 7,5) et de 1,5 ml de la solution de réaction décrite ci-dessous et on a agité le mélange. On a mis en suspension les cellules puis on a effectué une réaction secouée (120 tr/min) à 43°C pendant 2 h.

Solution de réaction :

	Glucose	1 g/dl
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,4 g/dl
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04 g/dl
05	Biotine	500 $\mu\text{g/dl}$
	Chlorhydrate de thiamine	20 $\mu\text{g/dl}$
	pH 7,5	

10 On a ensuite centrifugé (4 500 tr/min, 10 min) et on a analysé par chromatographie liquide la concentration de L-lysine dans le surnageant. Les résultats montrent qu'il s'est accumulé 0,2 g/dl de L-lysine.

15 On obtient donc, selon la présente invention, un procédé de production de L-lysine à l'échelle industrielle selon lequel la charge de refroidissement nécessaire pour éliminer la chaleur dégagée lors de la fermentation est réduite, ce procédé ne nécessitant aucun acide aminé et répondant aux conditions pratiques.

REVENDICATIONS

05 1. Procédé de production de L-lysine par fermentation, caractérisé en ce qu'il comprend la culture dans un milieu d'un mutant producteur de L-lysine appartenant au genre *Corynebacterium* capable de croître même à 40°C ou à une température supérieure et présentant une résistance à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine pour produire et accumuler de la L-lysine dans le milieu de culture, et la récupération de la L-lysine à partir du milieu de culture.

10 2. Mutant producteur de L-lysine appartenant au genre *Corynebacterium*, caractérisé en ce qu'il est capable de croître même à 40°C ou à une température supérieure et présente une résistance à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine, choisi parmi les souches suivantes :

15 *Corynebacterium thermoaminogenes* AJ 12521, FERM BP-3304
Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12522, FERM BP-3305
Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12523, FERM BP-3306
Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12524, FERM BP-3307.