



BE 1008008A3

ROYAUME DE BELGIQUE

# BREVE



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1008008A3

NUMERO DE DEPOT : 09101098

Classif. Internat. : C12M C12P

Date de délivrance le : 12 Décembre 1995

## Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété industrielle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 29 Novembre 1991 à 15H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

## ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : AJINOMOTO CO., INC.  
No. 15-1 Kyobashi 1-chome, Chuo-ku, TOKYO(JAPON)

représenté(e)(s) par : ADYNS Gilbert, OFFICE KIRKPATRICK S.A., Avenue Wolfers 32 -  
B 1310 LA HULPE.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE ET APPAREIL POUR REGLER LA CONCENTRATION EN SOURCE DE CARBONE DANS LA CULTURE AEROBIE D'UN MICRO-ORGANISME.

INVENTEUR(S) : Nakamura Takashi; Nakayama Tatsuya; Miwa Harufumi; Tsuruta Minoru, tous les quatre: c/o Technology & Engineering, Laboratories Ajinomoto Co., Inc., No. 1-1 Suzuki-cho, Kawasaki-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken (JP); Koyama Yosuke; Shimazaki Keishi; Tosaka Osamu, tous les trois: c/o Kyusyu Plant, Ajinomoto Co., Inc., No. 450 Ooaza Morotomitsu, Morotomi-cho, Saga-gun, Saga-ken (JP)

PRIORITE(S) 30.11.90 JP JPA 2339687 12.03.91 JP JPA 3126992 24.10.91 JP JPA 3277938

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 12 Décembre 1995  
PAR DELEGATION SPECIALE :

  
G. DE CUYPERE  
Secrétaire d'administration

Procédé et appareil pour régler la concentration en  
source de carbone dans la culture aérobie d'un  
micro-organisme.

ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION.

Domaine de l'invention.

5                   La présente invention concerne un procédé pour  
régler la concentration en source de carbone dans la culture  
aérobie d'un micro-organisme. En particulier, la présente  
invention concerne un procédé pour maintenir dans un  
récipient de culture la concentration en source de carbone,  
10 qui est le substrat, à une valeur faible pendant  
l'alimentation de cultures aérobies à marche discontinue,  
continue ou continue avec recyclage des cellules. Ceci est  
réalisé par surveillance de l'élévation du pH ou de  
l'augmentation de la concentration en oxygène dissous dans  
15 le milieu de culture et par apport de la solution  
d'alimentation de façon intermittente dans le récipient de  
culture à un débit d'apport calculé en utilisant un  
dispositif régulateur d'apport commandé par ordinateur.  
L'appareil propre à l'application d'un tel procédé fait  
20 aussi l'objet de l'invention.

La présente invention a aussi pour objet un  
procédé pour produire par fermentation la L-lysine qui est  
un acide aminé important utilisé comme additif dans les  
aliments de la volaille et des porcs du fait que la teneur  
25 en L-lysine est insuffisante dans les céréales alimentaires.

Arrière-plan de l'invention.

Des micro-organismes sont mis en culture aérobie  
aux fins de produire différentes substances par  
fermentation, par exemple divers acides aminés ou acides  
nucléiques au moyen de micro-organismes, ou de produire des  
30 cellules microbiennes, par exemple des cellules de levure.  
La culture aérobie d'un micro-organisme est exécutée à  
l'échelle industrielle par culture en marche discontinue,  
continue ou continue avec recyclage des cellules en

utilisant une ou plusieurs sources de carbone, par exemple du sucre, comme matière première principale.

Dans un tel procédé de culture, il est nécessaire de maintenir la concentration en source de carbone (substrat), par exemple en sucres, dans un récipient de culture à une valeur aussi faible que possible pendant l'alimentation de la culture. De cette façon, différents buts sont atteints, par exemple la prévention de l'inhibition du substrat par la source de carbone apportée, la réduction des pertes de source de carbone grâce à l'utilisation efficace de la matière première pour la culture, l'isolement aisé du produit hors du bouillon de fermentation final, et la prévention de la pollution de l'environnement par la source de carbone résiduel contenue dans le liquide usé subsistant après l'isolement du produit.

Dans le cas d'une culture continue ou continue avec recyclage des cellules, le produit est isolé du bouillon de culture qui est prélevé de façon ininterrompue même pendant l'alimentation du récipient de culture. Il est nécessaire de régler l'apport des sources de carbone, par exemple des sucres, pendant l'opération d'isolement à la valeur la plus faible possible pour rendre sensiblement nulle l'influence des sources de carbone sur les opérations d'isolement. Il est nécessaire aussi de prévenir les pertes de matières premières. Dans une culture de ce genre, il est souhaitable aussi de supprimer les opérations manuelles pour l'analyse de la concentration en source de carbone et de les remplacer par une surveillance automatique qui assure la stabilité de la concentration en source de carbone.

Pour maintenir la concentration de la source de carbone, par exemple de sucre, à des valeurs faibles pendant l'alimentation des cultures, des procédés qui ont déjà été décrits comprennent la régulation de la concentration de la source de carbone à l'aide d'un paramètre indépendant, comme la quantité d'oxygène consommé, la quantité de dioxyde de carbone dégagé en phase gazeuse, le pH, la quantité de sous-

produit formé ou la quantité d'ammoniac ajouté, ceci étant réalisé en ajoutant la source de carbone, par exemple le sucre, en une quantité définie en multipliant le paramètre par un coefficient de proportionnalité déterminé au préalable. Dans ces procédés, l'activité microbienne pendant la culture ne peut être mesurée avec une grande précision, de sorte que la concentration ne peut dans certains cas pas être réglée de façon satisfaisante si l'activité s'est modifiée anormalement. Pour ces raisons, il est impossible de régler efficacement la concentration en source de carbone à une valeur faible (par exemple au-dessous de 3 g par litre) pendant la culture.

En outre, dans un autre procédé connu, l'épuisement de la concentration de la source de carbone dans un récipient de culture est détecté pendant la culture d'après la seule concentration en oxygène dissous. Toutefois, la fiabilité de détection est faible. Lorsque l'état d'aération ou d'agitation se modifie (nombre de tours par minute de l'agitateur ou débit d'air), la concentration en oxygène dissous change fortement. Dans ce cas, le capteur détecte parfois inopportunément l'épuisement de la source de carbone, de sorte qu'il n'est pas possible de régler efficacement la concentration en source de carbone dans la culture. Pour ces raisons, ce procédé n'est pas non plus applicable.

Il existe donc de façon évidente un besoin pour un procédé et un appareil réglant automatiquement la concentration en source de carbone dans la culture aérobie des micro-organismes. La présente invention a pour objet un tel procédé et un tel appareil pour surmonter les inconvénients précités.

Suivant un autre aspect, la présente invention concerne un procédé pour produire la L-lysine par fermentation. On connaît déjà des descriptions de procédés comprenant la culture de micro-organismes capables de produire de la L-lysine en marche continue ou discontinue,

l'accumulation de la L-lysine dans le milieu et la collecte de la L-lysine produite.

Dans le cas d'une opération à marche discontinue, un milieu liquide contenant des sources de carbone et d'azote est introduit dans un fermenteur pour y conduire l'incubation en marche discontinue. En variante, un milieu contenant uniquement une ou plusieurs sources de carbone est ajouté de façon continue ou intermittente pour alimenter les cultures.

Dans le cas des opérations en marche continue, l'incubation est exécutée en admettant de façon continue le milieu dans un fermenteur et en prélevant le même volume de bouillon de culture de façon continue pour maintenir la quantité de cellules ou la concentration du produit, par exemple, à une valeur constante.

Lorsque la production de la L-lysine par fermentation est réalisée par le procédé classique à marche discontinue, l'accumulation du produit dans le bouillon de culture et les rendements sont élevés, mais il est difficile d'obtenir une productivité élevée. D'autre part, lorsque le procédé classique à marche continue est appliqué, la productivité est élevée, mais il est difficile d'obtenir une forte accumulation du produit ou un rendement élevé. Pour répondre à une demande croissante de L-lysine et pour la préparer à moindres frais, il est nécessaire d'augmenter la productivité de la L-lysine par fermentation et d'accroître la concentration et le rendement en produit accumulé.

Il existe donc un besoin pour un procédé de production de la L-lysine par fermentation qui atténue les inconvénients techniques antérieurs. La présente invention combine les avantages des opérations traditionnelles à marche discontinue et à marche continue en ayant pour objet un nouveau procédé pour produire la L-lysine par fermentation avec une productivité élevée, une forte concentration en produit accumulé et un haut rendement.

APERCU DE L'INVENTION.

Un but de l'invention est de procurer un procédé pour régler la concentration de la source de carbone dans la culture aérobie d'un micro-organisme, de même qu'un  
5 appareil pour la mise en pratique d'un tel procédé. Un autre but de la présente invention est de procurer un procédé perfectionné pour produire la L-lysine par fermentation.

Dans une forme de réalisation, la présente invention a pour objet un procédé pour la culture aérobie  
10 d'un micro-organisme dans des cultures à marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules, qui comprend l'apport intermittent d'une solution d'alimentation en source de carbone dans un récipient de culture sous régulation automatique par un ordinateur.

15 Dans une autre forme de réalisation, la présente invention a pour objet un appareil pour la culture aérobie d'un micro-organisme dans des cultures à marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules, qui comprend un récipient de culture équipé de capteurs pour la  
20 détection du pH et de la concentration en oxygène dissous d'un milieu de culture contenu dans le récipient de culture, respectivement, ainsi que d'un dispositif d'aération et d'agitation du milieu de culture, qui est conçu pour recevoir une solution d'alimentation, et de dispositifs de  
25 régulation pour régler le débit d'apport de la solution d'alimentation dans le récipient de culture, le dispositif de régulation comprenant un premier convertisseur de signaux pour recevoir les signaux respectifs émis par le capteur de pH et le capteur de concentration en oxygène dissous et  
30 émettre des signaux convertis, un dispositif de calcul pour recevoir les signaux convertis, calculer le débit d'apport à l'aide des signaux convertis et émettre un signal de débit d'apport; un deuxième convertisseur de signaux pour recevoir le signal de débit d'apport et émettre un signal de débit  
35 d'apport converti et un dispositif régulateur de débit d'apport pour régler le débit d'apport de la solution

d'alimentation au récipient de culture à l'aide du signal de débit d'apport converti.

Dans une autre forme de réalisation, la présente invention a pour objet un procédé pour produire la L-lysine par fermentation, qui comprend l'inoculation d'un micro-organisme capable de produire de la L-lysine dans un milieu liquide, la culture du micro-organisme tandis qu'on admet un supplément de milieu contenant tant des sources de carbone que des nutriments ayant pour effet d'accélérer la croissance après la phase de croissance logarithmique du micro-organisme de façon à maintenir les sources de carbone à une concentration n'excédant pas 5 g par litre dans le milieu de culture, et la collecte de la L-lysine produite et accumulée dans le milieu.

Divers autres buts et avantages de la présente invention ressortiront des dessins annexés et de la description ci-après de l'invention.

#### BREVE DESCRIPTION DES DESSINS.

La Fig. 1 illustre une forme de réalisation de l'appareil de la présente invention;

la Fig. 2 illustre l'appareil utilisé dans l'exemple 1;

la Fig. 3 illustre l'appareil utilisé dans l'exemple de comparaison 1;

la Fig. 4 illustre les conditions pour l'alimentation de la culture dans l'exemple 1; l'axe y porte la concentration en oxygène dissous  $[O_2]$  à la Fig. 4(a), le pH à la Fig. 4(b) et la concentration en sucre  $[Su]$  dans le fermenteur à la Fig. 4(c); l'axe x porte le temps t en valeurs croissantes aux Fig. 4(a), (b) et (c); l'épuisement du substrat se traduit par les maxima  $d[O_2]/dt$  et  $d\text{pH}/dt$  aux Fig. 4(a) et (b) et la première addition est notée I, la deuxième II et la troisième III;

la Fig. 5 illustre l'état de régulation de la concentration en sucre  $[Su]$  (axe y) au cours du temps t en heures (axe x) dans l'exemple 1; l'apport est représenté par

les rectangles, tandis que la concentration en sucre dans la fermenteur [Su<sub>f</sub>] passe par les résultats analytiques r.a. représentés par des croix;

la Fig. 6 illustre les conditions pour la culture dans l'exemple de comparaison 1; l'axe y porte la concentration en sucre [Su] et l'axe x porte le temps t en heures; la concentration en NH<sub>3</sub> est notée [NH<sub>3</sub>], la concentration en cellules est notée [Cel.], l'apport de NH<sub>3</sub> est noté NH<sub>3</sub> et la consommation du sucre est notée Su.

10 DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION.

La présente invention concerne, pour partie, un procédé pour la culture aérobie d'un micro-organisme dans des cultures à marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules, qui offre les avantages que la vitesse d'assimilation des sources de carbone, par exemple du sucre, par le micro-organisme pendant l'alimentation peut être réglée à un débit d'apport approprié de la solution d'alimentation des sources de carbone, que l'épuisement des sources de carbone peut être détecté avec une fiabilité et une certitude qui sont bonnes et que l'épuisement des sources de carbone peut être détecté sans être influencé par l'état d'aération ou d'agitation. Ce procédé offre aussi d'autres avantages.

La présente invention a aussi pour objet un appareil pour la mise en pratique du procédé ci-dessus.

