

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

②

N° 81 18806

⑤

Procédé pour la production d'acides-amino par fermentation aérobie.

⑤

Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 P 39/00, 13/04.

②

Date de dépôt..... 6 octobre 1981.

③③ ③② ③①

Priorité revendiquée : Japon, 7 octobre 1980, n° 140818/1980; 9 avril 1981, n° 54127/1981;
21 avril 1981, n° 60098/1981 et 16 juin 1981, n° 93130/1981.

④

Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 14 du 9-4-1982.

⑦

Déposant : KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY COMPANY, LTD, société de droit japonais,
résidant au Japon.

⑦

Invention de : Kan Hirakawa, Ryoji Takakuma, Koji Nomura, Masami Katoh et Kiyoshi Wata-
nabe.

⑦

Titulaire : *Idem* ⑦

⑦

Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

La présente invention concerne un procédé de production par fermentation d'acides-amino. Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé dans lequel un microorganisme produisant un acide-amino et capable d'assimiler l'acide lactique est cultivé en aérobie en présence d'au moins un microorganisme de l'acide lactique dans un milieu nutritif aqueux contenant au moins un hydrate de carbone assimilable par le microorganisme de l'acide lactique mais non assimilable ou peu assimilable par le microorganisme produisant l'acide-amino; on récupère un acide-amino accumulé du bouillon de culture.

Un autre objet de la présente invention est de fournir un procédé avantageux du point de vue industriel pour la production d'acides-amino importants pour la nutrition humaine et animale en utilisant des sources de carbone peu chères ou les substances organiques dans les déchets de l'agriculture ou de l'élevage qui jusqu'à présent n'ont pas été effectivement utilisés.

Un autre objet de la présente invention est de réduire la pollution de l'environnement due aux déchets de l'agriculture et de l'élevage.

Le caractère limité des ressources naturelles a été récemment reconnu et leur utilisation effective est devenue un sujet courant, mais cette utilisation effective des ressources est encore dans son enfance. Par exemple, il ressort d'une étude de la FAO que sur 74 millions de tonnes de petit lait produit dans le monde en 1973, seule la moitié de cette quantité a été utilisée principalement comme aliment dans l'élevage et le reste jeté. Ceci signifie que plus de 2 millions de tonnes de lactose et plus de 300 mille tonnes de protéines précieuses ont été gaspillées dans l'année à cause du petit lait rejeté des fabriques de fromages ou de caséine qui contient environ 5% de lactose et environ 1% de protéines. Cette situation non seulement provoque la perte de ressources naturelles mais encore crée un sérieux problème de conduite du point de vue de la pollution; ainsi, on a eu un besoin fortement ressenti de meilleurs procédés pour l'utilisation du petit lait. Les efforts continus de l'industrie laitière sur la dernière décade n'ont malheureusement pas apporté de réponse satisfaisante à ce problème. Une des voies d'approche très explorée a été l'utilisation de la fermentation du petit lait. Par exemple, la conversion des parties solides du petit lait en une masse de cellules de levure comestible a été tentée en utilisant une souche de levure capable d'assimiler le lactose (Brevet U.S. 3 818 109). Cependant, l'utilisation extensive du petit lait comme produit de départ pour la fermentation n'a pas été couronnée de succès.

Ceci est certainement attribuable à la présence limitée des microorganismes capables d'assimiler le lactose contenu dans le petit lait.

L'aptitude à assimiler les sources de carbone telles que les hydrates de carbone est une caractéristique importante pour la taxinomie ou l'i-

dentification des microorganismes. Il est très difficile ou impossible d'accorder la faculté d'assimilation aux microorganismes ou d'accroître la faculté d'assimilation des microorganismes par les techniques de mutation artificielles classiques.

5 Par conséquent, dans le procédé par fermentation connu pour la production d'acides-amino, où une souche unique d'un microorganisme est utilisée (méthode de mono-culture), les produits de départ utilisables sont limités à ceux qui peuvent être effectivement assimilés ou métabolisés par la souche adoptée et la productivité est régie par ces propriétés génétiques fondamentales
10 possédées par la souche qui peut difficilement être améliorée par mutation artificielle. Par ailleurs, les techniques d'engineering génétique sont récemment devenues prometteuses en tant que technique pour la création de souches mutantes des microorganismes; néanmoins, l'adaptation de la technique à une échelle industrielle nécessite encore la résolution de nombreux problèmes tels que la
15 confirmation de la stabilité et la sûreté des souches recombinées.

Selon le procédé de la présente invention, les acides-amino peuvent être produits par fermentation, en utilisant des sources de carbone non assimilables ou faiblement assimilables par les microorganismes produisant
1 l'acide-amino, en cultivant les microorganismes produisant l'acide-amino en présence des microorganismes de l'acide lactique utilisés depuis fort longtemps
20 dans la production de nourriture et de boisson; ainsi, la présente invention permet l'utilisation extensive des produits de départ selon l'aptitude d'assimilation des microorganismes de l'acide lactique employés. En d'autres termes, la présente invention a atteint pratiquement le même objectif que celui qui pourrait être atteint par l'engineering génétique, à savoir que la présente invention a rendu possible de pratiquement conférer les propriétés génétiques des
25 microorganismes de l'acide lactique aux microorganismes produisant de l'acide-amino par une technique simple et sûre.

On possède quelques documents sur une méthode de culture mixte;
30 David E.F. Harrison considère l'étendue et les possibilités d'application de la culture mixte à la fermentation industrielle (Adv. Appl. Microbiol., Vol. 24, p 129 (1978)). Sur la production des acides-amino par les populations mixtes de microorganismes, M. Suzuki et S. Yamatodani rapportent que l'acide L-glutamique est produit en grande quantité par la culture mixte d'*Escherichia coli*
35 (E) et d'une souche de *Corynebacterium* (A); ils montrent comme mécanisme, que l' κ -cétoglutarate est accumulé par la souche E et qu'à son tour l' κ -cétoglutarate est aminé par la souche A pour produire le L-glutamate. Dans ce procédé, la souche E doit être capable de produire l' κ -cétoglutarate, un précurseur de l'acide glutamique, ceci différant substantiellement de la présente invention (M.

Suzuki et S. Yamatodani; Annual Meet. Agr. Chem. Soc. Jpn., Abst., p.164 (1967). On connaît également un procédé pour produire la L-lysine dans lequel on cultive en mélange, un microorganisme assimilant les hydrocarbures appartenant au genre *Arthrobacter* ou *Brevibacterium* et un microorganisme produisant la L-lysine appartenant au genre *Corynebacterium*, dans un milieu nutritif contenant un hydrocarbure comme principale source de carbone (Brevet E.A. 3 655 510). On connaît également une méthode dans laquelle on obtient des protéines de cellule unique , en cultivant en mélange une levure appartenant au genre *Saccharomyces* ou *Candida* et un microorganisme produisant l'acide lactique appartenant au genre *Lactobacillus* (Brev. U.S. 3 818 109, All. Offen. 2 403 306, All. Offen. 2 500 323).

Ainsi, malgré les tentatives faites pour produire une variété de produits de fermentation par culture mixte, une production industriellement avantageuse d'acides-amino par une culture mixte d'un microorganisme d'acide lactique et d'un microorganisme produisant un acide-amino reste inconnue.

Par ailleurs, on sait déjà qu'un acide-amino est accumulé dans un milieu nutritif par la culture aérobie d'un microorganisme produisant un acide-amino dans un milieu nutritif contenant l'acide lactique comme principale source de carbone. (par exemple, V. N. Shaposhnikov et V. S. Isaeva, *Mikrobiologia* Vol 36, p 31 (1967), K. Seto et T. Harada, *T. Ferment. Technol.*, Vol 47, p 558 (1969)). Cependant, on a rarement utilisé l'acide lactique comme produit de départ pour la production industrielle d'acides-amino car l'extraction et la purification de l'acide lactique à partir d'un bouillon de culture de fermentation d'acide lactique sont difficiles et un acide lactique obtenu par synthèse est coûteux. On conçoit une fermentation à deux étapes dans laquelle la fermentation de l'acide lactique et la fermentation de l'acide-amino sont combinées en série, mais cette méthode nécessite une substance alcaline, telle que le carbonate de calcium ou l'ammoniaque, comme réactif de neutralisation, et elle prend du temps car le taux de production de l'acide lactique diminue du fait de l'inhibition de la fermentation due au produit, l'acide lactique, accumulé en des concentrations élevées. En outre, la deuxième étape de cette méthode nécessite l'addition d'une substance de caractère acide pour la régulation d'une augmentation à un pH correspondant à la consommation de l'acide lactique.

