

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 07491

(54) Procédé pour la production de L-méthionine par fermentation.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). C 12 P 13/12; C 12 R 1/19.

(22) Date de dépôt..... 14 avril 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 14 avril 1980, n° 48856/80.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 42 du 16-10-1981.

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

(72) Invention de : Takayasu Tsuchida et Shigeru Nakamori.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

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

La présente invention concerne un procédé pour la production de L-méthionine par fermentation et, en particulier, un procédé pour produire la L-méthionine avec un micro-organisme construit par une technique de recombinaison de gènes.

5 La plupart des souches sauvages de micro-organismes ne produisent pas de L-méthionine dans le milieu. Pour rendre une souche sauvage capable de produire la L-méthionine à partir des hydrates de carbone, il a été nécessaire d'induire des mutants
10 mutants artificiels producteurs de méthionine connus. Les mutants connus caractéristiques producteurs de méthionine sont les suivants : Escherichia coli résistant à l'éthionine¹⁾, Candida utilis résistant à l'éthionine²⁾, Salmonella typhimurium résistant à l'éthionine³⁾, Salmonella typhimurium résistant à l' α -méthylméthionine³⁾, Salmonella typhimurium résistant à la norleucine³⁾, Escherichia coli résistant à la norleucine⁴⁾, Corynebacterium glutamicum résistant à l' α -méthylméthionine⁵⁾, et Brevibacterium flavum résistant à l'éthionine⁶⁾.

1) J. Bacteriol., 76,326 (1958),

2) Folia Microbiol., 9,374 (1964),

20 3) Genetics, 58,473 (1968),

4) Compt. Rend., 248,3490 (1959),

5) Brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.729.381,

6) Publication pour opposition de la demande de brevet japonais n° 6753/1976.

25 Le producteur de méthionine le plus efficace jusqu'à présent, à la connaissance de la demanderesse, est Corynebacterium glutamicum ATCC 21608 qui a produit 3,4 mg/ml de L-méthionine à partir de 10 g/dl de glucose.

Il est devenu cependant difficile d'augmenter les
30 rendements de L-méthionine en utilisant les techniques de mutation artificielle. On a donc constamment besoin de mettre au point un nouveau procédé pour la production de L-méthionine avec des rendements élevés.

L'invention a donc pour objet un procédé pour la
35 production de L-méthionine avec des rendements élevés.

Cet objet et d'autres objets de l'invention qui apparaîtront plus facilement ci-après ont été obtenus par un procédé qui consiste :

5 à cultiver dans un milieu de culture un micro-organisme producteur de L-méthionine qui est obtenu par incorporation, dans une souche réceptrice du genre Escherichia, d'un plasmide hybride dans lequel est inséré un fragment d'ADN portant l'information génétique relative à la production de L-méthionine, qui provient d'une souche de donneur d'ADN du genre Escherichia qui est résistante à l'éthionine
10 et à récupérer de la L-méthionine accumulée dans le milieu de culture.

La souche de donneur d'ADN utilisée pour construire le producteur de L-méthionine de l'invention est un mutant du genre Escherichia résistant à l'éthionine et possède l'information génétique relative à la production de L-méthionine. On utilise de préférence
15 comme donneur d'ADN des souches ayant une productivité supérieure de L-méthionine. Le mutant résistant à l'éthionine utilisé comme donneur d'ADN peut être obtenu par des techniques classiques de mutation.

L'ADN chromosomique est extrait du donneur d'ADN de
20 manière bien connue et traité avec une endonucléase de restriction par un procédé bien connu (Biochem. Biophys. Acta 383, page 457 (1975)).

Le plasmide-ADN ou ADN-phage utilisé comme vecteur dans le procédé de synthèse est également traité de manière analogue par une endonucléase de restriction. On peut utiliser divers types d'endo-
25 nucléases de restriction, si la digestion de l'ADN chromosomique est effectuée partiellement. Ensuite, l'ADN chromosomique digéré et l'ADN vecteur sont soumis à une réaction de "ligation" (fixation).

La recombinaison de l'ADN pour préparer le plasmide recombinant peut être effectuée par introduction, avec la transférase
30 terminale, d'acide désoxyadénylique et d'acide désoxythymidylique ou d'acide désoxyguanylique et d'acide désoxycytidylique dans le fragment d'ADN chromosomique et l'ADN vecteur scindé, et en soumettant le fragment d'ADN chromosomique modifié et l'ADN vecteur scindé à une réaction d'annellation.

35 Comme ADN vecteur convenable, on peut utiliser un vecteur classique tel que Col E1, pSC 101, pBR 322, pACYC 177, pCR 1, R6K ou λ -phage, ou leurs dérivés.

L'ADN hybride ainsi obtenu peut être incorporé dans un micro-organisme du genre Escherichia par des techniques classiques de transformation, voir J. Bacteriol., 119, page 1072 (1974). Le transformant désiré est sélectionné en utilisant un milieu sur lequel
5 ne peut pousser qu'un clone ayant les caractéristiques de production de L-méthionine provenant du fragment d'ADN chromosomique ou celles provenant de l'ADN vecteur, ou les unes et les autres.

