

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

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

2 480 307

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 07492

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

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 P 13/24; C 12 R 1/19.

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

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : Japon, 14 avril 1980, n° 48857/80.

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

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

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

(73) Titulaire : *Idem* (71)

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

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

5 La plupart des souches sauvages de micro-organismes ne produisent pas de L-proline dans le milieu. Pour rendre une souche sauvage capable de produire la L-proline à partir des hydrates de carbone, il a été nécessaire d'induire des mutants artificiels à partir de la souche sauvage. Il existe de nombreux mutants artificiels producteurs de méthionine connus. Les mutants connus caractéristiques producteurs de proline sont les suivants :

Mutant de Brevibacterium flavum qui a besoin d'isoleucine ou d'arginine (brevet des Etats-Unis d'Amérique 3 329 577), mutant de Micrococcus glutamicus qui a besoin d'isoleucine (brevet britannique n° 1 172 903), mutant de Kurthia catenaform (brevet britannique n° 1 186 270), mutant de Microbacterium ammoniaphilum (publication de demande de brevet japonais examinée n° 38876/1973), mutant du genre Brevibacterium ou Corynebacterium résistant aux sulfamides (brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3 819 483), mutant 20 de Corynebacterium melassecola qui a besoin de tyrosine et de phénylalanine (publication de demande de brevet japonais examinée n° 33190/1976), mutant du genre Corynebacterium qui a besoin d'homosérine (publication de demande de brevet japonais non examinée n° 41386/1979), et mutant du genre Brevibacterium ou Corynebacterium 25 résistant à la 3,4-déshydroproline (publication de demande de brevet japonais non examinée n° 105293/1979).

On sait en outre qu'un mutant d'Escherichia coli sécrète de la L-proline, voir Biochim. Biophys. Acta, 104, page 395 (1965). Le producteur de proline le plus efficace, à la connaissance 30 de la demanderesse, est Brevibacterium flavum FERM-P 4371, qui produit 3,6 g/dl de L-proline à partir de 10 g/dl de glucose.

Il est devenu cependant difficile d'augmenter les rendements en L-proline en utilisant les techniques de mutation artificielles. Il existe donc constamment un besoin de mettre au point un 35 nouveau procédé pour la production de L-proline avec des rendements élevés.

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

Cet objet et d'autres objets de l'invention, qui apparaîtront plus facilement ci-après ont été obtenus par un procédé 5 qui consiste :

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

La souche de donneur d'ADN utilisée pour construire le 15 producteur de L-proline de l'invention est un mutant du genre Escherichia résistant aux analogues de la proline et capable de produire la L-proline. On utilise de préférence comme donneur d'ADN des souches ayant une productivité supérieure de L-proline.

L'analogue de L-proline de l'invention inhibe la croissance 20 de souches d'Escherichia, cette inhibition étant cependant supprimée lorsque la L-proline coexiste dans le milieu.

Des exemples des analogues de proline sont la 3,4-déshydroproline et l'acide azétidine-2-carboxylique.

En vue d'augmenter la production de L-proline du mutant 25 comme ci-dessus, il est efficace de faire en sorte que le mutant ait besoin, pour sa croissance, d'un aminoacide tel qu'isoleucine, histidine, ornithine, arginine, méthionine et leucine. La production de L-proline est également augmentée lorsque l'on confère au mutant la résistance aux sulfamides tels que la sulfaguanidine.

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

Le plasmide-ADN ou ADN-phage utilisé comme vecteur dans 35 le procédé de synthèse est également traité de manière analogue par une endonucléase de restriction. On peut utiliser divers types d'endonucléases de restriction si la digestion de l'ADN chromoso-

mique est effectuée partiellement. Ensuite, l'ADN chromosomique digéré et l'ADN vecteur sont soumis à une réaction de "ligation" (fixation).

La recombinaison de l'ADN pour préparer le plasmide 5 recombinant peut être effectuée par introduction, avec la transférase terminale, d'acide désoxyadénylique et d'acide désoxythymidylque ou d'acide désoxyguanylique et d'acide désoxycytidylque dans le fragment d'ADN chromosomique et l'ADN vecteur scindé, et en soumettant le fragment d'ADN chromosomique modifié et l'ADN vecteur 10 scindé à une réaction d'annellation.