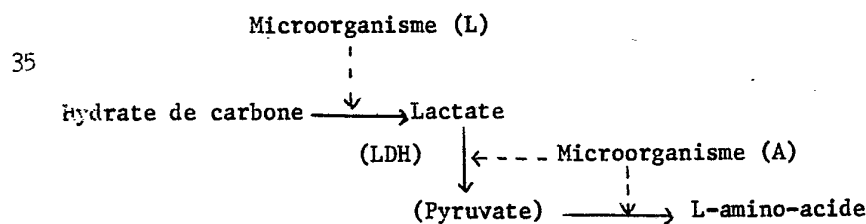
Cependant, dans le procédé de la présente invention, on suppose que l'acide lactique produit par les microorganismes d'acide lactique est aussitôt utilisé par les microorganismes produisant l'acide-amino; il en résulte que l'hydrate de carbone de départ peut être transformé en acides-amino en une opération en une étape; ainsi, on peut réaliser une production par fermentation

efficace des amino-acides, et en même temps, on peut diminuer la quantité de réactif de neutralisation et faciliter l'extraction et la purification des amino-acides du bouillon de culture résultant.

La présente invention consiste en un procédé pour produire un amino-acide qui comprend, la culture aérobie d'un microorganisme produisant un amino-acide qui est capable d'assimiler l'acide lactique en présence d'au moins un microorganisme d'acide lactique dans un milieu nutritif aqueux contenant, comme source principale de carbone, au moins un hydrate de carbone qui est assimilable par le microorganisme d'acide lactique mais non assimilable ou peu assimilable par le microorganisme produisant l'acide lactique, l'accumulation d'un amino-acide dans le bouillon de culture résultant, et la récupération de l'acide lactique du bouillon de culture.

Des amino-acides produits par le procédé de la présente invention sont, par exemple, les suivants: L-lysine, L-valine, L-thréonine, acide L-glutamique, L-isoleucine, L-leucine, DL-alanine, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-arginine, L-histidine, L-sérine, L-glycine, et acide L-aspartique.

Bien qu'on n'ait pas encore clarifié le mécanisme du procédé de la présente invention, on conçoit un mécanisme où des métabolites contenant l'acide lactique comme ingrédient principal sont produits à partir d'un hydrate de carbone grâce à un microorganisme d'acide lactique puis assimilés par un microorganisme produisant l'acide lactique pour être transformés en un amino-acide. En d'autres termes, on conçoit un système dans lequel le premier microorganisme - un microorganisme d'acide lactique (L) - a pour mission la glycolyse d'un hydrate de carbone et le second microorganisme - un microorganisme produisant l'acide lactique (A) - a pour mission la production d'acide lactique à partir de ces métabolites, contenant l'acide lactique comme ingrédient principal, et qui sont produits par le premier microorganisme. Puisqu'il y a sans aucun doute oxydation de l'acide lactique au cours du passage principal dans lequel est impliqué la lactate deshydrogénase (LDH), des amino-acides sont certainement produits par cet enzyme via l'acide pyruvique qui est situé au centre d'un passage métabolique des microorganismes généraux comme indiqué ci-dessous.



Mécanisme hypothétique pour la production de L-amino-acide
à partir d'un hydrate de carbone dans la présente invention

Une caractéristique distinctive de la présente invention provient
du fait que la simple combinaison des deux systèmes de microorganismes non seu-
5 lement utilise convenablement des caractéristiques des deux microorganismes mais
également produit vraisemblablement un synergisme inconnu; c'est pourquoi, on
peut attendre des effets avantageux du point de vue industriel qui n'existent pas
avec une mono-culture.

Les avantages de la présente invention seront expliqués ci-après.

10 D'abord, des substances inorganiques qui étaient inutilisables
comme produit de départ pour la fermentation à cause de leur non assimilabilité
ou leur faible assimilabilité par des microorganismes produisant l'amino-acide,
sont devenues utilisables comme produit de départ pour la fermentation d'amino-
acide. Par exemple, on peut utiliser le petit lait du fromage ou de la caséine
15 évacué des usines comme produit de départ convenable dans le procédé de la pré-
sente invention. Il va sans dire qu'il est très avantageux du point de vue in-
dustriel qu'on puisse utiliser des produits de départ non onéreux comme produits
de départ disponibles.

Deuxièmement, la présente invention contribue à réduire la pollu-
20 tion de l'environnement car les substances organiques contenues dans le petit
lait, les déchets liquides ou les rejets des usines d'amidon sont transformées
en amino-acides et cellules microbiennes par leur utilisation comme produit de
départ pour la fermentation; il en résulte que les composants de DBO qui sont
à l'origine de la pollution, sont fortement réduits au cours des procédés pour
25 récupérer des amino-acides.

Troisièmement, la productivité de fermentation est éminemment
améliorée si on la compare avec les méthodes de mono-culture. Quand on emploie
un microorganisme produisant de l'amino-acide qui possède une grande capacité
d'assimiler l'acide lactique, le taux de consommation d'un hydrate de carbone
30 comme substrat, taux qui est souvent proportionnel au taux de formation du pro-
duit, dépend de l'activité d'un microorganisme d'acide lactique, c'est à dire
du taux de fermentation de l'acide lactique. Dans un système de culture mixte
selon la présente invention, l'acide lactique produit et accumulé par les mi-
d'acide lactique
croorganismes est rapidement utilisé par des microorganismes produisant l'ami-
35 no-acide, avec pour résultat qu'il se produit vraisemblablement le même effet
que pour la fermentation de dialyse, où on accélère la fermentation par élimi-
nation des produits à travers une membrane; en conséquence, l'activité élevée
des microorganismes d'acide lactique est maintenue. On présume qu'il est éga-
lement possible que le taux élevé de la fermentation d'acide lactique soit main-

tenu par un effet de synergie inconnu tel qu'un effet d'accélération du à la décomposition du peroxyde d'hydrogène, qui est de nature à provoquer l'inhibition du métabolisme, par catalase qui manque dans les microorganismes d'acide lactique mais est fournie par les microorganismes produisant l'acide.

5 Quand on utilise des microorganismes d'acide lactique d'homofémentation, qui produisent seulement l'acide lactique à partir des hydrates de carbone, cela contribue probablement à la productivité élevée et le taux de conversion de l'hydrate de carbone en acide lactique atteint 90~100% ce qui conduit à une perte réduite de la source de carbone.

10 La demanderesse a observé que la fermentation d'acide lactique, bien que s'effectuant généralement dans des conditions anaérobies, peut effectivement se dérouler dans le procédé selon la présente invention, même dans des conditions aérobies généralement requises pour la fermentation de l'acide; cette découverte soutient les spéculations précédentes.

15 Quatrièmement, l'avantage de la présente invention réside dans la résistance à la contamination par les microorganismes étrangers. La revue de David E.F. Harrison, mentionnée ci-dessus, cite la résistance à la contamination par des microorganismes étrangers comme un avantage de la culture mixte. Dans le procédé de la présente invention qui emploie des microorganismes de l'acide
20 lactique, outre le mécanisme expliqué par l'auteur, il y a certainement des substances antimicrobiennes (par exemple, nisin par *Streptococcus lactis* et diplococcin par *Streptococcus cremoris*, etc.) qui sont impliquées dans des effets de réduction de la contamination par des microorganismes étrangers. La prévention de la contamination par des microorganismes étrangers est l'un des
25 problèmes les plus importants posé par la fermentation industrielle.

Les microorganismes produisant l'acide, qui ont la faculté d'assimiler l'acide lactique, utilisés dans la présente invention sont un des membres appartenant à un des genres choisis dans le groupe comprenant *Alkaligenus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*,
30 *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Proteus*, *Serratia*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Sporoboromyces* et *Schizosaccharomyces*.

La faculté des microorganismes produisant l'acide à assimiler l'acide lactique peut être vérifiée et comparée en cultivant en aérobie un microorganisme de test dans un milieu minimum contenant l'acide lactique (L- ou DL-lactate) comme source de carbone unique et en observant la croissance du
35 microorganisme. Il est également possible d'isoler des souches possédant une excellente faculté d'assimiler l'acide lactique de la nature par une culture d'enrichissement utilisant un milieu minimum contenant l'acide lactique (0,5~2%).