Comme micro-organisme récepteur de l'ADN hybride, on utilise ordinairement un auxotrophe de L-méthionine puisqu'il est
10 classique de distinguer le transformant producteur de méthionine du récepteur. Il est souhaitable, pour obtenir de meilleurs résultats, d'utiliser comme récepteur un mutant possédant déjà une productivité supérieure de L-méthionine.

Les procédés de culture des souches productrices de
15 L-méthionine ainsi obtenues sont classiques et semblables aux procédés pour la culture des micro-organismes producteurs de L-méthionine connus. Donc, le milieu de culture utilisé est un milieu classique contenant des sources de carbone, des sources d'azote, des ions inorganiques et, si nécessaire, de plus faibles quantités d'agents
20 nutritifs organiques, tels que vitamines ou aminoacides. Des exemples de sources de carbone appropriées comprennent le glucose, le saccharose, le lactose, l'hydrolysate de maïs et les mélasses. On peut utiliser comme sources d'azote l'ammoniac gazeux, l'ammoniaque aqueuse et les sels d'ammonium et d'autres substances azotées.

25 La culture des micro-organismes recombinants est effectuée en conditions aérobies, le pH et la température du milieu étant ajustés à une valeur convenable et maintenus jusqu'à ce que la formation de L-méthionine cesse.

La L-méthionine accumulée dans le milieu de culture
30 peut être récupérée par des procédés classiques.

Par le procédé de la présente invention, on peut produire la L-méthionine avec des rendements plus élevés que ceux obtenus dans les procédés connus précédemment, dans lesquels on utilise des mutants artificiels d'Escherichia.

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

EXEMPLE 1(1) Préparation d'ADN chromosomique possédant l'information génétique relative à la production de L-méthionine

Dans 1 litre de milieu L contenant 1 g/dl de peptone,
 5 0,5 g/dl d'extrait de levure, 0,1 g/dl de glucose, 0,5 g/dl de NaCl
 (ajusté à pH 7,2), on cultive à 37°C, pendant 3 h en agitant,
Escherichia coli EG-20 (NRL B-12392), mutant résistant à la
 S-(2-aminoéthyl)-cystéine (AEC) et à l'éthionine et dérivé de K-12
 (ATCC 10798) par exposition de cellules K-12 à 250 γ /ml de N-méthyl-
 10 N'-nitro-N-nitrosoguanidine dans un tampon à l'acide citrique à pH 5,5
 à 0°C pendant 60 min, et en séparant la colonie qui apparaît sur le
 milieu de gélose, et on récolte les cellules bactériennes dans la
 phase de croissance exponentielle. On extrait l'ADN chromosomique
 par une méthode classique au phénol et on obtient 3,4 mg d'ADN purifié.

15 (2) Préparation d'ADN vecteur

On prépare comme vecteur l'ADN de pBR 322 de la
 manière suivante :

On fait incuber à 37°C une souche d'Escherichia coli
 K-12 recevant le plasmide pBR 322 dans 1 litre d'un milieu contenant :
 20 2 g de glucose, 1 g de NH_4Cl , 6 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 5 g de
 NaCl, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g de "casamino-
 acide" (hydrolysate de caséine), 0,05 g de thymine, 0,05 g de L-trypto-
 phane et 100 γ de chlorhydrate de thiamine par litre (ajusté à pH 7,2).
 Après avoir fait incuber la souche jusqu'à la fin de la phase loga-
 25 rithmique, on ajoute au milieu de culture 170 γ /ml de chloramphénicol.
 Par ce procédé, l'ADN de plasmide s'est développé et accumulé abondam-
 ment dans les cellules bactériennes.

Après 16 h d'incubation, on récolte les cellules que
 l'on lyse par traitement par le lysozyme et le dodécylsulfate de
 30 sodium. On centrifuge le lysat à 30.000xg pendant 1 h pour obtenir
 la liqueur surnageante. Après concentration de la liqueur surnageante,
 on obtient 480 γ de l'ADN de plasmide pBR 322 en utilisant la centri-
 fugation dans un gradient de densité chlorure de césium-bromure
 d'éthidium jusqu'à l'équilibre.

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

On traite 10 γ de l'ADN chromosomique avec l'endo-nucléase de restriction Hind III à 37°C pendant 5, 10, 20, 30 ou 60 min pour scinder les chaînes d'ADN, et on chauffe à 65°C pendant 5 min, respectivement. On traite également 10 γ de l'ADN vecteur avec chacune des endonucléases de restriction mentionnées ci-dessus à 37°C pendant 1 h pour scinder complètement l'ADN, et on chauffe ensuite à 65°C pendant 5 min.

On mélange la solution d'ADN chromosomique digéré et la solution d'ADN vecteur scindé et on soumet à la réaction de ligation de fragments d'ADN par une ligase de l'ADN-phage T₄ en présence d'ATP et de dithiothréitol à 10°C pendant 24 h. On chauffe ensuite le mélange de réaction à 65°C pendant 5 min, et on ajoute deux fois son volume d'éthanol. On récupère l'ADN recombinant précipité.