A la suite d'études détaillées pour résoudre les difficultés envisagées ci-dessus dans la section "arrière-plan de l'invention", la Demanderesse a découvert que lorsque des sources de carbone, par exemple des sucres, sont admis de façon intermittente dans un récipient de culture pour une culture aérobie à marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules, le débit d'apport de la solution d'alimentation en source de carbone au moment de l'apport et du ou des apports ultérieurs peut être déterminé en utilisant comme paramètre l'élévation du pH ou l'augmentation de la concentration en oxygène dissous

résultant de l'épuisement des sources de carbone dans le milieu de culture que contient le récipient de culture. Le débit d'apport est surveillé et réglé par un ordinateur régissant la période entre la fin de la première addition  
5 et la période suivante d'addition sur la base de l'élévation du pH ou de l'augmentation de la concentration d'oxygène dissous dans la culture, ce qui résout les inconvénients des procédés connus.

La présente invention concerne donc, pour partie,  
10 un procédé de culture aérobie d'un micro-organisme dans lequel la première addition d'une solution d'alimentation en source de carbone dans une culture aérobie à marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules d'un micro-organisme se fait par apport  
15 intermittent de la solution d'alimentation dans le récipient de culture en admettant la solution d'alimentation de façon intermittente dans le récipient de culture et est réalisé par admission de la solution d'alimentation pendant une période définie à un débit d'apport déterminé au préalable.

20 La deuxième addition ou la ou les additions ultérieures sont commencées lorsqu'un ordinateur détecte une élévation du pH ou une augmentation de la concentration en oxygène dissous qui ont lieu lorsque la source de carbone (substrat) dans le récipient de culture est épuisée à la  
25 période d'arrêt de l'addition précédant une certaine période pour l'addition et elles sont effectuées par apport de la solution d'alimentation dans le récipient de culture pendant une période de temps définie à un débit d'apport calculé par l'ordinateur à partir du temps pour la période d'arrêt de  
30 l'addition et du débit d'apport de la solution d'alimentation dans la période d'addition précédant la période d'arrêt de l'addition de façon que le débit devienne plus petit lorsque le temps pour la période d'arrêt de l'addition est long et que le débit devienne plus grand  
35 lorsque le temps pour la période d'arrêt de l'addition est court.

Le procédé est caractérisé par la régulation automatique de la concentration du substrat à une valeur faible et constante dans un récipient de culture lors de la culture aérobie du micro-organisme.

5 Il est bien connu de mettre un micro-organisme en culture aérobie en marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules en admettant de façon continue (ici, le terme "de façon continue" est pris dans un sens large et signifie également "de façon intermittente") une  
10 solution d'alimentation contenant des sources de carbone par exemple des sucres, dans un récipient de culture aux fins de produire différentes substances par fermentation ou de produire les cellules elles-mêmes. La culture aérobie en marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des  
15 cellules dans la présente invention peut aussi être effectuée en modifiant les procédés bien connus de culture en marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules sauf pour ce qui est du procédé d'apport de la solution d'alimentation pendant l'alimentation de la culture  
20 tel qu'il est décrit ici.

La première addition de la solution d'alimentation pendant l'alimentation de la culture commence généralement lorsque la concentration de la ou des sources de carbone, par exemple des sucres, dans le milieu de  
25 culture atteint une certaine valeur faible dans une culture principale précédant la culture d'alimentation. Le débit d'apport déterminé au préalable de la solution d'alimentation est déterminé antérieurement par une expérience préliminaire et est généralement égal à la  
30 vitesse de consommation du substrat dans la culture principale au moment de commencer à alimenter la culture, à savoir au moment où la première addition commence. La période de temps définie dans l'addition de la solution d'alimentation est une période de temps facultative choisie  
35 dans un intervalle tel que l'activité d'un micro-organisme pour consommer la source de carbone, par exemple le sucre,

ne change pas beaucoup (en général dans l'intervalle de 10 minutes à 24 heures).

Lorsque le substrat contenu dans le milieu de culture est épuisé après l'achèvement de la première addition, le pH du milieu et la concentration en oxygène dissous s'élèvent. Lorsque cette montée est détectée par l'ordinateur au moyen du capteur de pH et du capteur de concentration d'oxygène dissous, l'ordinateur commande au dispositif de régulation du débit d'apport de la solution d'alimentation au récipient de culture de commencer la deuxième addition de la solution d'alimentation.

L'élévation du pH et l'augmentation de la concentration en oxygène dissous ne sont pas nécessairement simultanées. Lorsqu'il existe un délai entre cette élévation et cette augmentation, la deuxième addition est commencée sur la base de la détection antérieure de ces deux grandeurs. Le capteur de pH et le capteur de concentration en oxygène dissous sont à l'occasion défectueux et sont fréquemment calibrés. Par conséquent, ces capteurs ne sont pas utilisés seuls. L'utilisation simultanée de ces deux capteurs peut augmenter de façon remarquable la fiabilité de la détection de l'épuisement du substrat.

Le débit d'apport lors de la deuxième addition de la solution d'alimentation est un débit obtenu en calculant de façon que si la période pour arrêter l'addition est longue, le débit devient plus faible et, si la période est courte, le débit devient plus important. Ceci permet d'amener l'équilibre entre le débit d'apport du substrat et la vitesse de consommation de celui-ci, de façon à maintenir la concentration du substrat dans le milieu de culture que contient le récipient de culture à une valeur faible souhaitée, d'après la période d'arrêt de l'addition entre la première addition et la deuxième addition et d'après le débit d'alimentation lors de la première addition. Le calcul est réalisé par l'ordinateur, mais un programme pour l'ordinateur peut être écrit aisément par l'homme de métier.

Un exemple du programme est donné dans l'exemple 1 décrit ci-après.

La période de temps définie au cours de laquelle a lieu la deuxième addition est déterminée d'une manière semblable à la détermination de la période de temps définie pour la première addition. Il peut ne pas être nécessaire que la période pour la deuxième addition soit la même que pour la première addition à la condition que la période de temps soit choisie dans un intervalle tel que l'activité d'un micro-organisme pour consommer la source de carbone (substrat), par exemple un sucre, ne se modifie pas beaucoup. La période pour l'apport est choisie chaque fois dans la période de temps où l'activité d'un micro-organisme pour consommer le substrat ne se modifie pas beaucoup et où la concentration du substrat dans le récipient de culture peut être maintenue à une valeur faible pendant la culture.

Le moment du début, le débit d'apport et la durée pour la troisième addition et les suivantes de la solution d'alimentation sont déterminés comme pour la deuxième addition.

Par conséquent, la deuxième addition et les suivantes commencent lorsque l'ordinateur détecte l'élévation du pH ou l'augmentation de la concentration en oxygène dissous qui ont lieu lorsque la source de carbone (substrat) du récipient de culture est épuisée pendant la période d'arrêt de l'addition précédant une certaine période pour l'addition et elles sont effectuées pendant une certaine période de temps à un débit d'apport calculé par l'ordinateur de façon que si la période d'arrêt de l'addition est longue, le débit devient plus petit et que si la période est courte, le débit devient plus grand, sur la base de la période d'arrêt de l'addition et du débit d'apport de l'addition précédente.

Comme décrit ci-dessus, il est possible de définir le débit d'apport de la solution d'alimentation contenant la ou les sources de carbone, par exemple les

sucres, et les autres conditions d'addition en surveillant l'activité d'un micro-organisme d'un instant à l'autre. Il est possible aussi de régler aisément la concentration du substrat dans le récipient de culture à une valeur  
5 inférieure à 5 g par litre et même inférieure à 3 g par litre.

L'invention a aussi pour objet un appareil utilisé dans le procédé décrit ci-dessus et comprenant :  
(i) un récipient de culture équipé de capteurs pour détecter  
10 le pH et la concentration en oxygène dissous d'un milieu de culture contenu dans le récipient de culture, respectivement, et d'un dispositif d'aération et d'agitation, qui est conçu pour recevoir une solution d'alimentation à l'intervention d'un dispositif régulateur  
15 de débit, et (ii) un ordinateur équipé de deux convertisseurs de signaux où (a) le capteur de pH et le capteur de concentration en oxygène dissous sont connectés pour que les données de pH et de concentration en oxygène dissous détectées par les capteurs soient introduites dans  
20 l'ordinateur par un convertisseur de signaux, respectivement, et (b) le dispositif régulateur de débit est connecté afin que le débit d'apport de solution d'alimentation calculé par l'ordinateur soit transféré à ce dispositif régulateur par l'autre convertisseur de signaux.

25 L'appareil de la présente invention est un appareil qui exécute les deux fonctions que sont la détection de l'épuisement des sources de carbone ou substrat, par exemple de sucre, et le calcul du débit d'apport de la solution de source de carbone par  
30 l'ordinateur, sur la base des signaux transmis à l'ordinateur à partir du capteur de pH, par exemple l'électrode pH, et du capteur de concentration en oxygène dissous, par exemple l'électrode à oxygène dissous, qui sont montés dans le récipient de culture, et aussi de  
35 transmission du débit d'apport calculé au dispositif régulateur de débit de la solution d'alimentation monté sur

la conduite pour amener la source de carbone au récipient de culture.

Comme il est bien connu dans le métier, les capteurs de pH et capteurs d'oxygène dissous sont très souvent défaillants et doivent être calibrés fréquemment. Suivant l'invention, les capteurs respectifs ne sont pas utilisés seuls, mais sont exploités en combinaison, ce qui peut augmenter notablement la fiabilité de la détection de l'épuisement des sources de carbone, par exemple de sucre. Lorsque chaque capteur est utilisé isolément, les effets sont obtenus, mais la fiabilité diminue.

Dans une autre forme de réalisation, la présente invention concerne un procédé pour produire la L-lysine par fermentation à l'aide de bactéries produisant de la L-lysine. La présente invention a pour objet un procédé pour produire de la L-lysine qui combine les avantages de la fermentation en marche continue classique et de la fermentation en marche discontinue classique, qui sont une productivité élevée, des concentrations élevées en produit accumulé et des rendements élevés en L-lysine. La Demanderesse a découvert qu'en inoculant un micro-organisme capable de produire de la L-lysine dans un milieu liquide, en cultivant le micro-organisme tout en admettant un milieu d'alimentation contenant tant des sources de carbone que des nutriments ayant pour effet d'accélérer la croissance après la phase de croissance logarithmique des micro-organismes pour maintenir les sources de carbone à une concentration n'excédant pas 5 g par litre dans le bouillon de culture, et en collectant la L-lysine produite et accumulée dans le bouillon de culture, on réalise les perfectionnements précités dans la production de la L-lysine.

La présente invention a donc pour objet un procédé de production de la L-lysine par fermentation, qui comprend l'inoculation d'un micro-organisme capable de produire de la L-lysine dans un milieu de culture, la culture du micro-organisme tandis qu'on admet du milieu

d'alimentation contenant tant des sources de carbone que des nutriments ayant pour effet d'accélérer la croissance après la phase de croissance logarithmique des micro-organismes tout en maintenant la source de carbone à une concentration  
5 n'excédant pas 5 g par litre dans le bouillon de culture, et la collecte de la L-lysine produite et accumulée dans le bouillon.

Aucune limitation particulière n'est imposée aux micro-organismes capables de produire de la L-lysine dans  
10 le procédé de la présente invention, sauf que les micro-organismes doivent être capables de produire de la L-lysine. Des exemples de ces micro-organismes sont notamment ceux appartenant au genre Brevibacterium ou Corynebacterium qui ont les propriétés nécessaires pour leur conférer la  
15 productivité de la L-lysine (auxotrophie de l'homosérine, résistance à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine, résistance à l' $\alpha$ -chlorocaprolactame, etc.). Plus spécifiquement, des exemples de ces micro-organismes sont Brevibacterium lactofermentum ATCC 21800, Brevibacterium flavum ATCC 21475  
20 et Corynebacterium acetaglutamicum ATCC 21491.

Aucune limitation particulière n'est imposée au milieu liquide, mais un milieu liquide complet traditionnel contenant des sources de nutriments organiques et inorganiques, comme une source de carbone, une source  
25 d'azote et d'autres oligonutriments, peut être utilisé.

Comme sources de carbone pour l'alimentation dans le procédé de la présente invention, il est possible d'utiliser des sucres, des acides organiques, des alcools et d'autres composés organiques quelconques d'usage général  
30 comme matière première (sources de carbone) pour la fermentation, à la condition que les bactéries précitées productrices de L-lysine puissent assimiler les sources de carbone.

Par nutriment ayant pour effet d'accélérer la  
35 croissance, on entend un acide aminé, une vitamine et une matière naturelle contenant ces composés qui sont efficaces

pour accélérer la croissance des bactéries produisant de la L-lysine. Des exemples spécifiques en sont l'hydrolysate de protéines de soya, l'extrait de levure et la liqueur de macération de maïs.

5           Comme il est connu dans le métier, le milieu ajouté contient généralement des sources de carbone seulement et est complété dans le milieu liquide dans le procédé continu. Dans le procédé de la présente invention, le milieu ajouté contient tant les sources de carbone que  
10 les nutriments qui ont pour effet d'accélérer la croissance. L'utilisation de ce milieu est l'une des caractéristiques du procédé de la présente invention.

          Dans le procédé de la présente invention, le milieu est admis pendant la croissance logarithmique du  
15 micro-organisme ou après l'achèvement de celle-ci. L'admission avant la fin de la croissance logarithmique doit être évitée parce que la croissance initiale des bactéries pourrait s'en trouver inhibée.

          Pour admettre le milieu pendant la croissance  
20 logarithmique ou après la fin de celle-ci, l'apport peut être effectué en marche continue ou intermittente. De surcroît, lorsqu'il est à prévoir que le volume de milieu dans un fermenteur excédera le volume tolérable chargé dans le fermenteur, une fraction du bouillon de culture est  
25 prélevée du fermenteur au préalable ou au moment où le volume atteint le volume toléré, de façon que l'apport puisse être poursuivi.