Des exemples représentatifs des souches utilisées dans le procédé de la présente invention comme microorganismes produisant l'acide lactique sont les suivants:

5	<i>Alkaligenes faecalis</i>	IFO-3160
	<i>Alkaligenes marshallii</i>	ATCC-21030
	<i>Acinetobacter</i> sp-38-15	FERM-P-2187
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	IFO-12552
10	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	ATCC-15591
	<i>Arthrobacter citreus</i>	ATCC-17775
	<i>Arthrobacter</i> sp-18	FERM-P-1481
	<i>Bacillus circulans</i>	IFO-3329
15	<i>Bacillus megatherium</i>	IFO-3970
	<i>Bacillus subtilis</i>	IAM-1071
	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	ATCC-19350
20	<i>Brevibacterium acetylicum</i>	IAM-1790
	<i>Brevibacterium thiogenitalis</i>	IFO-12400
	<i>Brevibacterium flavum</i>	ATCC-13826
	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	ATCC-13869
25	<i>Corynebacterium hydrocarbonclastum</i>	ATCC-15960
	<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i>	ATCC-13870
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC-13032
	<i>Flavobacterium lutescens</i>	IFO-3085
30	<i>Micrococcus luteus</i>	IFO-3333
	<i>Micrococcus roseus</i>	IFO-3764
	<i>Microbacterium ammoniafilum</i>	ATCC-15354
	<i>Nocardia alkanoglutinosa</i>	ATCC-31220
35	<i>Nocardia erythropolis</i>	IAM-12122
	<i>Nocardia lyena</i>	ATCC-21338
	<i>Proteus morgani</i>	IFO-3848

	Serratia marcescens	IFO-3054
	Serratia plymuthium	IFO-3055
	Saccharomyces oviformis	IAM-4325
5	Saccharomyces cerevisiae	IFO-0971
	Candida humicola	IFO-1577
	Candida lyopolitica	IFO-0746
	Sporoboromyces roseus	IFO-1037
10	Schizosaccharomyces pombé	IFO-6170

(Note)

IAM: Institut de microbiologie appliquée, Univ. de Tokyo,
1-chome, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japon

15 IFO: Institut pour la fermentation, Osaka, Juso, Nishinomachi,
Higashiyodogawa-ku, Osaka, Japon

FERM-P: Institut de recherche de fermentation, Agence de technologie et de
Science Industrielle, Ministère de l'industrie et du commerce,
Chiba-city, Japon

20 Ces souches possèdent la faculté d'assimiler l'acide lactique,
mais l'intensité de l'assimilabilité varie suivant les différentes souches.
Il est également possible d'induire ou d'accroître l'assimilabilité par la cul-
ture aérobie d'un microorganisme produisant l'acide lactique dans un milieu conte-
nant 0,2 ~ 4% en poids/volume d'acide lactique (lactate de calcium ou de sodium).
25 On sait que, parmi les lactate déshydrogénases qui régissent certainement l'éta-
pe de limitation de taux de l'utilisation de lactate, la L(+)-lactate déshydro-
génase peut être induite par culture aérobie d'un microorganisme en présence
d'un lactate (Ellen I. Carvie; Microbiological Review, Vol.44(1), p 106-139
(1980)). La mutation artificielle peut également accroître l'assimilabilité de
30 l'acide lactique.

Parmi les microorganismes énumérés ci-dessus à titre d'exemples,
on peut obtenir des souches possédant une productivité élevée en acide
par les traitements de mutation classiques tels que ceux utilisant des agents
mutagènes chimiques, par exemple, la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG),
35 ou une radiation, par exemple, les rayons ultra-violets ou les rayons X, suivis
par l'isolation des souches mutantes selon des procédés connus (K. Nakayama et
coll., J. Gen. Appl. Microbiol., Vol. 7, p41 (1961); Koichi Yamada, Biotechnol.
and Bioeng., Vol. 19, p 1563 (1977)).

Des souches produisant la L-lysine sont, par exemple, les suivantes:

auxotrophes exigeant l'homosérine (ou la thréonine plus la méthionine (Brev. U.S. 2 979 439, Brev. Brit. 1 200 587): auxotrophes exigeant n'importe lequel des amino-acides suivants: thréonine, isoleucine, valine, méthionine, leucine, alanine, arginine, histidine, phénylalanine, cystine, cystéine (Brev. Français 1 486 235, Brev. Français 1 58 154, Brev. U.S. 3 527 672, Brev. Brit. 1 184 530, Brev. Brit. 1 118 719); mutants dérivés d'un auxotrophe nécessitant l'homosérine (Brev. U.S. 3 524 797, Brev. Brit. 1 186 988, Brev. Belge 753 394); mutants résistants aux analogues de la L-lysine tels que S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine (S-AEC) (Brev. U.S. 3 707 441; K. Sano et I. Shio: J. Gen. Appl. Microbiol., Vol. 16, p 373 (1970); E. Takenouchi et coll., Agr. Biol. Chem., Vol 41,615 (1977); Brev. U.S. 4 123 329); mutants sensibles à la thréonine ou à la méthionine (Brev. Français 1 200 353; I. Shio et R. Miyajima, J. Gen. Appl. Microbiol., Vol. 15, 267 (1969))

Des souches produisant la L-valine sont, par exemple, les suivantes:

auxotrophes nécessitant (1) isoleucine, (2) leucine, (3) thréonine, (4) homosérine, ou thréonine plus méthionine, ou (5) arginine (R. Ishii et coll. , J. Gen. Appl. Microbiol., Vol 13, p 217 (1967); Brev. U.S. 3 700 556); mutants résistants à l' α -amino- butyrate ou à la 2-thiazolealanine(M. Kisumi, J. Bacteriol. Vol. 106, p493 (1971); Brev. Jap. deux. publication N° 44877/1973 et N° 68794/1973)

Des souches produisant la L-thréonine sont, par exemple, les suivantes:

auxotrophes nécessitant un ou plusieurs des amino-acides suivants: méthionine, isoleucine, lysine, acide diaminopimélique (Brev. français 1 489 910; Brev. Brit. 1190 687; Brev. Français 1 591 232; Brev. Ouest All. 1 817 666); mutants résistants aux analogues de la L-thréonine tels que l'acide α -amino- β -hydroxyvalérique (AHV) (Brev. U.S. 3 582 471)

Des souches produisant l'acide L-glutamique sont, outre celles énumérées ci-dessus comme exemples, les suivantes:

mutants nécessitant le glycérol (Y. Nakano et coll., Agr. Biol. Chem., Vol 34, 1875 (1970); mutants nécessitant l'acide oléique(Okazaki et coll., Agr. biol. chem.,Vol. 31, p 1314 (1967))

Des souches produisant la L-isoleucine sont, par exemple, les suivantes:

mutants résistants aux analogues de L-isoleucine, α -AHV, acide α -aminobutyrique ou hydroxamate d'isoleucine

Des souches produisant la L-leucine sont, par exemple, les suivantes:

auxotrophes nécessitant la L-isoleucine ou l' α -aminobutyrate (R. Ishii et coll., J.Gen. Appl. Microbiol., Vol 13,p217 (1967); F. Yoshinaga et coll. 5 ibid., Vol.13,p25 (1967); mutants résistant à la 2-thiazolealanine (T. Tsuchida et coll., Agr. Biol. Chem., Vol 38, 1907 (1974) ou analogues de la leucine (R.A. Calvo et J.M. Calvo, Science, Vol 156, 1107 (1967))

Des souches produisant la L-tyrosine sont, par exemple, les suivantes:

10 auxotrophes nécessitant la L-phénylalanine (K. Nakayama et coll. J. Agr. Chem. Soc. Jpn., Vol 35, p142 (1961)); mutants résistant à 5-méthyl-tryptophane (I. Shiio et coll., Agr. Biol. Chem., Vol 36,p2315 (1973))

Des souches produisant le L-tryptophane sont, par exemple, les suivantes:

15 mutants résistant au 5-méthyltryptophane (Brev. Jap. second. publications 18 828/1973 et 39517/1978); auxotrophes nécessitant la L-tyrosine et la L-phénylalanine (H. Hagino et coll., Agr. Biol. Chem., VOL.39,p343 (1975))

L'addition d'acide anthranilique ou d'indole, un précurseur de la biosynthèse du L-tryptophane, au milieu de fermentation au cours de la culture 20 est efficace pour améliorer le rendement en ce qui concerne la production de L-tryptophane.

Des souches produisant la L-phénylalanine sont, par exemple, les suivantes:

25 auxotrophes nécessitant la L-tyrosine (Brev. U.S. 3 759 790); mutants résistant à la p-fluorophénylalanine (S. Sugimoto et coll., Agr. Biol. Chem., Vol 37, p 2327)1973))

Des souches produisant la L-arginine sont, par exemple, les suivantes:

30 mutants résistant à l'hydroxamate d'arginine ou à la 2-thiazolealanine (M. Kizumi et coll., Appl. Microbiol., Vol 22, p 987 (1971); K. Nakayama et H. Yoshida, Agr. Biol. Chem., Vol. 36 , p1675)1972); K. Kubota et coll. J. Gen. Appl. Microbiol., Vol 19, p339 (1973))

35 Les microorganismes de l'acide lactique utilisés dans le procédé de la présente invention comprennent des bactéries qui sont souvent appelées collectivement "bactéries de l'acide lactique" et des microorganismes appartenant au genre Rhizopus qui sont une sorte de champignons; ils appartiennent, par exemple au genre Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Tetracoccus, Bacillus, et Rhizopus.