15 (4) Transformation génétique par le plasmide hybride recevant l'information génétique relative à la production de L-méthionine

On induit les souches réceptrices suivantes à partir d'Escherichia coli K-12 par exposition à 250 γ /ml de N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine dans un tampon à l'acide citrique à pH 5,5 à 0°C pendant 60 min.

N° 2 (NRRL B-12393) (résistant à la S-(2-aminoéthyl)-cystéine)

N° 30 (NRRL B-12395) (résistant à la norleucine)

N° 77 (NRRL B-12397) (résistant à la 2-thiazoléalanine)

25 N° 283 (NRRL B-12398) (résistant à la p-fluorophényl-alanine)

On inocule chacune des souches réceptrices dans 10 ml de milieu L et on cultive à 37°C en agitant.

On récolte les cellules dans la phase de croissance exponentielle et on les met en suspension dans une solution de MgCl₂ 0,1M et ensuite dans une solution de CaCl₂ 0,1M au bain de glace; on prépare ainsi les cellules "compétentes" capables de fixer l'ADN.

Dans la suspension de cellules compétentes, on ajoute 35 l'ADN obtenu à l'étape (3) qui contient l'ADN de plasmide hybride. On

maintient la suspension au bain de glace pendant 30 min, puis on chauffe à 40°C pendant 2 min, et on laisse à nouveau reposer au bain de glace pendant 30 min; les cellules dans lesquelles l'ADN de plasmide hybride est ainsi incorporé sont inoculées dans le milieu L et on agite le milieu à 37°C pendant 2 h; la réaction de transformation est ainsi terminée. On récolte les cellules, on les lave et on les remet en suspension. On étale une faible portion de la suspension de cellules sur une plaque de gélose contenant 2 g de glucose, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g de K_2HPO_4 , 2 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de citrate de sodium, $2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de S-(2-aminoéthyl)-cystéine, 20 γ /ml d'ampicilline et 20 g de gélose par litre (ajustée à pH 7,2). On fait incuber la plaque à 37°C pendant 3 jours.

On prélève les colonies apparaissant sur la plaque et on obtient des souches résistantes à la fois à l'ampicilline, à la S-(2-aminoéthyl)-cystéine et à l'éthionine.

On obtient les clones hybrides produisant la L-méthionine AJ 11539 (FERM-P 5479; NRRL B-12399), AJ 11540 (FERM-P 5480, NRRL B-12400), AJ 11541 (FERM-P 5481, NRRL B-12401) et AJ 11542 (FERM-P, NRRL N-12402) à partir des souches réceptrices n° 2, 30, 77 et 283, respectivement.

(5) Production de la L-méthionine par la nouvelle souche productrice de L-méthionine

Le tableau ci-après indique les résultats expérimentaux de la production par fermentation de L-méthionine en utilisant les nouvelles souches productrices de L-méthionine et la souche de donneur d'ADN EG-20.

Le milieu de fermentation contient 5 g/dl de glucose, 2,5 g/dl de sulfate d'ammonium, 0,2 g/dl de KH_2PO_4 , 0,1 g/dl de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/dl d'extrait de levure, 100 γ /dl de chlorhydrate de thiamine, 1 mg/dl de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/dl de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 2,5 g/dl de CaCO_3 (stérilisé séparément) et le pH est ajusté à 7,0.

On place des lots de 20 ml de milieu de fermentation, inoculés au moyen d'une boucle de platine avec l'inoculum du micro-organisme d'essai, et on effectue la culture à 31°C pendant 72 h.

La quantité de méthionine dans la liqueur surnageante du bouillon de fermentation est déterminée par dosage microbiologique.

TABLEAU

	Micro-organisme essayé	L-méthionine produite (mg/dl)
	EG-20	3
	AJ 11539	10
5	AJ 11540	25
	AJ 11541	18
	AJ 11542	30
	N° 2	2
	N° 30	4
10	N° 77	4
	N° 283	3

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

1. Procédé pour la production de L-méthionine par fermentation, caractérisé en ce que l'on cultive dans un milieu de culture un micro-organisme producteur de L-méthionine et on recueille
5 la L-méthionine accumulée dans le milieu de culture, ledit micro-organisme étant obtenu par incorporation, dans une souche réceptrice du genre Escherichia, d'un plasmide hybride dans lequel est inséré un fragment d'ADN portant l'information génétique relative à la production de L-méthionine, ledit fragment étant dérivé d'une souche
10 donneur du genre Escherichia qui est résistante à l'éthionine.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche réceptrice appartient au genre Escherichia coli.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche donneur appartient au genre Escherichia coli.
- 15 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche réceptrice est Escherichia coli K-12 ou un de ses mutants.
5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche donneur est Escherichia coli K-12 ou un de ses
20 mutants.
6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit plasmid hybride est dérivé de pBR 322.