          Par conséquent, il est important pour l'addition du milieu que celui-ci soit débité de façon à maintenir la  
30 concentration des sources de carbone dans le bouillon de culture toujours à une valeur n'excédant pas 5 g par litre. Ceci est l'une des caractéristiques de la présente invention. Pour maintenir la concentration des sources de carbone à la valeur constante, le bouillon de culture peut  
35 être soumis à un échantillonnage occasionnel pour l'analyse directe de la concentration des sources de carbone. En

variante, le pH ou la concentration en oxygène dissous peuvent être mesurés et, d'après leur évolution, l'insuffisance de la source de carbone peut être détectée pour régler l'apport de milieu. Sauf si la concentration de  
5 la source de carbone est maintenue de façon constante à 5 g par litre sinon moins, la croissance des bactéries ou la vitesse de formation de la L-lysine diminue et le but de la présente invention n'est pas atteint dans un tel cas.

Les caractéristiques de la présente invention  
10 sont celles décrites ci-dessus et aucune restriction particulière n'est imposée aux autres conditions, par exemple la fermentation. Par exemple, la température pour la production de la L-lysine par fermentation conformément à l'invention peut être toute température à laquelle les  
15 bactéries produisant de la L-lysine qui sont utilisées peuvent croître et se situe généralement dans l'intervalle de 25 à 45°C, de préférence de 30 à 40°C. Le pH prévu pour la fermentation se situe généralement dans l'intervalle de 5,8 à 8,5, de préférence de 6,5 à 7,5. Pour l'ajustement du  
20 pH, des substances inorganiques ou organiques acides ou alcalines, outre l'urée, le carbonate de calcium et l'ammoniac gazeux, par exemple, conviennent.

Pour ce qui est du fermenteur utilisé dans la présente invention, toute forme convient, à la condition que  
25 le fermenteur soit d'usage classique pour la fermentation des acides aminés. Par exemple, il peut être fait usage d'une cuve de mélange complète équipée d'une turbine ou d'un fermenteur du type à ascendance d'air.

Lorsque l'incubation est terminée, la L-lysine  
30 peut être isolée du bouillon de fermentation de façon classique, par exemple au moyen d'une résine échangeuse d'ions, par cristallisation ou par d'autres procédés et leurs combinaisons.

Les exemples suivants sont donnés pour illustrer  
35 davantage l'invention sans la limiter.

### EXEMPLES.-

Dans les exemples 1 à 5, l'appareil utilisé est celui représenté à la Fig. 2 comprenant un fermenteur en verre de petites dimensions 8, une électrode de pH 9, une électrode à oxygène dissous 10, un ordinateur personnel 11, un convertisseur analogique/numérique (A/D) 12, un convertisseur numérique/analogique (D/A) 13 et une pompe d'alimentation 14 correspondant dans l'appareil représenté à la Fig. 1 au récipient de culture 1 (fermenteur), au capteur de pH 2, au capteur de concentration en oxygène dissous 3, à l'ordinateur 4, au convertisseur de signaux 5 (i) dans cet ordinateur, au convertisseur de signaux 6 (ii) dans cet ordinateur et au dispositif régulateur de débit 7, respectivement. Dans les Fig. 1 à 3, 15 désigne un dispositif d'aération et d'agitation pour aérer et agiter le milieu de culture, comprenant un moteur M. 16 désigne le signal pour imposer le débit d'apport. 17 désigne la solution d'alimentation qui entre dans la pompe d'alimentation 14 ou le dispositif régulateur de débit 7.

### EXEMPLE 1.-

#### Production de l'acide L-glutamique par fermentation en culture à marche continue avec recyclage des cellules.

On introduit 30 ml d'un milieu aqueux contenant 30 g par litre de glucose, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g par litre de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4 g par litre d'urée, 20 mg par litre de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg par litre de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5 ml par litre d'hydrolysate acide de protéines de soya et 300  $\mu\text{g}$  par litre de biotine dans un flacon à secouer d'un volume de 500 ml, puis on les stérilise par 10 minutes de chauffage à 115°C. Après refroidissement jusqu'à la température ambiante, on inocule Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 dans le milieu, puis on le met en culture à 30°C pendant 24 heures.

On introduit le milieu pour la culture d'ensemencement, puis 270 ml d'un milieu aqueux pour la culture principale contenant 80 g par litre de mélasse de

canne comme sucre, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 10 ml par litre d'hydrolysate acide de protéines de soya dans un petit fermenteur en verre d'un volume de 1 litre qui a été préalablement stérilisé, puis on maintient le mélange à 30°C. On fait barboter de l'air stérilisé par filtration au débit de 300 ml par minute et on commence l'agitation tout en maintenant le pH à 7,5 avec du  $\text{NH}_3$  gazeux (amorçage de la culture principale).

On connecte le petit fermenteur en verre à un ordinateur personnel à 16 bits, comme le montre la Fig. 2. Les signaux analogiques du pH et de la concentration en oxygène dissous détectés par l'électrode de pH et l'électrode de concentration en oxygène dissous, qui ont été insérées dans le fermenteur, sont transmis à l'ordinateur personnel par le convertisseur analogique-numérique incorporé à ce dernier. Le débit d'apport du milieu aqueux d'alimentation (solution d'alimentation) prévu et calculé par l'ordinateur personnel est transmis à une pompe d'alimentation sous la forme de signaux analogiques à l'intervention du convertisseur numérique-analogique incorporé à l'ordinateur personnel.

Simultanément, lorsque la culture principale commence, les conditions suivantes sont communiquées à l'ordinateur personnel : débit d'apport de la solution d'alimentation ajoutée initialement (première addition) 30 ml par heure; données détectées à propos de l'épuisement du substrat de sucre par une élévation du pH à 7,7; données détectées à propos de l'épuisement du substrat de sucre par une augmentation en oxygène dissous à 20% (la valeur ordinaire de la concentration en oxygène dissous est de 1 à 10%) et temps d'addition de la solution d'alimentation 3 heures.

Aux fins d'inhiber la croissance des bactéries et de produire ainsi de l'acide glutamique, on ajoute du monopalmitate de polyoxyéthylènesorbitan à une concentration de 0,2% en poids 5 heures après l'amorçage de la culture

principale. Après poursuite de la culture principale pendant encore 5 heures, on met l'ordinateur personnel en service de régulation (état de fonctionnement automatique) et on commence la première addition de solution d'alimentation au

5 débit d'admission déterminé au préalable de 30 ml par heure. La solution d'alimentation admise dans le fermenteur contient 180 g par litre de mélasse de canne comme sucre, 5 ml par litre d'hydrolysate acide de protéines de soya et 0,2% en poids de monopalmitate de polyoxyéthylènesorbitane.

10 Simultanément, on fait passer le milieu de culture à travers un microfiltre à membrane plate, qui a été préalablement stérilisé, en une quantité de (débit d'apport de la solution d'alimentation plus 20) ml par heure pour fractionner en 20 ml la solution contenant les cellules et

15 le filtrat. On renvoie la solution contenant les cellules au fermenteur. On isole l'acide L-glutamique du filtrat exempt de cellules par cristallisation.

Après le début de la première addition de la solution d'alimentation, l'ordinateur commence à fonctionner

20 automatiquement et au moment où le temps déterminé au préalable (3 heures) pour l'apport de la solution d'alimentation s'est écoulé, l'apport de la solution d'alimentation est interrompu automatiquement suivant les conditions indiquées. Au moment où l'addition est

25 interrompue, la concentration en sucre dans le fermenteur baisse comme le montre la courbe A à la Fig. 4 et tombe sensiblement à 0 g par litre. A ce moment, le pH et la concentration en oxygène dissous s'élèvent à peu près simultanément.

30 Au moment où soit le pH, soit la concentration en oxygène dissous atteint le premier niveau de détection de l'épuisement du substrat, l'ordinateur calcule et affiche immédiatement le débit d'apport de la solution d'alimentation pour la deuxième addition. La valeur

35 déterminée est transmise à la pompe d'alimentation. A nouveau, la solution d'alimentation est admise pendant

3 heures au débit déterminé. Ensuite, par répétition de cette opération, la concentration en sucre dans le fermenteur est maintenue avec une bonne précision entre 0 et 2 g par litre.

5           Le débit d'apport de la solution d'alimentation lors des additions succédant à la deuxième est déterminé à l'aide de la règle suivante, sur la base de la période de temps ( $\tau$ ) où l'addition de la solution d'alimentation est arrêtée et du débit d'apport ( $v$ ) immédiatement avant que  
10 l'addition de la solution d'alimentation soit arrêtée.

\* Si  $\tau \leq 10$  minutes, prévision du débit d'apport d'une solution d'alimentation fraîche à  $1,1 v$ . En l'occurrence,  $v$  désigne le débit d'apport à la période pour l'addition immédiatement précédente.

15           \* Si  $10 \text{ minutes} < \tau \leq 30 \text{ minutes}$ , prévision d'un nouveau débit à  $v$ .

\* Si  $30 \text{ minutes} < \tau \leq 1 \text{ heure}$ , prévision d'un nouveau débit à  $0,9 v$ .

20           \* Si  $1 \text{ heure} < \tau \leq 2 \text{ heures}$ , prévision d'un nouveau débit à  $0,8 v$ .

En l'occurrence, les coefficients  $v$  et  $\tau$  varient parfois avec les conditions de culture, comme le type de culture, la nature du substrat, les propriétés des bactéries utilisées et ainsi de suite. Le nombre de règles à  
25 considérer peut être augmenté ou diminué de façon appropriée. A titre d'information, il a été confirmé pour la culture dans le présent exemple, par des expériences préalables, qu'il n'y a pas de probabilité de satisfaire à la condition  $\tau > 2$  heures. En outre, la période de temps  
30 pour l'addition de la solution d'alimentation est prévue comme étant de 3 heures chaque fois dans le présent exemple, mais, comme décrit ci-dessus, il n'est pas nécessaire de maintenir constante la durée d'addition à la condition que cette durée se situe dans un intervalle tel que l'activité  
35 des bactéries ne change pas beaucoup.

En poursuivant la culture pendant 80 heures, on

obtient 132 g d'acide L-glutamique. Après le début du fonctionnement automatique, la concentration en sucre peut être réglée de manière stable à 2 g par litre de façon tout à fait automatique, comme le montre la Fig. 5.

5 EXEMPLE DE COMPARAISON 1 (Etat connu).

L'état connu de la technique est caractérisé par l'utilisation de  $\text{NH}_3$  pour la régulation du pH et par l'apport de sucre (solution d'alimentation) en proportion de la quantité de  $\text{NH}_3$  consommée.

10 On introduit du milieu de la culture d'ensemencement obtenu comme dans l'exemple 1 et 270 ml du même milieu pour la culture principale que dans l'exemple 1 dans un petit fermenteur en verre d'un volume de 1 litre qui a été préalablement stérilisé. On maintient le mélange à  
15 30°C et on y fait barboter de l'air stérilisé par filtration au débit de 300 ml par minute. On commence l'agitation en maintenant le pH à 7,5 avec du  $\text{NH}_3$  gazeux (amorçage de la culture principale).

On connecte le petit fermenteur en verre à un  
20 ordinateur personnel à 16 bits, comme le montre la Fig. 3.

On ajoute du monopalmitate de polyoxyéthylène-sorbitan à la concentration de 0,2% en poids 5 heures après l'amorçage de la culture principale. Après poursuite de la culture principale pendant encore 5 heures, on met  
25 l'ordinateur personnel en régime de régulation.

Les signaux analogiques sont transmis à l'ordinateur personnel au départ d'un débitmètre massique raccordé à la conduite de  $\text{NH}_3$  gazeux, à l'intervention du convertisseur analogique-numérique incorporé à l'ordinateur  
30 personnel. Après que le débit d'apport de la solution d'alimentation en quantité proportionnelle à la quantité de  $\text{NH}_3$  ajoutée a été calculé sur base horaire, on programme l'ordinateur pour transmettre le débit d'alimentation sous forme de signaux analogiques à la pompe d'alimentation à  
35 l'intervention du convertisseur numérique-analogique incorporé à l'ordinateur personnel.

La Fig. 6A illustre les résultats en montrant le rapport du débit d'apport de  $\text{NH}_3$  au débit d'apport de la solution d'alimentation pendant la culture qui est passée de la phase de croissance des cellules à la phase de production de l'acide L-glutamique, où la régulation de la teneur en sucre devient médiocre. Par conséquent, le coefficient de proportionnalité est modifié 13 heures plus tard. Même après cette modification, le coefficient de proportionnalité reste instable, de sorte que la régulation de la concentration en sucre dans le fermenteur n'est pas aussi bonne que dans le cas de la Fig. 5. Par conséquent, la concentration du sucre résiduel (concentration du sucre dans le fermenteur) est vérifiée à cinq reprises. A la suite de cette instabilité, il est impossible d'abaisser la concentration en sucre résiduel à une valeur très basse pendant la culture pour éviter que la concentration en sucre soit de 0 g par litre.

En poursuivant la culture pendant 80 heures, on obtient 120 g d'acide L-glutamique, mais cette quantité est inférieure aux 132 g produits dans l'exemple 1.

Les résultats de l'exemple 1 et de l'exemple de comparaison 1 sont résumés au tableau I.