Des exemples représentatifs des microorganismes de l'acide lactique

sont les suivants:

	Lactobacillus bulgaricus	IFO-3533
	Lactobacillus casei	IFO-12004
5	Lactobacillus acidophilus	IFO-3532
	Lactobacillus japonicus	IAM-10068
	Lactobacillus thermophilus	IFO-3863
	Lactobacillus plantarum	IFO-12006
10	Lactobacillus delbrueckii	IFO-3534
	Lactobacillus pentosus	IFO-4758
	Streptococcus cremoris	IFO-3427
	Streptococcus thermophilus	IFO-3535
15	Streptococcus lactis	IFO-12007
	Leuconostoc dextranicum	IFO-3347
	Pediococcus acidilactici	IFO-3884
20	Pediococcus pentosaceus	IFO-3891
	Pediococcus soyae	IFO-12172
	Tetracoccus soyae	ATCC-21787
	Bacillus coagulans	IFO-3887
25	Bacillus laevolactici	ATCC-23492
	Rhizopus oryzae	IFO-4706

30 Dans le procédé de la présente invention, on peut employer les microorganismes de l'acide lactique seul ou en combinaison d'au moins deux. Par exemple, on sait qu'il existe une symbiose entre Lactobacillus bulgaricus et Streptococcus thermophilus, et donc la combinaison est également efficace dans le procédé de la présente invention. On classifie les microorganismes de l'acide lactique en deux groupes, à savoir, les microorganismes d'homofémentation 35 qui produisent seulement de l'acide lactique à partir des hydrates de carbone et les microorganismes d'hétérofémentation qui produisent du dioxyde de carbone, un acétate, et/ou de l'éthanol à partir des hydrates de carbone; dans le procédé de la présente invention, on préfère les microorganismes d'homofémentation.

tion. Quand on utilise des microorganismes d'hétérofermentation dans la présente invention, il est probable qu'un acétate et l'éthanol qui sont produits, sont également utilisés par des microorganismes produisant l'acide lactique en plus de l'acide lactique produit; cependant, dans ce cas, le dioxyde de carbone, qui est un des métabolites, représente une perte en source de carbone.

On peut également employer dans le procédé de la présente invention, ces souches résistant aux antibiotiques ou des analogues d'acide lactique qui sont obtenus en soumettant les microorganismes d'acide lactique précédents à des traitements mutagènes. Par exemple, dans la production de L-lysine selon le procédé de la présente invention, on peut employer ces souches résistant à S-AEC, un analogue de L-lysine, qui est obtenu par traitement mutagène des microorganismes d'acide lactique employés pour la production de L-lysine. Comme microorganismes d'acide lactique employés pour la production de L-thréonine, on peut utiliser des souches (souches résistantes) capable de croître en présence de S-AEC et de L-thréonine ou des souches résistant à κ -AHV, un analogue de L-thréonine. La production effective d'acide L-glutamique est rendue possible par l'emploi des microorganismes d'acide lactique résistant aux antibiotiques, tels que les pénicillines, ou aux drogues qui sont ajoutées au milieu de culture. Un homme de l'art peut facilement produire ces souches résistant aux drogues.

Quand on emploie un microorganisme d'acide lactique tel qu'il produit une substance antimicrobienne, comme *Sreptococcus lactis* et *Sreptococcus cremoris*, on emploie de préférence en combinaison un microorganisme produisant l'acide lactique et un microorganisme produisant l'acide lactique résistant à la substance antimicrobienne. Pour obtenir la souche mutante résistante produisant l'acide lactique, on soumet une souche produisant l'acide lactique aux traitements mutagènes classiques et on récupère une souche qui peut croître dans un milieu (liquide ou solide) contenant un bouillon de culture du microorganisme d'acide lactique produisant une substance antimicrobienne (on utilise le bouillon de culture du microorganisme d'acide lactique tel quel, car sa stérilisation par chauffage peut rendre inactive la substance antimicrobienne); cette méthode peut être avantageuse dans la mesure où la contamination par des microorganismes étrangers est prévenue.

Le procédé de la présente invention, procédé de production par fermentation d'acides, sera expliqué en détails par la suite.

On va d'abord décrire les procédures pour les cultures par ensemencement.

On inocule une ou plusieurs souches des microorganismes d'acide lactique dans un milieu nutritif pour la fermentation d'acide lactique contenant un sucre tel que glucose, fructose, sucrose, lactose, etc.; ou des méla-

sses, du petit lait, ou des hydrolysats d'amidon contenant ces sucres; avec une source d'azote organique tel que l'extrait de levure, la liqueur de macération de maïs (C.S.L.), et une peptone et on cultive à 25,5°C. Par exemple, on utilise comme milieu convenable un milieu nutritif contenant l'extrait de levure et/ou C.S.L. en addition au petit lait du fromage ou de la caséine. On effectue généralement une culture anaérobie telle qu'une culture stationnaire, mais on peut également adopter une culture aérobie. On utilise le bouillon de culture ainsi obtenu comme première culture d'ensemencement.

Il est également possible d'utiliser les cellules microbiennes obtenues par la fermentation d'acide lactique après leur immobilisation sur ou dans un matériau de support tel que des réactifs induisant le gel, par exemple, la carragénine, l'arginate de calcium, et la polyacrylamide. L'ensemble des cellules immobilisées peut être ré-utilisé après collecte par filtration à l'achèvement de la fermentation.

D'autre part, on prépare la culture d'ensemencement des souches produisant l'acide aminé comme seconde culture d'ensemencement, de la manière suivante:

Bien qu'on puisse aussi utiliser le milieu nutritif classique comme milieu de culture pour cultiver des microorganismes, la culture d'ensemencement obtenue par culture aérobie d'un microorganisme produisant l'acide aminé dans un milieu nutritif contenant 0,2-5% (P/V) d'acide lactique (L ou DL) ou de son sel, permet la production efficace d'acides aminés.

Comme milieu nutritif pour la préparation de la seconde culture d'ensemencement, on peut également utiliser de façon convenable un milieu nutritif préparé en ajustant un bouillon de culture, obtenu par fermentation (généralement anaérobie) des microorganismes d'acide lactique qui doivent être utilisés pour la fermentation d'acide aminé, pour atteindre une concentration d'acide lactique de 0,2-5% (de préférence 0,5-2%) P/V, et ensuite en complétant avec des sources de carbone telles que des hydrates de carbone et des alcools, des sels minéraux, des sources d'azote organique ou minéral et ainsi de suite. Le pH au cours de la culture est de 5,5-8,0.

On inocule les deux sortes de culture d'ensemencement ainsi obtenues dans un milieu de fermentation pour production d'acides aminés.

Le rapport entre les quantités des cultures d'ensemencement qui doivent être inoculées, bien qu'il ne soit pas particulièrement limité, se situe généralement de 10 (volume) pour les microorganismes produisant l'acide aminé à 0,1-10 (volume) pour les microorganismes d'acide lactique. Quand un microorganisme produisant l'acide aminé possède une relativement faible aptitude à assimiler l'acide lactique, la quantité du microorganisme d'acide lactique à

inoculer doit être faible afin d'équilibrer la production d'acide lactique et l'assimilation d'acide lactique entre elles, et ceci pour une progression efficace de la fermentation de l'acide lactique. Par exemple, lorsque la quantité du microorganisme d'acide lactique inoculée est trop importante, la fermentation de l'acide lactique se déroule si rapidement que la production d'acide lactique et le taux d'assimilation se déséquilibrent; il en résulte que la fermentation conduit à une production d'acide lactique et donc que la production d'acide lactique chute.

On inocule généralement les deux types de cultures d'ensemencement en même temps, mais il est aussi possible de différer l'inoculation de l'une des deux. Par exemple, on inocule un microorganisme d'acide lactique dans le milieu après avoir précultivé en aérobie, un microorganisme produisant l'acide lactique pendant une période donnée (par ex., 2 à 20 heures), dans un milieu nutritif contenant de petites quantités (par ex., 0,5 à 2,0 g/dl) de sources de carbone supplémentaires, assimilables par le microorganisme produisant l'acide lactique, en plus de la source de carbone principale. La faculté d'un microorganisme produisant l'acide lactique à assimiler l'acide lactique peut être induite pour une fermentation stable en effectuant la préculture dans un milieu nutritif contenant 0,2 à 1,0 g/dl d'acide lactique de même que la source de carbone supplémentaire. Des exemples de source de carbone supplémentaire sont des sucres tels que glucose et fructose, et des alcools tel que l'éthanol.

Il est également possible d'employer ensemble le microorganisme d'acide lactique et le microorganisme produisant l'acide lactique, en combinaison dans l'étape de la culture d'ensemencement. Pour citer un exemple, on inocule et on fait la culture aérobie des deux types de microorganismes dans un milieu nutritif aqueux contenant 2 à 5% P/V d'un hydrate de carbone, qui doit être utilisé comme principale source de carbone dans la production d'acide lactique. Les conditions de fermentation dans ce cas sont semblables à celles de la production d'acide lactique décrites ci-après. On inocule le bouillon de culture contenant les deux types de microorganismes ainsi obtenu, dans un milieu de culture pour la production d'acide lactique.

L'hydrate de carbone utilisé comme principale source de carbone dans le procédé de la présente invention est un de ceux qui est assimilable par le microorganisme d'acide lactique mais non assimilable ou peu assimilable par le microorganisme produisant l'acide lactique et comprend: glucose, fructose, sucrose, mélasses, hydrolysats d'amidon, hydrolysats de cellulose, hydrol, lactose, hydrolysats de lactose, jus de fruits, petit lait de caséine, petit lait du fromage, petit lait du soja, dextrine et amidon.

Les petits laits précédents comprennent le petit lait acide, le

petit lait doux, le petit lait déprotéinisé (perméat-UF) (on utilise une membrane d'ultrafiltration pour la déprotéinisation), et petit lait déminéralisé.

On peut utiliser deux ou plusieurs hydrates de carbone mentionnés ci-dessus en combinaison dans le procédé de la présente invention.

5 Il est nécessaire de sélectionner le type de microorganisme d'acide lactique en fonction du type d'hydrate de carbone choisi. Par exemple, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus cremoris*, et *Streptococcus thermophilus* conviennent pour le lactose ou les petits laits; *Lactobacillus delbrueckii* et *Streptococcus thermophilus* conviennent pour les mélasses; 10 *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus japonicus* et *Rhizopus oryzae* sont tous capables de produire de l'acide lactique à partir d'amidon ou de dextrine.

Quand on utilise l'amidon ou la dextrine comme source de carbone, on peut réaliser efficacement la production par fermentation des amino-acides en ajoutant une amylase au milieu nutritif aqueux et en utilisant de préférence 15 un microorganisme d'acide lactique possédant une activité d'amylase. On peut obtenir une amylase d'emploi convenable, par exemple, en dissolvant une amylase disponible dans le commerce dans de l'eau et ensuite en filtrant la solution à travers une membrane possédant une taille de pore inférieure à 0,5 μ 20 telle qu'un filtre Millipore.

Des sources d'azote dans le milieu nutritif comprennent l'ammoniac, le gaz ammoniac, l'urée et des sels d'ammonium organiques ou minéraux tels que le chlorure d'ammonium, le sulfate d'ammonium, le phosphate d'ammonium, l'acétate d'ammonium, et le lactate d'ammonium.

Des substances minérales dans le milieu nutritif comprennent des 25 sels de sodium, de potassium, de manganèse, de magnésium, de calcium, de cobalt, de nickel, de zinc, de cuivre, et de fer avec les acides chlorhydrique, sulfurique et phosphorique.

Au milieu nutritif aqueux on ajoute, outre les éléments nutritifs tels que des vitamines et des amino-acides requis pour la croissance des micro- 30 organismes produisant l'acide lactique, extraits de levure, peptone, hydrolysats de caséine, hydrolysats de protéine du soja, liqueur de macération de maïs (CSL), petit lait, ou hydrolysats du petit lait, qui contiennent des vitamines, des amino-acides, ou des substances se rapportant à l'acide nucléique, et ceci dans le but d'accélérer le développement de l'acide lactique.

35 Pour la production d'acide glutamique à partir des mélasses ou du petit lait, l'addition de produits chimiques tels que des pénicillines et des agents tensio-actifs au milieu nutritif aqueux, améliore le rendement du produit (Brev. U.S. 3 080 297; K. Takami et coll., Agr. Biol. Chem., Vol 27, p 858 -1968-). On ajoute les produits chimiques au cours d'une période de 4 à 24 heures

après le début de la culture. Dans ce cas, il est préférable d'employer comme microorganisme d'acide lactique, un de ceux qui sont résistants aux produits chimiques ajoutés. Les concentrations et les méthodes pour l'addition des éléments nutritifs et des produits chimiques sont semblables à celles de la culture habituelle simple des microorganismes produisant l'acide aminé; cependant, on doit déterminer leur quantité optimale dans des conditions de culture mixte puisque le métabolisme des microorganismes d'acide lactique peut avoir une influence sur eux.

On effectue la culture dans des conditions aérobies d'une culture avec secousse ou avec aération par agitation, etc.

Au cours de la culture, on ajuste de préférence le pH à 4,5 à 7,5, plus particulièrement 5,5 à 7,0. On peut utiliser comme réactif de neutralisation l'ammoniaque, le carbonate de calcium, l'urée et ainsi de suite. On effectue la culture à une température de 25°C à 55°C.

La différence entre le taux de production d'acide lactique et le taux de consommation d'acide lactique, est déterminée en concentration accumulée d'acide lactique; celle-ci doit être de préférence contrôlée afin de ne pas dépasser 1,5% (poids/vol), et encore mieux 1,0% (poids/vol); en d'autres termes, il est important de minimiser la quantité accumulée d'acide lactique. Quand on utilise un microorganisme produisant l'acide aminé possédant une grande aptitude à assimiler l'acide lactique, on constate que la concentration d'acide lactique se maintient à une valeur d'un ordre négligeable même sans contrôle spécial. On effectue le contrôle de la concentration d'acide lactique en réglant la température de la culture, le pH du milieu de culture, le taux d'apport d'oxygène au milieu de culture par mesure de la concentration d'acide lactique dans le milieu (par exemple, on utilise pour la mesure le lactate déshydrogénase). Par exemple, une élévation de la valeur du pH d'un domaine légèrement acide à une faible alcalinité diminue le taux de fermentation d'acide lactique et, en conséquence, la concentration en acide lactique; en outre, une augmentation en apport d'oxygène diminue la concentration en acide lactique.

A la fin de la culture, on chauffe le bouillon de culture résultant à une température de 75 à 100°C; le traitement à la chaleur coagule les protéines coagulant à la chaleur et facilite la séparation des cellules microbiennes. On élimine les cellules microbiennes et les protéines coagulant à la chaleur etc. par filtration ou centrifugation.

On détermine la présence d'acide aminé dans le bouillon par des méthodes de dosage microbiologique ou des méthodes colorimétriques basées sur une réaction à la ninhydrine.

On peut isoler un acide aminé selon les procédures ordinaires,

à partir du filtrat ou de la solution surnageante.

Afin de mieux illustrer la présente invention, mais non de la limiter, on donnera les exemples suivants.

EXEMPLE 1

5 Lactobacillus bulgaricus (IFO-3533) et Streptococcus thermophilus (IFO-3535) sont chacun inoculés à partir de cultures dans un milieu agar dans 10 ml d'un milieu (Milieu A) possédant la composition suivante:

Milieu A (pour la culture d'ensemencement)

		g/l
10	Glucose	10
	Peptone	12,5
	Extraits de levure	7,5
	KH_2PO_4	5,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8
15	NaCl	5,0
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,14
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,04
	Na_2CO_3	1,25
	Tween 80	0,2
20	pH	6,8 (après stérilisation à 120°C pendant 15 min.)

Les deux inocula sont chacun mis en incubation à 37°C pendant 20 heures. On ajoute trois millilitres de chacun des inocula à 100 ml du second milieu (Milieu B) possédant la composition suivante:

Milieu B (pour la culture d'ensemencement)

		g/l
25	Petit lait de fromage (com. lactose)	30
	KH_2PO_4	1
	Extraits de levure	6
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
30	CaCO_3	30
	pH	6,5 (après stérilisation à 120°C pendant 15 min.)

La culture stationnaire pour la fermentation d'acide lactique se fait à 37°C pendant 24 heures. On utilise la culture résultante comme inoculum (semence A) pour une culture mixte avec des microorganismes produisant l'acide aminé répertoriés dans le tableau I.

Les microorganismes produisant l'acide aminé sont introduits, chacun d'un plan agar dans 5 ml d'un milieu (Milieu C) possédant la composition suivante:

Milieu C (pour culture d'ensemencement)

	g/l
Glucose	10
Peptone	10
Extrait de viande	5
NaCl	5
Lactate*	3~5

pH 7,0 (après stérilisation à 120°C pendant 15 minutes)

* Un bouillon de culture obtenu en cultivant *Sc. thermophilus*

plus *L. bulgaricus* dans un milieu (Milieu B, lactose 40~50 g/l) à 37°C, pendant 72 heures est utilisé comme source d'acide lactique.

On réalise l'agitation aérobie à 30°C pendant 20 heures. On introduit ensuite un millilitre de la culture résultante dans 20 ml d'un milieu de fermentation (D) possédant la composition suivante:

Milieu D (pour la fermentation)

	g/l
Petit lait du fromage (com. lactose)	50
Glucose	10
KH_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25
CaCO_3 (stérilisé séparément)	50

pH initial de 6,7 pour des souches de bactéries

6,0 pour des souches de levure

On effectue la fermentation en cultivant à 30°C avec agitation aérobie pendant 16 heures, puis on introduit 3% en volume de l'inoculum des microorganismes d'acide lactique (semense A) dans le milieu de fermentation.

On continue la fermentation avec agitation aérobie à 30°C pendant 60 heures. On ajuste le pH du milieu à 4,5~6,5 pour des souches de levure et à 5,0~7,0 pour des souches de bactéries, avec une solution de soude caustique ou d'acide chlorhydrique au cours de la culture. Une fois la culture terminée, on chauffe le bouillon de culture résultant à 95°C pendant 5 minutes. Cette procédure donne des cellules microbiennes et des précipités tels que des protéines coagulant à la chaleur, facilement éliminables par centrifugation ou filtration.