TABLEAU I

|    | Grandeurs comparées                                                                                          | Exemple de comparaison 1 (état connu) | Exemple 1 (invention) |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 5  | Concentration en sucre réglable pendant la culture (g/l)                                                     | 5 - 20                                | 0 - 2                 |
|    | Temps de culture (h)                                                                                         | 80                                    | 80                    |
|    | Nombre de surveillances de la concentration du sucre résiduel                                                | 5                                     | 0                     |
| 10 | Temps pour l'ajustement manuel de la vitesse de consommation du sucre au débit d'apport du $\text{NH}_3$ (h) | 5                                     | 0                     |
| 15 | Quantité de sucre sortant du système (g)                                                                     | 28,5                                  | 0,1                   |
|    | Quantité d'acide glutamique produit (g)                                                                      | 120                                   | 132                   |

EXEMPLE 2.-

20 Production de la L-phénylalanine par fermentation en culture à marche discontinue.

On produit de la L-phénylalanine par fermentation avec Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1071 comme dans l'exemple 1, mais en passant de la culture continue avec recyclage des cellules à la culture en marche discontinue.

25 Le milieu, le récipient de culture, le mode de détermination du temps de culture et le procédé de régulation du débit d'apport de la solution d'alimentation sont modifiés comme indiqué ci-après.

(1) Milieu.

## (a) Milieu pour la culture d'ensemencement.

|    |                          |                   |
|----|--------------------------|-------------------|
|    | Saccharose               | 2,0 g/dl          |
|    | Acide phosphorique       | 0,1 "             |
| 5  | MgSO <sub>4</sub>        | 40 mg/dl          |
|    | FeSO <sub>4</sub>        | 1 "               |
|    | MnSO <sub>4</sub>        | 1 "               |
|    | Urée                     | 0,3 g/dl          |
|    | Acétate d'ammonium       | 0,2 "             |
| 10 | Tyrosine                 | 50 mg/dl          |
|    | KOH                      | 70 "              |
|    | Hydrolysate de protéines |                   |
|    | (en azote total)         | 200 "             |
|    | Biotine                  | 100 µg/l          |
| 15 | Vitamine B <sub>1</sub>  | 100 "             |
|    | Silicone antimousse      | 20 "              |
|    | pH                       | 7,5               |
|    | Stérilisation            | 120°C, 20 minutes |

## (b) Milieu pour la culture principale.

|    |                          |                   |
|----|--------------------------|-------------------|
| 20 | Glucose                  | 15 g/dl           |
|    | MgSO <sub>4</sub>        | 28 mg/dl          |
|    | MnSO <sub>4</sub>        | 1 "               |
|    | Acide phosphorique       | 90 "              |
|    | Biotine                  | 50 µg/dl          |
| 25 | Vitamine B <sub>1</sub>  | 2 "               |
|    | Hydrolysate de protéines |                   |
|    | (en azote total)         | 870 mg/dl         |
|    | Tyrosine                 | 100 "             |
|    | KOH                      | 70 "              |
| 30 | Silicone antimousse      | 2 µg/l            |
|    | pH                       | 7,5               |
|    | Stérilisation            | 120°C, 20 minutes |

(c) Milieu d'alimentation.

Le même que le milieu principal, mais avec 25 g de glucose par dl.

(2) Réceptient de culture et mode de culture.

5 (a) Culture d'ensemencement. Après introduction de 30 ml de milieu pour la culture d'ensemencement dans un ballon de 500 ml, on exécute la culture à 30°C avec secouage.

10 (b) Culture principale. Après introduction de 30 ml de bouillon de la culture d'ensemencement et de 270 ml de milieu pour la culture principale dans un petit fermenteur en verre d'un volume de 1 litre, on exécute la culture aérobie à 30°C (quantité d'air de 150 ml par minute). Le pH est ajusté à 7,5 avec  $\text{NH}_3$ .

15 (3) Temps de culture.

(a) Culture d'ensemencement : 48 heures.

(b) Culture principale : 96 heures.

(c) Temps écoulé jusqu'à début d'alimentation : 35 heures après le début de la culture principale.

20 (4) Procédé pour régler le débit d'apport de la solution d'alimentation.

Le débit d'apport est réglé comme dans l'exemple 1, sauf que le débit d'apport initial est ajusté à 10 ml par heure.

25 EXEMPLE DE COMPARAISON 2 (Etat connu).

En utilisant  $\text{NH}_3$ , on ajuste le pH et on règle le débit d'apport de la solution d'alimentation en prenant le pH comme paramètre. En d'autres termes, lorsque le pH excède la valeur prévue, on augmente le débit d'apport de 5% et  
30 lorsque aucune élévation de pH n'est observée pendant 5 heures, on diminue le débit d'apport de 10%.

Les résultats de l'exemple 2 et de l'exemple de comparaison 2 sont résumés au tableau II.

TABLEAU II

| Grandeurs comparées                                   | Exemple de comparaison 2 | Exemple 2 |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
| Concentration en sucre réglable dans la culture (g/l) | 10 - 30                  | 0 - 3     |
| 5 Temps de culture (h)                                | 96                       | 96        |
| Quantité de sucre sortant du système (g)              | 10,5                     | < 0,2     |
| Quantité de phénylalanine produite (g)                | 13                       | 15,5      |

10 EXEMPLE 3.-

Production de cellules de levure par culture en marche discontinue.

On produit des cellules de levure par fermentation de Saccharomyces cerevisiae CBS 1523 d'une  
 15 manière semblable à celle de l'exemple 1, mais en passant de la culture en marche continue avec recyclage des cellules à la culture en marche discontinue.

Le milieu, le récipient de culture, le mode de culture et le procédé de régulation du débit d'apport de la  
 20 solution d'alimentation sont aussi modifiés comme indiqué ci-après.

## (a) Milieu pour la culture d'ensemencement.

|    |                                              |                   |
|----|----------------------------------------------|-------------------|
|    | Glucose                                      | 3 g/dl            |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>              | 0,1 "             |
|    | Sulfate d'ammonium                           | 0,5 "             |
| 5  | MgSO <sub>4</sub>                            | 0,05 "            |
|    | Hydrolysate de protéines<br>(en azote total) | 0,1 "             |
|    | Extrait de levure                            | 0,1 "             |
|    | pH                                           | 6,5               |
| 10 | Stérilisation                                | 120°C, 15 minutes |

## (b) Milieu pour la culture principale.

|    |                                 |                   |
|----|---------------------------------|-------------------|
|    | Glucose                         | 5 g/dl            |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,1 "             |
|    | Sulfate d'ammonium              | 1,0 "             |
| 15 | MgSO <sub>4</sub>               | 0,05 "            |
|    | Liqueur de macération de maïs   | 0,2 "             |
|    | pH                              | 6,5               |
|    | Stérilisation                   | 120°C, 15 minutes |

## (c) Milieu d'alimentation.

- 20 Le même que le milieu principal, mais contenant 50 g de glucose par dl et 5 g de sulfate d'ammonium par dl.

(2) Réceptacle de culture et mode de culture.

- 25 (a) Culture d'ensemencement. Après introduction de 30 ml du milieu pour la culture d'ensemencement dans un ballon d'un volume de 500 ml, on exécute la culture à 30°C pendant 24 heures avec secouage.

- 30 (b) Culture principale. Après introduction de 30 ml de bouillon de la culture d'ensemencement et de 270 ml du milieu pour la culture principale dans un petit fermenteur en verre d'un volume de 1 litre, on exécute la culture aérobie à 30°C pendant 10 heures (quantité d'air de

150 ml par minute). On ajuste le pH à 6,5 avec  $\text{NH}_3$ . De surcroît, on commence l'addition de la solution d'alimentation (milieu) 10 heures après le début de la culture principale.

5 (3) Procédé de régulation du débit d'apport de la solution d'alimentation.

On règle le débit d'apport d'une façon semblable à celle de l'exemple 1, mais en ajustant le débit d'apport initial à 5 ml par heure.

10 EXEMPLE DE COMPARAISON 3 (Etat connu).

On règle le débit d'apport de la solution d'alimentation en prenant comme paramètre la vitesse de formation de l'éthanol qui est le sous-produit (mesure de l'éthanol en phase gazeuse dans les gaz usés). En l'occurrence, lorsque la vitesse de formation de l'éthanol augmente au-delà de la valeur prévue, on augmente le débit d'apport et lorsque la vitesse baisse au-dessous de la valeur prévue, on augmente le débit d'apport.

Les résultats de l'exemple 3 et de l'exemple de comparaison 3 sont résumés au tableau III.

TABLEAU III

| Grandeurs comparées                                   | Exemple de comparaison 3 | Exemple 3 |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
| Concentration en sucre réglable dans la culture (g/l) | 5 - 20                   | 0 - 3     |
| 25 Temps de culture (h)                               | 50                       | 50        |
| Quantité d'éthanol formé (g)                          | 5 - 10                   | 0 - 5     |
| Poids sec de cellules de levure (g)                   | 39                       | 48        |

EXEMPLE 4.-Production de L-thréonine par fermentation en culture à marche discontinue.

On produit de la L-thréonine par fermentation  
 5 avec Brevibacterium flavum FERM BP-1173 d'une façon  
 semblable à celle de l'exemple 1, mais en passant de la  
 culture en marche continue avec recyclage des cellules à la  
 culture en marche discontinue.

Le milieu, le récipient de culture, le mode de  
 10 culture, le temps de culture et le procédé de régulation du  
 débit d'apport de la solution d'alimentation sont modifiés  
 de la façon suivante.

(1) Milieu.

## (a) Milieu pour la culture d'ensemencement.

|    |                                 |                   |
|----|---------------------------------|-------------------|
| 15 | Glucose                         | 2,0 g/dl          |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,1 "             |
|    | MgSO <sub>4</sub>               | 40 mg/dl          |
|    | FeSO <sub>4</sub>               | 1 "               |
|    | MnSO <sub>4</sub>               | 1 "               |
| 20 | Urée                            | 0,3 g/dl          |
|    | Acétate d'ammonium              | 0,2 "             |
|    | Hydrolysate de protéines        |                   |
|    | (en azote total)                | 200 mg/dl         |
|    | Biotine                         | 100 µg/l          |
| 25 | Vitamine B                      | 100 "             |
|    | Silicone antimousse             | 20 "              |
|    | pH                              | 7,5               |
|    | Stérilisation                   | 120°C, 20 minutes |

## (b) Milieu pour la culture principale.

|    |                    |          |
|----|--------------------|----------|
| 30 | Glucose            | 5 g/dl   |
|    | MgSO <sub>4</sub>  | 40 mg/dl |
|    | MnSO <sub>4</sub>  | 1 "      |
|    | Acide phosphorique | 200 "    |

|   |                                              |                   |
|---|----------------------------------------------|-------------------|
|   | Biotine                                      | 50 µg/l           |
|   | Vitamine B                                   | 5 mg/l            |
|   | Hydrolysate de protéines<br>(en azote total) | 100 mg/dl         |
| 5 | KOH                                          | 150 "             |
|   | Silicone antimousse                          | 2 µg/l            |
|   | pH                                           | 7,5               |
|   | Stérilisation                                | 120°C, 20 minutes |

## (c) Milieu d'alimentation.

10 50 g de solution aqueuse acide acétique par dl.

(2) Réceptacle de culture et mode de culture.

(a) Culture d'ensemencement. Après introduction de 30 ml de milieu pour la culture d'ensemencement dans un ballon d'un volume de 500 ml, on exécute la culture à 30°C  
15 avec secouage.

(b) Culture principale. Après introduction de 30 ml de bouillon de la culture d'ensemencement et de 270 ml de milieu pour la culture principale dans un petit fermenteur en verre d'un volume de 1 litre, on exécute la  
20 culture aérobie à 30°C (quantité d'air de 150 ml par minute). On ajuste le pH à 7,5 avec NH<sub>3</sub>.

(3) Temps de culture.

(a) Culture d'ensemencement : 40 heures.  
(b) Culture principale : 100 heures.  
25 (c) Temps jusqu'à début d'alimentation :  
20 heures après le début de la culture principale.

(4) Procédé de régulation du débit d'apport de la solution d'alimentation.

On règle le débit d'apport d'une façon semblable  
30 à celle de l'exemple 1, mais en ajustant le débit d'apport initial à 1,5 ml par heure.

EXEMPLE DE COMPARAISON 4 (Etat connu).

On règle le débit d'apport de la solution d'alimentation en prenant le pH comme paramètre. En d'autres termes, lorsque le pH s'élève au-delà de la valeur prévue, on ajoute la solution d'alimentation à temps constant au débit d'apport de 0,5 ml par minute en utilisant une horloge marche-arrêt.

Les résultats de l'exemple 4 et de l'exemple de comparaison 4 sont résumés au tableau IV.

10

TABLEAU IV

| Grandeurs comparées                                            | Exemple de comparaison 4 | Exemple 4 |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
| Concentration en acide acétique réglable dans la culture (g/l) | 10 - 30                  | 0 - 3     |
| Temps de culture (h)                                           | 100                      | 100       |
| Quantité d'acide acétique sortant du système (g)               | 5,2                      | < 0,2     |
| Quantité de L-thréonine produite (g)                           | 7,8                      | 8,8       |

15

EXEMPLE 5.-

20 Production de guanosine par fermentation en culture à marche discontinue.

On produit de la guanosine par fermentation de Bacillus subtilis FERM BP-3601 d'une façon semblable à celle de l'exemple 1, mais en passant de la culture en marche continue avec recyclage des cellules à la culture en marche discontinue.

Le milieu, le récipient de culture, le mode de culture, le temps de culture et le procédé de régulation du débit d'apport de la solution d'alimentation sont modifiés de la façon suivante.

30

(1) Milieu.

## (a) Milieu pour la culture d'ensemencement.

|    |                                              |                   |
|----|----------------------------------------------|-------------------|
|    | Glucose                                      | 3,0 g/dl          |
|    | Acide phosphorique                           | 0,04 "            |
| 5  | MgSO <sub>4</sub>                            | 40 mg/dl          |
|    | FeSO <sub>4</sub>                            | 1 "               |
|    | MnSO <sub>4</sub>                            | 1 "               |
|    | ARN                                          | 0,5 g/dl          |
|    | Chlorure d'ammonium                          | 0,3 "             |
| 10 | Extrait de levure                            | 50 mg/dl          |
|    | KOH                                          | 70 "              |
|    | Hydrolysate de protéines<br>(en azote total) | 200 "             |
|    | Silicone antimousse                          | 20 "              |
| 15 | pH                                           | 6,5               |
|    | Stérilisation                                | 120°C, 20 minutes |

## (b) Milieu pour la culture principale.

|    |                                              |                   |
|----|----------------------------------------------|-------------------|
|    | Glucose                                      | 20 g/dl           |
|    | MgSO <sub>4</sub>                            | 15 mg/dl          |
| 20 | MnSO <sub>4</sub>                            | 1 "               |
|    | Acide phosphorique                           | 90 "              |
|    | Chlorure d'ammonium                          | 0,5 g/dl          |
|    | Chlorure de potassium                        | 1,5 "             |
|    | Hydrolysate de protéines<br>(en azote total) | 150 mg/dl         |
| 25 | ARN                                          | 0,125 g/dl        |
|    | DL-Méthionine                                | 50 mg/dl          |
|    | KOH                                          | 60 "              |
|    | Silicone antimousse                          | 2 µg/l            |
| 30 | pH                                           | 0,5               |
|    | Stérilisation                                | 120°C, 20 minutes |

## (c) Milieu d'alimentation.

Solution aqueuse de glucose à 0,50 g par dl.

(2) Réceptient de culture et mode de culture.

5 (a) Culture d'ensemencement. Après introduction de 30 ml de milieu de la culture d'ensemencement dans un ballon d'un volume de 500 ml, on exécute la culture à 30°C avec secouage.

10 (b) Culture principale. Après introduction de 30 ml de bouillon de la culture d'ensemencement et de 270 ml de milieu pour la culture principale dans un petit fermenteur en verre d'un volume de 1 litre, on exécute la culture aérobie à 30°C (quantité d'air de 200 ml par minute). On ajuste le pH à 6,5 avec  $\text{NH}_3$ .

(3) Temps de culture.

- 15 (a) Culture d'ensemencement : 30 heures.  
(b) Culture principale : 150 heures.  
(c) Temps jusqu'à début d'alimentation : 50 heures après le début de la culture principale.

(4) Procédé de régulation du débit d'apport de la solution d'alimentation.

20 On règle le débit d'apport d'une façon semblable à celle de l'exemple 1, mais le débit d'apport initial est ajusté à 1 ml par heure.

EXEMPLE DE COMPARAISON 5 (Etat connu).

25 En utilisant du  $\text{NH}_3$ , on ajuste le pH et on règle le débit d'apport de la solution d'alimentation en prenant le pH comme paramètre. En l'occurrence, lorsque le pH s'élève au-delà de la valeur prévue, on augmente le débit d'apport de 5% et lorsque l'élévation du pH n'est pas  
30 observée pendant 5 heures, on diminue le débit d'apport de 10%.

Les résultats de l'exemple 5 et de l'exemple de comparaison 5 sont donnés au tableau V.

TABLEAU V

|   | Grandeurs comparées                                   | Exemple de comparaison 5 | Exemple 5 |
|---|-------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
|   | Concentration en sucre réglable dans la culture (g/l) | 10 - 30                  | 0 - 3     |
| 5 | Temps de culture (h)                                  | 150                      | 150       |
|   | Quantité de sucre sortant du système (g)              | 15,0                     | < 0,2     |
|   | Quantité de guanosine produite (g)                    | 10,4                     | 13,0      |

10 EXEMPLE 6.-

On introduit un milieu contenant 30 g par litre de glucose, 10 g par litre de chlorure d'ammonium, 3 g par litre d'urée, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mg par litre de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg par litre de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8 mg par litre de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 g par litre (calculé en azote) d'hydrolysate acide de protéines de soya, 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine en aliquotes distinctes de 20 ml chacune dans 3 flacons à secouer ayant chacun un volume de 500 ml. Après stérilisation du milieu par chauffage à 115°C pendant 10 minutes, on inocule le milieu avec une boucle de platine portant une goutte de Brevibacterium lactofermentum ATCC 21800, qu'on a préalablement fait croître en culture inclinée avec du bouillon pendant 48 heures, puis on procède à la culture avec secouage à 31,5°C pendant 24 heures. On applique le mode opératoire ci-dessus à la culture d'ensemencement.

On introduit un milieu (de pH 7,0) contenant 80 g par litre de mélasse (calculés en sucre), 50 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g par litre de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg par litre (calculés en azote) d'hydrolysate acide de protéines de soya, 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine

en fractions distinctes, chacune de 300 ml, dans 3 petits fermenteurs ayant un volume de 1 litre. On stérilise le milieu par chauffage de 120°C pendant 15 minutes. Après refroidissement jusqu'à 31,5°C, on ajoute le milieu qui a  
5 achevé son incubation dans le ballon au contenu des fermenteurs, à raison de 15 ml par fermenteur. On exécute l'incubation à 31°C avec un débit d'air de 1/2 volume par volume et par minute à une vitesse d'agitation de 700 tours par minute.

10 Dans l'un des trois fermenteurs, on arrête l'incubation au moment où le sucre du milieu est consommé (incubation en marche discontinue traditionnelle) et on détermine la concentration de L-lysine accumulée dans le milieu quantitativement par colorimétrie au cuivre et à la  
15 ninhydrine en milieu acide. Dans les deux autres fermenteurs, on commence à admettre le milieu d'alimentation au moment où la concentration en sucre dans le milieu atteint 5 g par litre sinon moins. Dans l'un des fermenteurs, le milieu d'alimentation contient du glucose  
20 (40 g par litre) uniquement (culture traditionnelle) et dans le fermenteur de la présente invention, le milieu d'alimentation contient du glucose (40 g par litre), de l'hydrolysate de protéines de soya (100 mg par litre en azote), du chlorhydrate de thiamine (0,1 mg par litre) et  
25 de la biotine (0,3 mg par litre). On exécute l'incubation dans ces fermenteurs en réglant le débit d'apport du milieu d'alimentation de façon à maintenir la concentration en sucre du bouillon de culture à 5 g par litre sinon moins. Après admission de 100 ml du milieu d'alimentation dans  
30 chaque culture, on achève l'incubation jusqu'au moment où le sucre du bouillon de culture est consommé. On détermine quantitativement la concentration en L-lysine accumulée dans le bouillon de culture.

Les résultats de l'incubation dans les trois  
35 fermenteurs sont présentés au tableau VI.

TABLEAU VI

| Mode de fermentation             | Productivité de L-lysine (g/l.h) | Rendement en L-lysine (%) |
|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Culture discontinue (état connu) | 2,2                              | 32                        |
| 5 Culture continue (état connu)  | 2,3                              | 33                        |
| Culture suivant l'invention      | 2,8                              | 35                        |

On peut déduire du tableau VI que la productivité et le rendement de L-lysine sont tous deux excellents.

EXEMPLE 7.-

10 On introduit un milieu contenant 30 g par litre de glucose, 10 g par litre de chlorure d'ammonium, 3 g par litre d'urée, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mg par litre de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg par litre de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8 mg par litre de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg par litre (calculés en azote)  
 15 d'hydrolysate acide de protéines de soya, 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine en fractions distinctes, chacune de 20 ml, dans 2 flacons à secouer ayant chacun un volume de 500 ml. Après stérilisation du milieu par chauffage à 115°C pendant  
 20 10 minutes, on inocule le milieu avec une boucle de platine portant une goutte de Brevibacterium flavum ATCC 21475 qu'on a préalablement fait croître en culture inclinée avec du bouillon pendant 48 heures, puis on procède à la culture avec secouage à 31,5°C pendant 24 heures. On applique le  
 25 mode opératoire ci-dessus à la culture d'ensemencement.

On introduit un milieu (de pH 7,0) contenant 80 g par litre de mélasse (calculés en sucre), 50 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g par litre  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg par litre (calculés en azote)  
 30 d'hydrolysate acide de protéines de soya, 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine

en fractions distinctes, chacune de 300 ml, dans 2 petits fermenteurs d'un volume de 1 litre. On stérilise le milieu par chauffage à 120°C pendant 15 minutes. Après refroidissement à 31,5°C, on ajoute le milieu précité dont

5 l'incubation est achevée dans le ballon au contenu du fermenteur en quantité de 15 ml par fermenteur. On exécute l'incubation à 31,5°C avec un débit d'air de 1,5 volume par volume et par minute, à une vitesse d'agitation de 700 tours par minute.

10 On commence l'apport du milieu d'alimentation au moment où la concentration en sucre du bouillon de culture tombe à 5 g par litre sinon moins. Le milieu d'alimentation contient du glucose (40 g par litre), de l'hydrolysate de protéines de soya (100 mg par litre en azote), du

15 chlorhydrate de thiamine (0,1 mg par litre) et de la biotine (0,3 mg par litre). Dans l'un des fermenteurs, on poursuit l'incubation en réglant le débit d'apport du milieu d'alimentation pour maintenir la concentration en sucre du bouillon de culture constante à 5 g par litre sinon moins

20 (suivant l'invention). Dans l'autre fermenteur, on poursuit l'incubation à un débit d'apport tel que la concentration en sucre se situe dans l'intervalle de 5 à 15 g par litre (comparaison). Après apport de 100 ml du milieu d'alimentation à chaque culture, on achève l'incubation au

25 moment où le sucre du bouillon de culture est consommé. On détermine quantitativement la concentration en L-lysine accumulée dans le bouillon de culture.

Les résultats de l'incubation dans les deux fermenteurs sont présentés au tableau VII.

TABLEAU VII

|   | Réglage de la teneur en sucre<br>(g/l) | Productivité<br>de L-lysine<br>(g/l.h) | Rendement<br>en L-lysine<br>(%) |
|---|----------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------|
| 5 | Moins de 5<br>(présente invention)     | 2,9                                    | 34                              |
|   | 5 - 15 (comparaison)                   | 2,5                                    | 32                              |

EXEMPLE 8.-

On introduit un milieu contenant 30 g par litre de glucose, 10 g par litre de chlorure d'ammonium, 3 g par litre d'urée, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mg par litre de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg par litre de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8 mg par litre de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1 g par litre (calculé en azote) d'hydrolysate acide de protéines de soya, 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine en fractions distinctes, chacune de 20 ml, dans 3 flacons à secouer ayant chacun un volume de 500 ml. Après stérilisation du milieu par chauffage à 115°C pendant 10 minutes, on inocule le milieu avec une boucle de platine portant une goutte de Brevibacterium flavum ATCC 21475, qu'on a préalablement fait croître en culture inclinée avec du bouillon pendant 48 heures, puis on procède à la culture avec secouage à 31,5°C pendant 24 heures. On applique le mode opératoire ci-dessus à la culture d'ensemencement.

On introduit un milieu (de pH 7,0) contenant 80 g par litre de mélasse (calculés en sucre), 50 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g par litre de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg par litre (calculés en azote) d'hydrolysate acide de protéines de soya, 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine en fractions distinctes, chacune de 300 ml, dans 3 petits fermenteurs d'un volume de 1 litre. On stérilise le milieu par chauffage à 120°C pendant 15 minutes. Après

refroidissement à 31,5°C, on ajoute le milieu précité (milieu pour culture d'ensemencement) ayant achevé l'incubation dans le ballon au contenu des fermenteurs en quantité de 15 ml. On exécute l'incubation à 31,5°C avec un  
5 débit d'air de 1/2 volume par volume et par minute et à une vitesse d'agitation de 700 tours par minute.

On commence l'apport du milieu d'alimentation au moment où la concentration en sucre du bouillon de culture tombe à 5 g par litre sinon moins. Le milieu d'alimentation  
10 de la présente invention contient du glucose (40 g par litre), de l'hydrolysate de protéines de soya (100 mg par litre en azote), du chlorhydrate de thiamine (0,1 mg par litre) et de la biotine (0,3 mg par litre). On exécute l'incubation en réglant le débit d'apport du milieu  
15 d'alimentation de façon à maintenir la concentration en sucre du milieu toujours à 5 g par litre sinon moins. Après apport de 100 ml du milieu d'alimentation à la culture, on prélève 100 ml du milieu sur le contenu fermenteur au moment où le sucre du bouillon de culture est consommé.

20 On poursuit l'agitation en entretenant l'apport de milieu d'alimentation. Dans ce cas également, on amène la concentration en sucre du bouillon de culture à 5 g par litre sinon moins. Après apport de 100 ml du milieu d'alimentation, on arrête l'incubation au moment où le sucre  
25 du bouillon de culture est consommé. On combine le milieu du fermenteur et le milieu préalablement prélevé et on y détermine quantitativement la concentration en L-lysine accumulée.

Les résultats montrent que la productivité de la  
30 L-lysine est de 3,8 g par litre et par heure et que le rendement en lysine est de 42%.