Tableau I Fermentation d' amino-acides utilisant le petit lait

Microorganisme	Assimilabilité*		culture mixte		Monoculture	
	acide lactique	jactose	Crois.descel**	Amino acides	Crois.des cell.**	Amino acides
<i>Alkaligenes faecalis</i> IFO-3160	+	-	L-Lys L-Val L-Ileu	250mg/ℓ 200 400	1,5g/ℓ	moins de 100mg/ℓ
<i>Acinetobacter</i> 38-15 FERM-P-2188 (résistant à S-AEC)	+	-	L-Lys L-Val L-Ileu L-Leu	4500 300 200 100	néglig.	moins de 100mg/ℓ
<i>Arthrobacter</i> No.18 FERM-P-1481 (résistant à la thréonine)	+	-	L-Lys L-Val L-Ileu	1200 200 500	néglig.	moins de 100mg/ℓ
<i>Bacillus circulans</i> IFO-3329	+	±	L-Lys	350	3g/ℓ	moins de 100mg/ℓ
<i>Bacillus subtilis</i> IAM-1071	+	-	L-Lys L-Glu DL-Ala L-Val	150 500 400 200	1,5g/ℓ	moins de 100mg/ℓ
<i>Brevibacterium</i> <i>alkanolyticum</i> IFO-12922	+	-	L-Lys L-Glu L-Val	200 2500 300	néglig.	moins de 100mg/ℓ
<i>Brevibacterium</i> <i>flavum</i> ATCC-13826	+	-	L-Glu L-Lys L-Val DL-Ala L-Leu L-Ileu Glycine	1500 450 600 300 200 150 200	2,5g/ℓ	L-Glu 300mg/ℓ L-Val 150 "

5

10

15

20

25

30

35

Microorganism e	Assimilabilité*		culture mixte		Monoculture	
	acide lactique	Lactose	Crois. des cell.*	Amino acides	Crois. des cell.**	amino-acides
Brevibacterium lactofermentum ATCC-21420 (Tyrosine-auxotrophe)	+	-	9,5g/l L-Glu DL-Ala L-Val L-Ileu L-Phe L-Lys	500mg/l 2500 800 300 500 700	2,0g/l L-Glu DL-Ala	200 300
Corynebacterium hydrocarbonoclastum ATCC-15592	+	-	11g/l L-Glu L-Lys	1500 150	néglig.	moins de 100mg/l
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC-13870	+	-	8g/l DL-Ala L-Val L-Ileu	500 200 150	1,5g/l	moins de 100mg/l
Flavobacterium lutescens IFO-3085	+	-	7g/l L-Lys	250	2,0g/l	moins de 100mg/l
Micrococcus roseus IFO-3768	+	-	9g/l L-Lys L-Val L-Ileu	200 200 300	1,5g/l	moins de 100mg/l
Nocardia erythropolis IAM-12122	+	-	12g/l L-Glu L-Lys	2500 150	néglig.	moins de 100mg/l
Serratia plymuthicum IFO-3055	+	±	10g/l L-Lys DL-Ala	150 400	3,0g/l	moins de 100mg/l
Proteus morganii IFO-3848	+	-	8g/l L-Lys L-Val	250 200	2,0g/l	moins de 100mg/l
Saccharomyces cerevisiae IFO-0971	+	-	8,5g/l DL-Ala L-Glu L-Asp	500 500 300	3g/l	moins de 100mg/l

35
30
25
20
15
10
5

Microorganismes	Assimilabilité *		culture mixte		Monoculture	
	acide lactique	Lactose	croiss. des cell.	Amino acides	croiss. des cell.**	Amino acides
Saccharomyces oviformis IAM-4325	+	-	12g/ℓ	DL-Ala 2500mg/ℓ L-Glu 1000 L-Val 200	3,5g/ℓ	moins de 100mg/ℓ
Sporoboromyces roseus IFO-1037	+	-	10g/ℓ	DL-Ala 1500 L-Glu 500	3,5g/ℓ	moins de 100mg/ℓ
Candida humicola IFO-1577	+	±	15g/ℓ	DL-Ala 500 L-Glu 1500 L-Val 200 L-Asp 500	8g/ℓ	L-Glu 800mg/ℓ L-Asp 300
Schizosaccharomyces pombe IFO-6170	+	-	8g/ℓ	DL-Ala 500 L-Glu 1500	3g/ℓ	moins de 100mg/ℓ

* Note 1 Assimilabilité +: assimilable, ±: faiblement assimilable, -: non assimilable

** Note 2 Croissance des cellules Une croissance du poids des précipités (poids sec) dans le bouillon après dissolution du carbonate de calcium par addition d'acide chlorhydrique, est considérée comme une indication de la croissance des cellules.

Note 3 Abréviation des amino-acides:

Lys: Lysine , Val: Valine , Ileu: Isoleucine ,
Glu: Glutamate, Leu: Leucine , Phe: Phénylalanine ,
Ala: Alanine , Asp: acide aspartique

EXEMPLE 2

Brevibacterium flavum (ATCC-13326), Corynebacterium glutamicum (ATCC-13032), Micrococcus lysodeikticus (IAM-3333), Micrococcus roseus (IFO-3768), Brevibacterium lactofermentum (ATCC-13869), Brevibacterium linens (IFO-12142), et Microbacterium ammoniafilum (ATCC-15354) sont tous cultivés de la même manière que dans l'exemple 1, si ce n'est qu'on ajoute 4 U.I. par millilitre de sel de potassium de pénicilline G 16 heures après le début de la culture, en même temps que des microorganismes d'acide lactique utilisés dans l'exemple 1, et qu'on ajuste le pH du milieu à 6,0 à 7,0. Il est confirmé que les bactéries d'acide lactique utilisées sont résistantes à 5 U.I./ml de pénicilline G dans les présentes conditions de culture. On indique les quantités d'acide L-glutamique accumulées dans le bouillon de culture après 3 jours de culture dans le tableau 2.

Tableau 2

Microorganismes	Acide L-glutamique accumulé g/l
Brevibacterium flavum ATCC-13326	18,0
Corynebacterium glutamicum ATCC-13032	17,0
Micrococcus roseus IFO-3768	8,5
Brevibacterium lactofermentum ATCC-13869	15,0
Brevibacterium linens IFO-12142	6,0
Microbacterium ammoniafilum ATCC-15354	14,0
Micrococcus lysodeikticus IAM-3333	5,0

EXEMPLE 3

On laisse incuber une souche produisant la L-lysine, Brevibacterium flavum (ATCC-13326, nécessitant l'homosérine) dérivé par mutation de la souche mère, Brev. flavum (ATCC-13826), avec agitation aérobie dans 30 ml d'un milieu (Milieu C dans l'exemple 1) à 30°C pendant 24 heures.

On inocule trois millilitres du bouillon de culture résultant et 0,5 ml d'un inoculum d'une bactérie d'acide lactique (semence A dans l'exemple 1), dans 27 ml d'un milieu de fermentation(Milieu E) possédant la composition suivante:

5	<u>Milieu E</u> (pour fermentation)	g/l
	Petit lait de fromage(comme lactose)	80
	Glucose	20
	KH_2PO_4	0,5
	K_2HPO_4	0,5
10	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35
15	C.S.L.	7,5
	CaCO_3	50
	L-homosérine	0,2

On ajuste le pH à 6,7 après stérilisation à 120°C pendant 15 min.

On effectue la culture mixte de la même manière que dans l'exemple 1. Après 72 heures de culture, la concentration de L-lysine dans le bouillon de culture résultant est de 24,5 g/l (comme chlorhydrate). On trouve aussi dans le bouillon de culture cinq grammes de L-valine.

EXEMPLE 4

On effectue la culture mixte en utilisant, comme microorganisme produisant l'acide-amino, *Corynebacterium acetoacidophilum* (ATCC-21476, nécessitant l'homoserine), et *Corynebacterium glutamicum* (ATCC-13287, nécessitant l'homoserine), de la même manière que dans l'exemple 3. Après trois jours de culture, la quantité de L-lysine produite est de 22,0 et 12,0 g/l, respectivement.

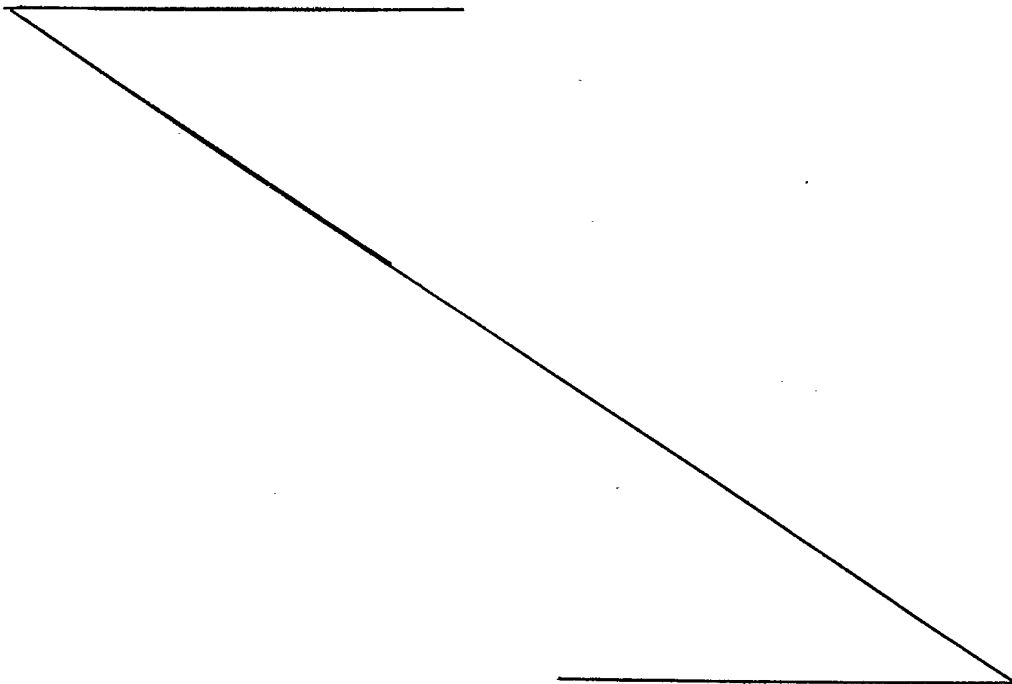
~~2491495~~EXEMPLE 5

On effectue la culture mixte en utilisant *Brevibacterium lactofermentum* (FERM-P-1945, résistant à 2-thiazolealanine) comme microorganisme produisant l'acide-amino, de la même manière que dans l'exemple 3., si ce n'est qu'on supprime L-homosérine dans le milieu E. Après 4 jours de culture, la quantité de L-valine produite est de 12 g/l. Par ailleurs, dans le cas d'une monoculture utilisant la même souche comme microorganisme produisant l'acide-amino, la quantité de L-valine produite est de 1,5 g/l.

EXEMPLE 6

10 On effectue la culture mixte en utilisant, respectivement comme microorganisme produisant la L-thréonine un mutant nécessitant L-isoleucine (ATCC-19560) dérivé de *Corynebacterium hydrocarboclastum* (ATCC-15592) et un mutant résistant à un analogue de L-thréonine (ATCC-21269) dérivé de *Brevibacterium flavum* (ATCC-13826), de la même manière que dans l'exemple 1, mais en utilisant *Streptococcus cremoris* (IFO-3427) comme microorganisme d'acide lactique à la place de *Sc. thermophilus* et on ajoute 100 mg/l de L-isoleucine au milieu de fermentation. La L-thréonine produite après trois jours de culture est respectivement de

15



25

1,2 g/l et de 3,2 g/l.

EXEMPLE 7

On utilise comme souche produisant la L-lysine, *Nocardia alkanoglutinosa* N° 223-59 (ATCC-31220, Résistant à S-AEC). On obtient la souche par un traitement mutational à partir d'une souche assimilant les hydrocarbures isolée du sol (Brevet U.S. 4 123 329). La souche peut utiliser de l'hydrocarbure, de l'acide lactique, de l'acide pyruvique ou de l'acide acétique mais non du lactose ou du sucrose comme seule source de carbone. L'assimilabilité du glucose est faible. On inocule la souche d'un agar dans 50 ml d'un milieu (Milieu E) possédant la composition suivante:

Milieu E (pour culture d'ensemencement)

	g/l
Fructose -----	15
15 Peptone -----	5
(NH ₄) ₂ SO ₄ -----	4
NaCl -----	1
20 K ₂ HPO ₄ -----	1
KH ₂ PO ₄ -----	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O -----	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O -----	0,02
25 MnSO ₄ · 4H ₂ O -----	0,01
ZnSO ₄ · 7H ₂ O -----	0,01
Acide lactique* -----	6 ~ 7
pH -----	6,7

30

* On utilise le même bouillon de culture que dans le milieu C dans l'exemple 1.

On effectue la culture avec agitation aérobie à 30°C pendant 24 heures.

35

Par ailleurs, on prépare un inoculum de *Lactobacillus bulgaricus* en utilisant les mêmes milieux de culture A et B de la même manière que dans l'exemple 1.

On inocule un millilitre de chaque inoculum dans un milieu de fermentation (Milieu F) possédant la composition suivante:

Milieu F (pour fermentation)

	Glucose -----	100
5	KH ₂ PO ₄ -----	0,5
	K ₂ HPO ₄ -----	0,5
	MgSO ₄ ·7H ₂ O -----	0,5
	NaCl -----	1
10	FeSO ₄ ·7H ₂ O -----	0,02
	MnSO ₄ ·4H ₂ O -----	0,01
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O -----	0,01
15	(NH ₄) ₂ SO ₄ -----	35
	Peptone -----	5
	CaCO ₃ -----	50

On ajuste le pH à 6,7 ~ 6,8 après stérilisation à 120°C pendant
20 15 minutes.

On effectue la culture mixte avec agitation aérobie à 30°C pendant 4 jours.

Dans une expérience de contrôle, on inocule seulement un inoculum de *Nocardia alkanoglutinos*a ATCC-31220 dans le milieu F, et on effectue une
25 mono-culture à 33°C avec agitation pendant 4 jours.

On obtient des quantités accumulées de L-lysine de 14,8 g/l et de 2,1 g/l respectivement, avec la culture mixte et la mono-culture.

EXEMPLE 8

On effectue la culture mixte en utilisant diverses souches de
30 microorganismes d'acide lactique de la même manière que dans l'exemple 7.
Les résultats sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2

Souches		L-lysine HCl
5	(Monoculture)	2,2 g/l
	(culture mixte)	
	Lactobacillus acidophilus IFO-3532	14,2
	Lactobacillus casei IFO-12004	10,5
10	Lactobacillus thermophilus IFO-3863	8,5
	Lactobacillus delbrueckii IFO-3534	4,1
	Lactobacillus plantarum IFO-12006	8,1
	Streptococcus cremoris IFO-3427	14,5
15	Streptococcus thermophilus IFO-3535	14,1
	Leuconostoc dextranicum IFO-3347	4,1
	Leuconostoc mesenteroides IFO-3426	3,5
	Bacillus coagulans IFO-3887	3,5
20	Pediococcus soyae IFO-12172	8,0
	Pediococcus pentosaseus IFO-3891	4,5
	Rhizopus oryzae IFO-4706	7,5
25		

EXEMPLE 9

Lactobacillus delbrueckii (IFO-3534) et Streptococcus thermophilus (IFO-3535) sont chacun inoculés dans un milieu (Milieu A) et les inocula sont chacun mis à incuber à 37°C pendant 20 heures. On ajoute trois millilitres de chaque inoculum à 100 ml d'un milieu de culture contenant 2,5 g/dl de mélasses de canne (comme sucre), 0,1 g/dl de KH_2PO_4 , 0,05 g/dl de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/dl d'extrait de levure, 0,5 g/dl de peptone, et 3 g/dl de CaCO_3 , et possédant un pH initial de 6,8. On effectue la culture à 37°C pendant 24 heures.

Par ailleurs, on prépare un inoculum d'une souche produisant la L-lysine, Nocardia alkanoglutinosa (FERM-P-6046) selon une procédure de l'exemple 7.

On inocule deux millilitres de l'inoculum ainsi obtenu et 0,5 ml de l'inoculum des bactéries d'acide lactique décrit ci-dessus, dans 28 ml d'un

28

milieu de fermentation contenant 8 g/dl de mélasses de canne (comme sucre), 2 g/dl de petit lait de fromage (comme lactose), 0,05 g/dl de K_2HPO_4 , 0,05 g/dl de KH_2PO_4 , 0,05 g/dl de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,0 g/dl de C.S.L., 0,2 g/dl d'hydrolysats de caséine, 3,5 g/dl de $(NH_4)_2SO_4$, et 5,0 g/dl de $CaCO_3$, et possédant un pH initial de 6,8.

On effectue la culture mixte avec agitation aérobie à 34 ~ 35°C pendant 94 heures. La quantité de L-lysine produite est de 26,5 g/l (sous forme de chlorhydrate).

EXEMPLE 10

On inocule *Lactobacillus bulgaricus* IFO-3533 et *Streptococcus thermophilus* IFO-3535 (rapport d'inoculation: 1:1) dans 100 ml du milieu A et on cultive à 37°C toute la nuit. On recueille les cellules microbiennes par centrifugation, on les lave avec de l'eau salée stérilisée et on les met en suspension dans 10 ml d'eau saline stérilisée. On mélange la suspension de cellules avec 20 ml d'une solution stérilisée de 3 g/dl d'alginate de sodium (réactif induisant le gel).

On verse ensuite la suspension par gouttes dans une solution à 2% en poids par volume de $CaCl_2$. On lave les perles formées avec une solution saline stérilisée.

On inocule deux millilitres d'un inoculum de *Nocardia alkanoglutinosa* 223-59 obtenu par la même procédure que celle décrite dans l'exemple 7, dans 30 ml d'un milieu de fermentation (Milieu D) contenant du petit lait de fromage et du glucose.

On place environ 20 gouttelettes des perles obtenues ci-dessus, où les cellules des microorganismes d'acide lactique ont été immobilisées, de façon aseptique dans le milieu de fermentation.

On effectue la culture mixte à 33°C pendant 70 heures. On maintient le pH du milieu de culture à 6,0 ~ 6,8 au cours de la culture. La quantité de L-lysine produite après trois jours de culture est de 8,5 g/l (sous forme de chlorhydrate).