#### EXEMPLE 9.-

On introduit un milieu contenant 30 g par litre de glucose, 10 g par litre de chlorure d'ammonium, 3 g par  
35 litre d'urée, 1 g par litre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mg par litre de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg par litre de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8 mg par litre de

MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1 mg par litre (calculé en azote) d'hydrolysate acide de protéines de soya), 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine en fractions distinctes, chacune de 20 ml, dans 2 flacons à secouer ayant chacun un volume de 500 ml. Après stérilisation du milieu par chauffage à 115°C pendant 10 minutes, on inocule le milieu avec une boucle de platine portant une goutte de Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 21491, qu'on a préalablement fait croître en culture inclinée avec du bouillon pendant 48 heures, après quoi on procède à la culture avec secouage à 31,5°C pendant 24 heures. On applique le mode opératoire ci-dessus à la culture d'ensemencement.

On introduit un milieu (de pH 7,0) contenant 80 g par litre de mélasse (calculés en sucre), 50 g par litre de sulfate d'ammonium, 1 g par litre de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g par litre de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 100 mg par litre (calculés en azote) d'hydrolysate acide de protéines de soya), 0,1 mg par litre de chlorhydrate de thiamine et 0,3 mg par litre de biotine en fractions distinctes, chacune de 300 ml, dans 2 petits fermenteurs en verre d'un volume de 1 litre. On stérilise le milieu par chauffage à 120°C pendant 15 minutes. Après refroidissement à 31,5°C, on ajoute le milieu ci-dessus dont l'incubation est achevée dans le ballon au contenu des fermenteurs en quantité de 15 ml par fermenteur. On exécute l'incubation à 31,5°C avec un débit d'air de 1/2 volume par volume et par minute et à une vitesse d'agitation de 700 tours par minute.

Dans l'un des fermenteurs, on commence l'apport du milieu d'alimentation au moment où la concentration en sucre du bouillon de culture est tombée à 5 g par litre sinon moins. Le milieu d'alimentation contient du glucose (40 g par litre), de l'hydrolysate de protéines de soya (100 mg par litre en azote), du chlorhydrate de thiamine (0,1 mg par litre) et de la biotine (0,3 mg par litre) (présente invention). On poursuit l'incubation en réglant

le débit d'apport du milieu d'alimentation de façon à maintenir la concentration en sucre du bouillon de culture toujours à 5 g par litre sinon moins. Après apport de 100 ml du milieu d'alimentation, on prélève 100 ml de bouillon sur  
5 le contenu du fermenteur au moment où le sucre du bouillon est consommé.

On poursuit l'incubation en continuant l'apport du milieu d'alimentation. Dans ce cas également, on amène la teneur en sucre du milieu à 5 g par litre sinon moins.  
10 Après apport de 100 ml du milieu d'alimentation, on arrête l'incubation au moment où le sucre du bouillon de culture est consommé. On combine le bouillon de culture du fermenteur et le bouillon prélevé précédemment et on détermine quantitativement la concentration en L-lysine  
15 accumulée.

Les résultats révèlent que la productivité de la L-lysine est de 3,9 g par litre et par heure et que le rendement en lysine est de 41%.

Dans l'autre fermenteur, on commence l'apport du  
20 milieu d'alimentation pour la culture continue 25 heures après le début de l'incubation. On prend comme milieu d'alimentation un milieu obtenu en diluant de 4 fois le milieu initial. Pour exécuter la culture continue, on fait s'écouler environ 1 litre de milieu d'alimentation au taux  
25 de dilution de  $0,05 \text{ h}^{-1}$ . Après avoir atteint le régime constant, on détermine quantitativement la concentration en L-lysine du milieu.

Les résultats révèlent que la productivité de la lysine est de 3,5 g par litre et par heure et que le  
30 rendement en lysine est de 35%.

Conformément à l'invention, comme le montrent les exemples 6 à 9, la L-lysine peut être produite par fermentation avec une productivité élevée comme dans un procédé continu traditionnel tout en maintenant à des  
35 valeurs élevées la concentration du produit accumulé et le rendement atteint par fermentation dans le procédé à marche

discontinue traditionnel. La productivité peut donc être beaucoup améliorée et les dépenses peuvent être réduites dans la production industrielle de la L-lysine en appliquant la présente invention.

- 5            Bien que l'invention ait été décrite ci-dessus avec quelques détails pour la clarté et la compréhension, il est évident pour l'homme de métier à la lecture du mémoire que différentes modifications de forme et de détail peuvent être apportées sans sortir du cadre de l'invention.

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

-----

1.- Procédé de culture aérobie d'un micro-  
organisme dans une culture à marche discontinue, continue  
5 ou continue avec recyclage des cellules, caractérisé en ce  
qu'il comprend les stades :

(i) de première addition d'une solution  
d'alimentation de substrat (17) par apport intermittent de  
la solution d'alimentation de façon intermittente au  
10 récipient de culture (1, 8) pendant une période de temps  
définie à un débit d'apport préalablement déterminé,

(ii) de deuxième addition ou d'addition  
ultérieure qui est commencée lorsque des capteurs (2, 3, 9,  
10) détectent une élévation du pH ou une augmentation de la  
concentration en oxygène dissous qui ont lieu lorsque le  
15 substrat du récipient de culture (1, 8) est épuisé à une  
période d'arrêt de l'addition précédant une certaine période  
pour l'addition, et qui est effectuée par apport de la  
solution d'alimentation (17) au récipient de culture (1, 8)  
20 pendant une période de temps définie à un débit d'apport  
calculé au moyen d'un ordinateur (4, 11) à partir du temps  
pour la période d'arrêt de l'addition et du débit d'apport  
de la solution d'alimentation (17) dans la période  
d'addition précédant la période d'arrêt de l'addition, de  
25 façon que le débit devienne plus faible lorsque le temps  
pour la période d'arrêt de l'addition est long et que le  
débit devienne plus grand lorsque le temps pour la période  
d'arrêt de l'addition est court, et

(iii) de maintien de la concentration en substrat  
30 dans le récipient de culture (1, 8) à une valeur faible et  
constante par régulation automatique.

2.- Procédé suivant la revendication 1,  
caractérisé en ce que le substrat est une source de carbone.

3.- Procédé suivant la revendication 2,  
35 caractérisé en ce que la source de carbone est un sucre.

4.- Procédé suivant l'une quelconque des

revendications précédentes, caractérisé en ce que le micro-organisme est capable de produire de la L-lysine.

5 5.- Appareil pour régler la concentration en source de carbone qui est le substrat dans des cultures aérobies à marche discontinue, continue ou continue avec recyclage, caractérisé en ce qu'il comprend :

(i) un récipient de culture (1, 8) équipé d'un capteur (2, 9) pour détecter le pH et d'un capteur (3, 10) pour détecter la concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture dans le récipient de culture (1, 8),  
10 respectivement, outre d'un dispositif (15) d'aération et d'agitation du milieu de culture, qui est conçu pour recevoir une solution d'alimentation (17), et

(ii) un dispositif de régulation pour régler le  
15 débit d'apport de la solution d'alimentation (17) dans le récipient de culture (1, 8), le dispositif de régulation comprenant un premier convertisseur de signaux (i) pour recevoir les signaux respectifs émis par le capteur de pH (2, 9) et le capteur de concentration en oxygène dissous (3,  
20 10) et émettre des signaux convertis; un ordinateur (4, 11) pour recevoir les signaux convertis, calculer le débit d'apport à l'aide des signaux convertis et émettre un signal de débit d'apport; un deuxième convertisseur de signaux (ii) pour recevoir le signal de débit d'apport et émettre  
25 un signal de débit d'apport converti (16), et un dispositif de régulation de débit d'apport (7) pour régler le débit d'apport de la solution d'alimentation (17) au récipient de culture (1, 8) à l'aide du signal de débit d'apport converti (16).

30 6.- Appareil suivant la revendication 5, caractérisé en ce que le premier convertisseur de signaux (i) comprend un convertisseur analogique-numérique et le deuxième convertisseur de signaux (ii) comprend un convertisseur numérique-analogique.

35 7.- Appareil suivant l'une quelconque des revendications 5 et 6, caractérisé en ce que le dispositif

de régulation de débit d'apport (7) comprend un régulateur de débit d'apport et une pompe d'alimentation (14).

8.- Procédé de production de L-lysine par fermentation, comprenant les stades :

- 5           (i) d'inoculation d'un micro-organisme capable de produire de la L-lysine dans un milieu liquide,
- (ii) de culture de ce micro-organisme pendant l'apport d'un supplément de milieu contenant une source de carbone et des nutriments ayant pour effet d'accélérer la
- 10 croissance après la phase de croissance logarithmique de ce micro-organisme, où la source de carbone est maintenue à une concentration n'excédant pas 5 g par litre dans le milieu de culture, et
- (iii) de collecte de la L-lysine produite et
- 15 accumulée dans le milieu.