EXEMPLE 11

On réalise la production de L-lysine à partir d'un perméat de petit lait dans un flacon de fermentation de 2-l. L'échantillon de petit lait est un produit obtenu par ultrafiltration de petit lait de fromage (l'échantillon séché contient 84% de lactose et 9% de cendres).

On prépare par la même procédure que dans l'exemple 7, un inoculum de *Nocardia alkanoglutinosa* (FERM-P-6064). Cinquante millilitres de l'inoculum, avec 30 ml de l'inoculum de *L. bulgaricus* plus *Sc. thermophilus* (semence A dans l'exemple 1), sont inoculés dans 1 000 ml d'un milieu de fermentation

de composition suivante: 10 g/dl (comme lactose) de perméation du petit lait de fromage, 0,4 g/dl d'alcool éthylique, 0,05 g/dl de K_2HPO_4 , 0,05 g/dl de KH_2PO_4 , 0,05 g/dl de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g/dl de C.S.L., 0,5 g/dl de peptone, 0,2 g/dl d'hydrolysats de caséine, 1,75 g/dl de $(NH_4)_2SO_4$, avec un pH initial de 6,8.

5 On effectue la culture mixte avec agitation (1000 t.p.m.) et aération (1,0 V.V.M.). On maintient le pH du milieu à 6,6/6,8 pendant 24 heures à partir du début de la culture avec de l'acide sulfurique et on l'ajuste ensuite à 6,0/6,2 avec de l'ammoniac. Au cours de la culture, la teneur d'acide lactique dans le milieu de culture est déterminée par une méthode enzymatique
10 utilisant le lactate déshydrogénase.

Au stade initial de la culture, la concentration d'acide L-lactique augmente jusqu'à 0,5 g/dl (12 heures de culture) puis diminue rapidement jusqu'à moins de 0,1 g/dl. La quantité de L-lysine produite après 50 heures de culture est de 30,5 g/l (sous forme de chlorhydrate).

15 On chauffe le bouillon de culture à 95°C pendant 15 minutes pour avoir 21 g de cellules séchées à partir d'1 litre de bouillon de culture.

On sépare et purifie la L-lysine du filtrat par une méthode conventionnelle utilisant une résine échangeur d'ion pour obtenir 11,5 g de chlorhydrate de L-lysine à partir de 500 ml du filtrat.

20 EXEMPLE 12

Deux millilitres d'un inoculum de *Nocardia alkanoglutinosa* (FERM P-6064) préparé par la même procédure que dans l'exemple 7 et 0,5 ml d'un inoculum de *L. bulgaricus* plus *Sc. thermophilus* (semence A) décrit dans l'exemple 1, sont inoculés dans un milieu contenant 10 g/dl d'amidon soluble, 3,5 g/dl
25 de $(NH_4)_2SO_4$, 0,05 g/dl de KH_2PO_4 , 0,05 g/dl de K_2HPO_4 , 0,05 g/dl de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 mg/dl de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mg/dl de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 1 mg/dl de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 g/dl d'hydrolysats de caséine, 0,4 g/dl de peptone, et 5 g/dl de $CaCO_3$ et possédant un pH initial de 6,8.

30 Avant le départ de la culture, on ajoute aseptiquement au milieu de fermentation 5 unités par gramme d'amidon de glucoamylase (une unité: la quantité qui fournit 10 mg de glucose par réaction à 40°C, pH 4,5, pendant 30 minutes). On utilise un filtrat de glucoamylase (avec une membrane filtre - filtre Millipore; dimension de pore 0,22µ).

35 On effectue la culture mixte avec agitation aérobie à 35°C pendant 90 heures. La quantité de L-lysine produite est de 25,0 g/l (sous forme de chlorhydrate).

REVENDEICATIONS

- 1- Procédé pour produire un amino-acide caractérisé en ce qu'il comprend la culture aérobie d'un microorganisme produisant l'acide lactique, possédant l'appétitude à assimiler l'acide lactique, en présence d'au moins un microorganisme d'acide lactique dans un milieu nutritif aqueux contenant au moins un hydrate de carbone, qui est assimilable par le microorganisme d'acide lactique mais non assimilable ou peu assimilable par le microorganisme produisant l'acide lactique, comme principale source de carbone, l'accumulation d'un amino-acide dans le bouillon de culture résultant, et la récupération de l'acide lactique du bouillon de culture.
- 2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'acide lactique est un membre choisi dans le groupe constitué par: L-lysine, L-valine, L-thréonine, acide L-glutamique, L-isoleucine, L-leucine, DL-alanine, L-phénylalanine, L-tyrosine, L-tryptophane, L-arginine, L-histidine, L-sérine, L-glycine, et acide L-aspartique.
- 3- Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le microorganisme produisant l'acide lactique est un membre appartenant à un genre choisi dans le groupe constitué par: Alkaligenus, Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Flavobacterium, Micrococcus, Microbacterium, Nocardia, Proteus, Serratia, Candida, Saccharomyces, Sporoboromyces et Schizosaccharomyces.
- 4- Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que le microorganisme produisant l'acide lactique est un membre choisi dans le groupe constitué par les espèces Alkaligenes faecalis, Alkaligenes marshallii, Acinetobacter sp-38-15, Acinetobacter calcoaceticus, Arthrobacter paraffineus, Arthrobacter citreus, Arthrobacter sp-18, Bacillus circulans, Bacillus megatherium, Bacillus subtilis, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium acetylicum, Brevibacterium thiogenitalis, Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Corynebacterium hydrocarboclastum, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium glutamicum, Flavobacterium lutescens, Micrococcus luteus, Micrococcus roseus, Microbacterium ammoniafilum, Nocardia alkanoglutinosa, Nocardia erythropolis, Nocardia lyena, Proteus morgani, Serratia marcescens, Serratia plymuthicum, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces oviformis, Candida humicola, Candida lypolitica, Sporoboromyces roseus, Schizosaccharomyces pombe.
- 5- Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le microorganisme d'acide lactique est un membre appartenant au genre choisi dans le groupe constitué par Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Tetracoccus, Bacillus et Rhizopus.
- 6- Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le microorganisme

- d'acide lactique est un membre choisi dans le groupe constitué par les espèces Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus japonicus, Lactobacillus thermophilus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus pentosus, Streptococcus cremoris, Streptococcus thermophilus, Streptococcus lactis, Leuconostoc dextranicum, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus, Pediococcus soyae, Tetra-
coccus soyae, Bacillus coagulans, Bacillus laevolactici et Rhizopus oryzae.
- 7- Procédé selon la revendication 1, 5 ou 6, caractérisé en ce que le micro-
organisme d'acide lactique est constitué de cellules vivantes immobilisées
dans ou sur un matériau de support.
- 8- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 5 ou 6 caractérisé en
ce que le microorganisme d'acide lactique est une souche mutante résistant
aux antibiotiques ou aux analogues amino-acides.
- 9- Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'hydrate de car-
bone est un membre choisi dans le groupe constitué par: glucose, fructose, su-
crose, mélasses, hydrolysats d'amidon, hydrolysats de cellulose, hydroly-
tose, hydrolysats de lactose, jus de fruits, petit lait de caséine, petit lait
de fromage, petit lait de soja, dextrine et amidon.
- 10- Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'on inocule, une
culture d'ensemencement obtenue en cultivant le microorganisme produisant l'a-
mino-acide dans un milieu nutritif aqueux contenant de l'acide lactique, son
sel, ou un bouillon de culture du microorganisme d'acide lactique, dans le mi-
lieu nutritif aqueux pour la production d'acide lactique.
- 11- Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'on effectue la cul-
ture en inoculant le microorganisme produisant l'acide lactique dans le milieu
nutritif aqueux pour la production d'acide lactique contenant l'acide lactique,
et qu'on poursuit en précultivant le microorganisme avant l'inoculation du mi-
croorganisme d'acide lactique dans le milieu nutritif aqueux.
- 12- Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'on inocule, une
culture d'ensemencement obtenue en cultivant en aérobic à la fois le microor-
ganisme produisant l'acide lactique et le microorganisme d'acide lactique dans un
milieu nutritif aqueux contenant l'hydrate de carbone, dans le milieu nutritif
aqueux pour la production d'acide lactique.
- 13- Procédé selon la revendication 1 ou 12, caractérisé en ce qu'on controle
la concentration d'acide lactique accumulé dans le milieu de culture au cours
de la culture, afin qu'elle se situe dans une plage non supérieure à 1,5% en
poids/volume.
- 14- Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'on effectue
le controle de la concentration d'acide lactique en réglant la température de

culture, le pH du milieu de culture, le taux d'apport d'oxygène vers le milieu de culture, ou une de leur combinaison.

15- Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'on effectue la culture à un pH de 4,5 à 7,5.

16- Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'on effectue la culture à une température de 25 à 55°C.

17- Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'on ajoute au milieu nutritif aqueux l'amylase et l'hydrate de carbone est l'amidon ou la dextrine.

18- Procédé selon l'une des revendications 1 et 9 à 17, caractérisé en ce que le microorganisme d'acide lactique est un de ceux qui produit une substance antimicrobienne, et le microorganisme produisant l'acide-amino est une souche mutante résistante à la substance antimicrobienne.