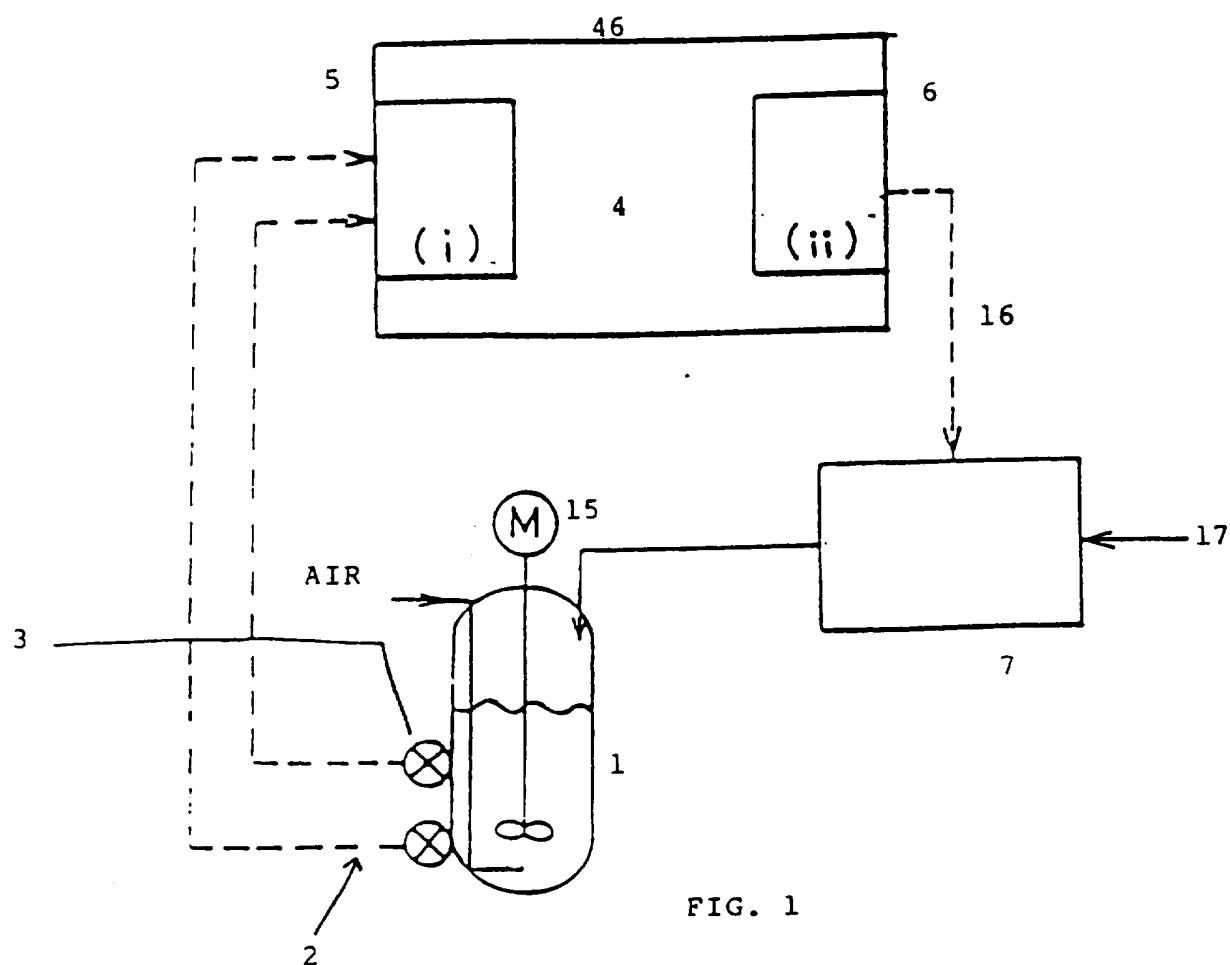


FIG. 1

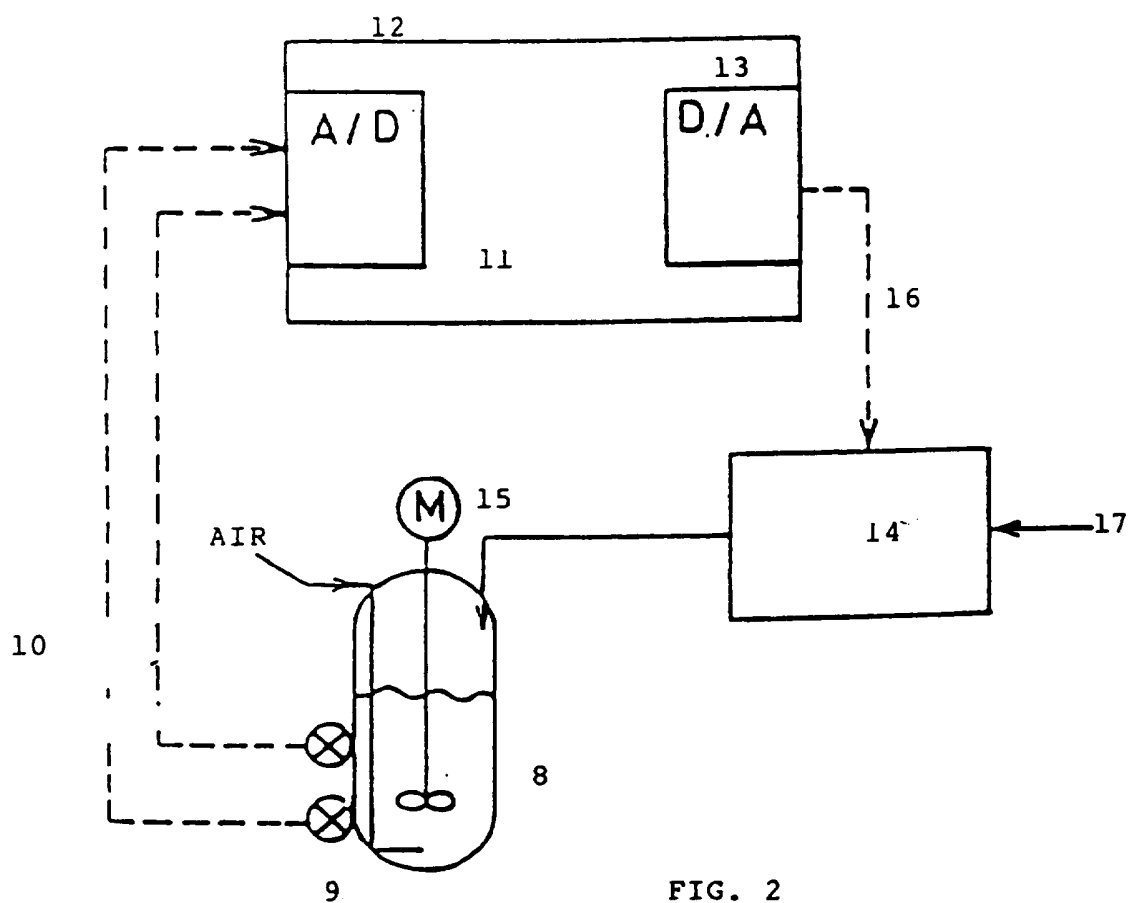


FIG. 2

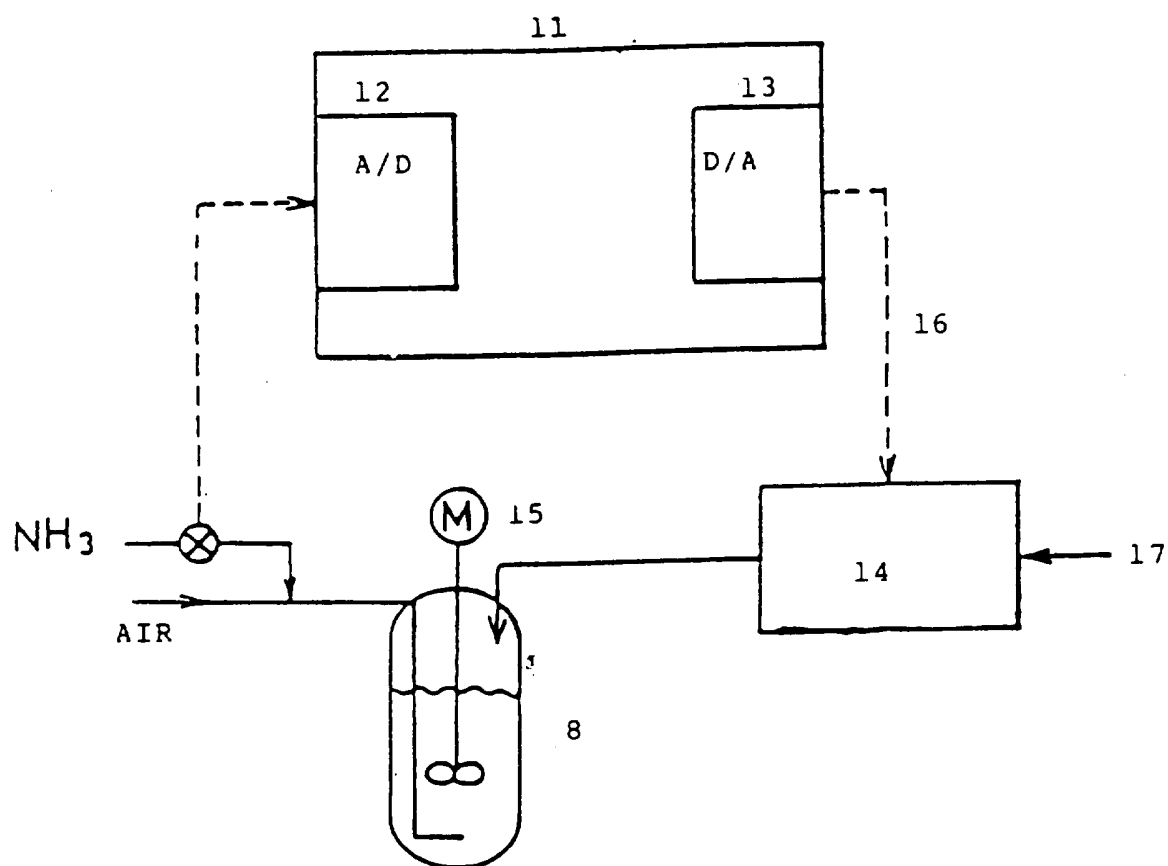


FIG. 3

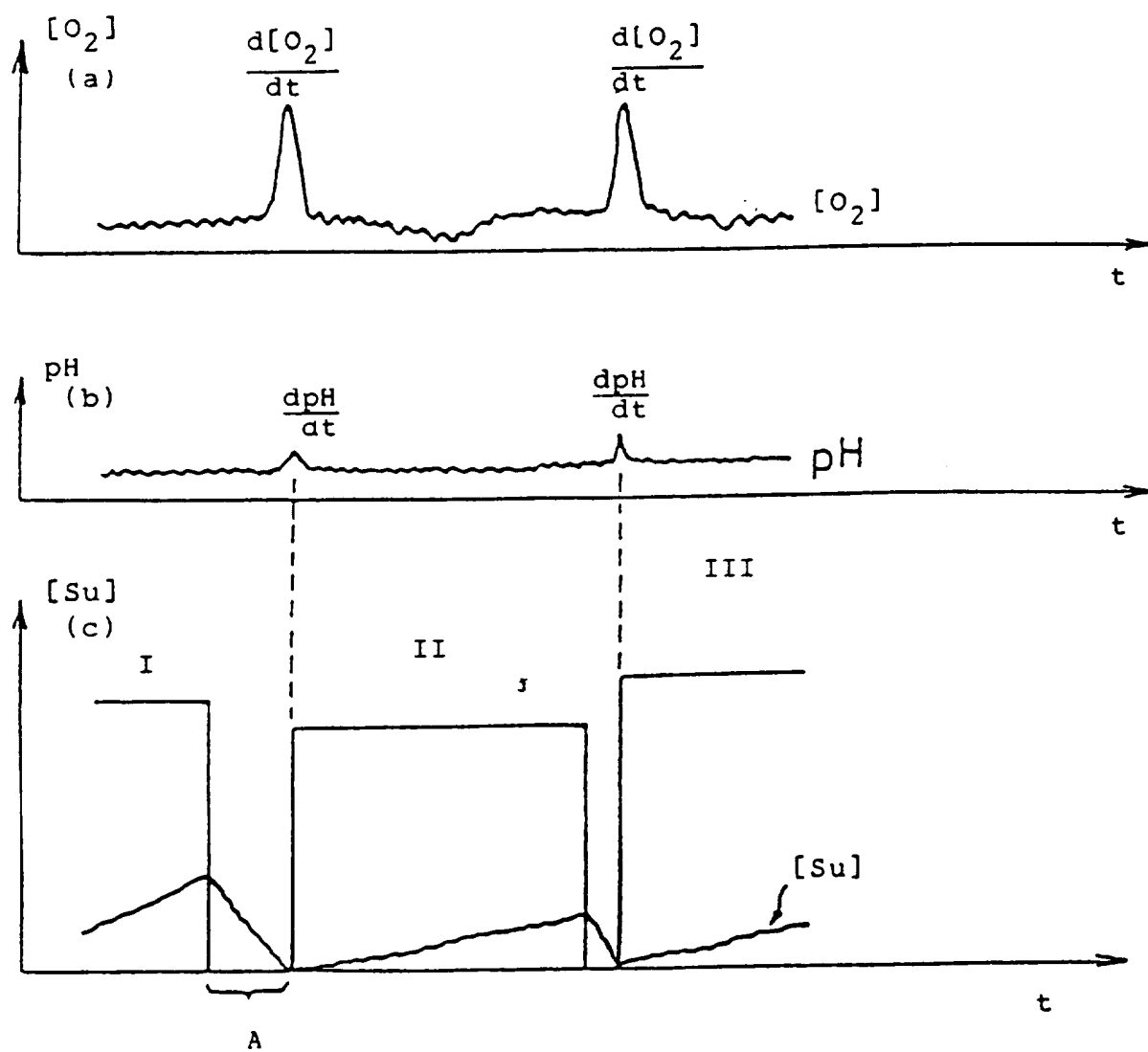


FIG. 4

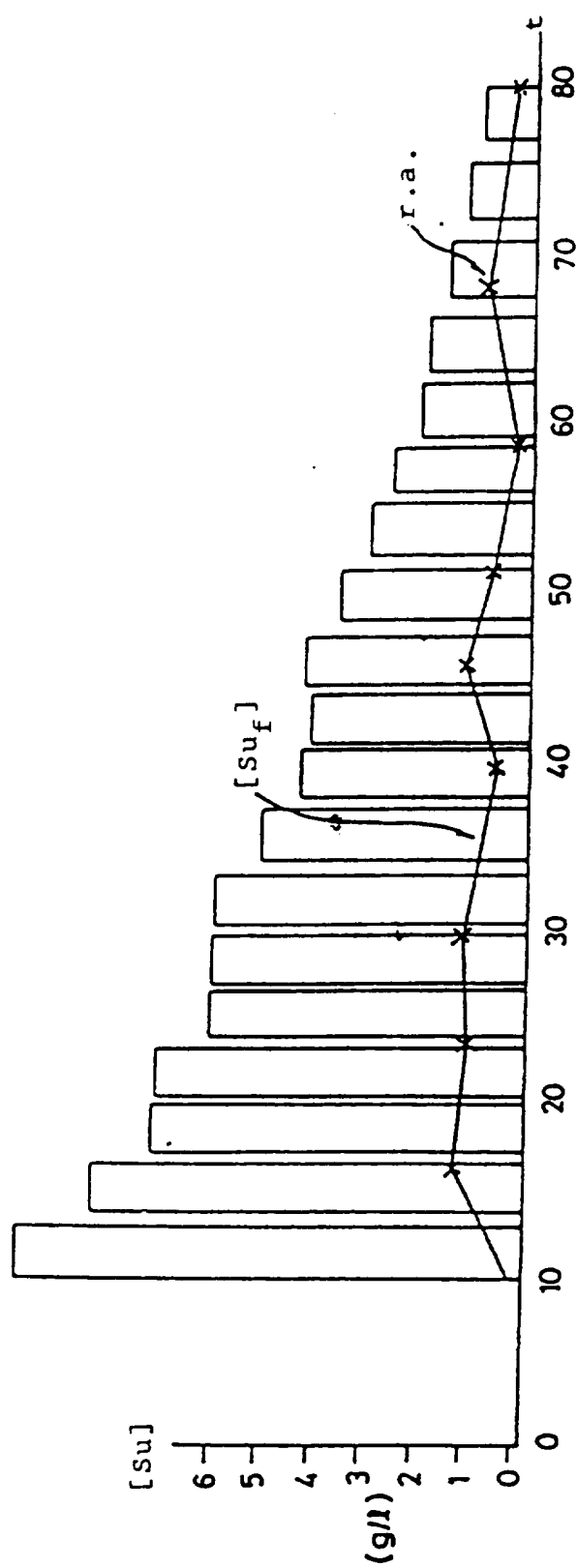


FIG. 5

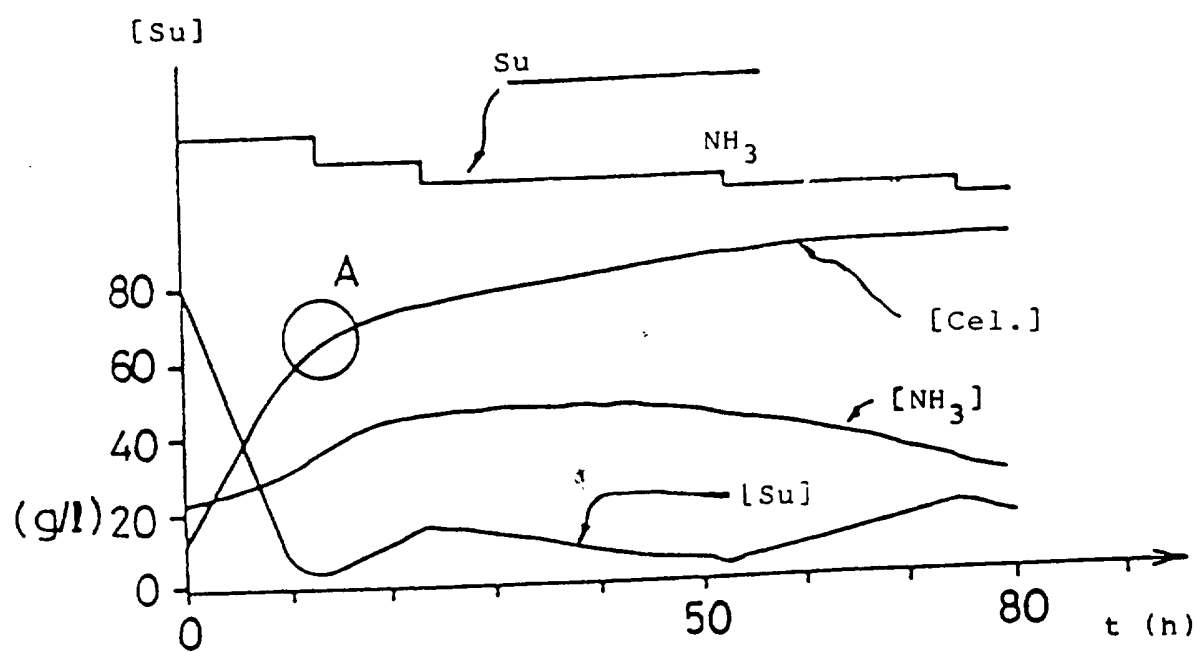
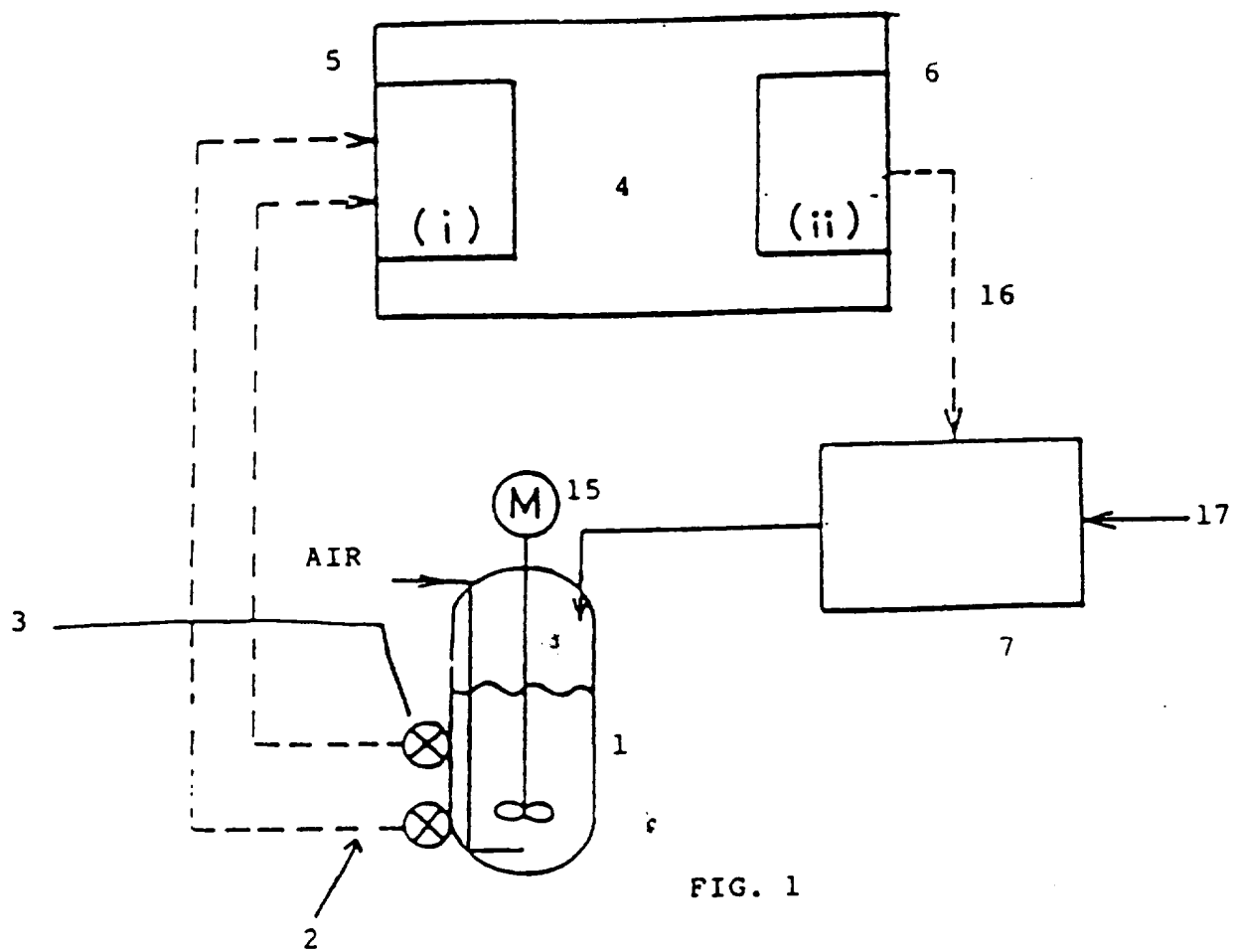


FIG. 6



## A B R E G E

-----

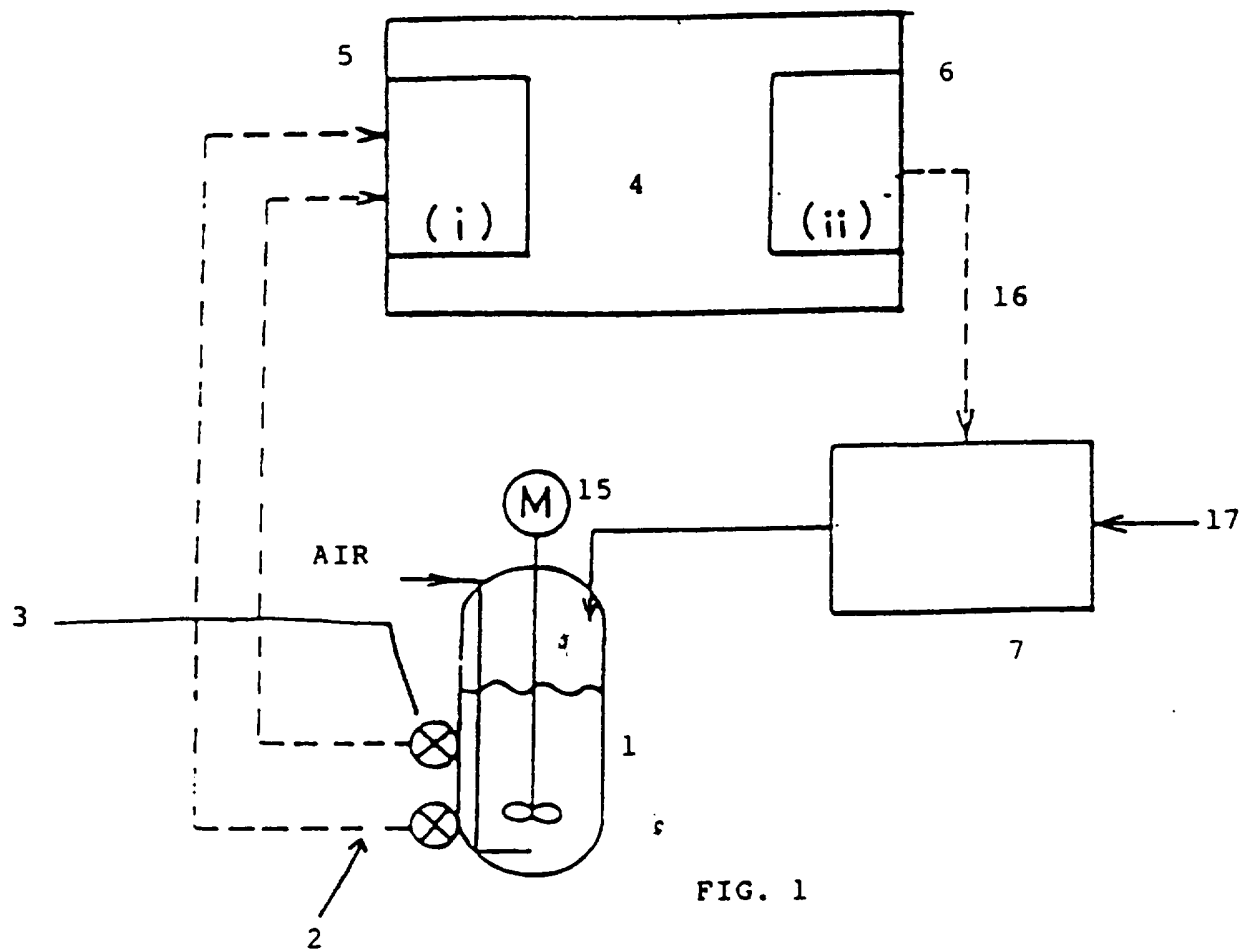
Procédé et appareil pour régler la concentration en  
source de carbone dans la culture aérobie d'un  
micro-organisme.

-----

Procédé pour régler à une valeur faible la concentration en source de carbone lors de la culture aérobie d'un micro-organisme en marche discontinue, continue ou continue avec recyclage des cellules. L'élévation du pH et l'augmentation de la concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture sont surveillées (2, 3) pour régler l'apport de la solution d'alimentation (17).

La L-lysine peut être produite par fermentation avec une meilleure productivité, une concentration plus élevée en produit accumulé et un rendement accru.

Figure 1.





Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BO 3359  
BE 9101098

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                              | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Revendication concernée                                                                                                                                                                                                                                                     | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6) |
| Y                                                                                                                                                                                                                                      | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 9,<br>29 Août 1983, Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 68807t,<br>ION NITELEA 'L-LYSINE BY FERMENTATION'<br>page 476 ;colonne 1 ;<br>* abrégé *<br>& DATABASE WPI<br>Section Ch, Week 8312,<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>Class B05, AN 83-28949K<br>* abrégé *<br>& RO-A-72 660 (INTREPRINDEREA DE<br>ANTIBIOTICE) 27 Juillet 1981<br>--- | 1-8                                                                                                                                                                                                                                                                         | C12M1/36<br>C12P13/08               |
| Y                                                                                                                                                                                                                                      | DD-C-254 214 (VEB JENAPHARM)<br>* page 2, alinéa 3; revendication; exemple<br>*                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 1-3,5-7                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                     |
| X                                                                                                                                                                                                                                      | DD-C-268 834 (VE FORSCHUNGSZENTRUM<br>BIOTECHNOLOGIE BERLIN)<br>* revendications 1,4; exemples *                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1-3,5-7                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                     |
| Y                                                                                                                                                                                                                                      | DD-A-287 271 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN<br>DER DDR)<br>* revendications *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1,2                                                                                                                                                                                                                                                                         | C12M<br>C12P                        |
| Y                                                                                                                                                                                                                                      | DATABASE WPI<br>Section Ch, Week 7707, 6 Janvier 1977<br>Derwent Publications Ltd., London, GB;<br>Class B05, AN 77-12129Y<br>& JP-A-52 001 091 (AJINOMOTO KK)<br>* abrégé *<br>---<br>-/--                                                                                                                                                                                                 | 2-4,8                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                     |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Examineur                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                     |
| 28 Mars 1995                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Coucke, A                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                     |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                     |
| X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un<br>autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la<br>date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>-----<br>& : membre de la même famille, document correspondant |                                     |

2

EPO FORM 1503 03.92 (P04C48)



Office européen  
des brevets

## RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2  
de la loi belge sur les brevets d'invention  
du 28 mars 1984

Numero de la demande  
nationale

BO 3359  
BE 9101098

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Catégorie                                                                                                                                                                                                                              | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes                                                                                                                                       | Revendication concernée                                                                                                                                                                                                                                                     | CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)          |
| Y                                                                                                                                                                                                                                      | BIOTECHNOL. BIOENG.,<br>vol.17, no.12, 1975, NEW YORK US<br>pages 1829 - 32<br>T. MISKIEWICZ ET AL. 'CONTROL OF NUTRIENT<br>SUPPLY IN YEAST PROPAGATION'<br>* page 1829, alinéa 2 -alinéa 3 *<br>* page 1831 *<br>--- | 1-3,5-7                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                              |
| Y                                                                                                                                                                                                                                      | FR-A-2 184 035 (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC<br>CO. INC.)<br>* revendications *<br>-----                                                                                                                                  | 5-7                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                              |
|                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHES (Int.Cl.6) |
|                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                              |
| Date d'achèvement de la recherche                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                       | Examineur                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                              |
| 28 Mars 1995                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                       | Coucke, A                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                              |
| <b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                              |
| X : particulièrement pertinent à lui seul<br>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un<br>autre document de la même catégorie<br>A : arrière-plan technologique<br>O : divulgation non-écrite<br>P : document intercalaire |                                                                                                                                                                                                                       | T : théorie ou principe à la base de l'invention<br>E : document de brevet antérieur, mais publié à la<br>date de dépôt ou après cette date<br>D : cité dans la demande<br>L : cité pour d'autres raisons<br>.....<br>& : membre de la même famille, document correspondant |                                              |

2  
EPO FORM 1503 (01.82) (P04C48)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 3359  
BE 9101098

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

28-03-1995

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| RO-A-72660                                      |                        | AUCUN                                   |                        |
| DD-C-254214                                     |                        | AUCUN                                   |                        |
| DD-C-268834                                     |                        | AUCUN                                   |                        |
| DD-A-287271                                     |                        | AUCUN                                   |                        |
| FR-A-2184035                                    | 21-12-73               | US-A- 3926738                           | 16-12-75               |
|                                                 |                        | DE-A- 2323416                           | 29-11-73               |
|                                                 |                        | GB-A- 1434613                           | 05-05-76               |
|                                                 |                        | US-A- 3926737                           | 16-12-75               |