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

L'ADN hybride ainsi obtenu peut être incorporé dans un 15 micro-organisme du genre Escherichia par des techniques classiques de transformation, voir J. Bacteriol., 119, page 1072 (1974). Le transformant désiré est sélectionné en utilisant un milieu sur lequel ne peut pousser qu'un clone ayant les caractéristiques de production de L-proline provenant du fragment d'ADN chromosomique 20 ou celles provenant de l'ADN vecteur, ou les unes et les autres.

Comme micro-organisme récepteur de l'ADN hybride, on utilise ordinairement un auxotrophe de L-proline puisqu'il est classique de distinguer le transformant producteur de proline du récepteur. Il est souhaitable, pour obtenir de meilleurs résultats, d'utiliser comme récepteur un mutant possédant déjà une productivité 25 supérieure de L-proline.

Les procédés de culture des souches productrices de L-proline ainsi obtenues sont classiques et semblables aux procédés pour la culture des micro-organismes producteurs de L-proline connus. 30 Donc, le milieu de culture utilisé est un milieu classique contenant des sources de carbone, des sources d'azote, des ions inorganiques et, si nécessaire, de plus faibles quantités d'agents nutritifs organiques, tels que vitamines ou aminoacides. Des exemples de sources de carbone appropriées comprennent le glucose, le saccharose, le lactose, l'hydrolysat de maïs et les mélasses. On peut utiliser comme sources d'azote l'ammoniac gazeux, l'ammoniaque aqueuse 35 et les sels d'ammonium et d'autres substances azotées.

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

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

Par le procédé de la présente invention, on peut produire la L-proline avec des rendements plus élevés que ceux obtenus dans les procédés connus précédemment, dans lesquels on 10 utilise des mutants artificiels d'Escherichia.

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

EXEMPLE 1

15 (1) Préparation d'ADN chromosomique possédant l'information génétique relative à la production de L-proline.

Dans 1 litre de milieu L contenant 1 g/dl de peptone, 0,5 g/dl d'extrait de levure, 0,1 g/dl de glucose, 0,5 g/dl de NaCl (ajusté à pH 7,2), on cultive à 37°C pendant 3 h, en agitant, Escherichia coli EG-19 (NRRL B-12394), mutant résistant à la S-(2-aminoéthyl)-cystéine (AEC) et à la 3,4-déshydroproline et induit à partir de K-12 (ATCC 10798), et on récolte les cellules bactériennes dans la phase de croissance exponentielle. On extrait l'ADN chromosomique par une méthode classique au phénol et on obtient 3,4 mg d'ADN purifié.

25 (2) Préparation d'ADN vecteur.

On prépare comme vecteur l'ADN du plasmide pBR 322 qui contient comme éléments constitutifs les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline, de la manière suivante :

On fait incuber à 37°C une souche d'Escherichia coli K-12 recevant le plasmide pBR 322 dans 1 litre d'un milieu glucose- "casaminoacide"-sels inorganiques contenant 2 g de glucose, 1 g de NH₄Cl, 6 g de Na₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 5 g de NaCl, 0,1 g de MgSO₄, 7H₂O, 0,015 g de CaCl₂·2H₂O, 20 g de "casaminoacide" (hydrolysat de caséine et 100 γ de chlorhydrate de thiamine par litre (ajusté à pH 7,2). Après avoir fait incuber la souche jusqu'à la fin de la phase logarithmique, on ajoute au milieu de culture 170 γ/ml de chloramphénicol. Par ce procédé, l'ADN de plasmide s'est développé

et accumulé abondamment dans les cellules bactériennes.

Après 16 h d'incubation, on récolte les cellules que l'on lyse ensuite par traitement par le lysozyme et le SDS (dodécylsulfate de sodium). On centrifuge le lysat à 30 000xg pendant 1 h 5 pour obtenir la liqueur surnageante. Après concentration de la liqueur surnageante, on obtient 480 γ de l'ADN de plasmide en utilisant la centrifugation dans un gradient de densité chlorure de césium-bromure d'éthidium jusqu'à l'équilibre.

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

10 On traite 10 γ de l'ADN chromosomique avec l'endonucléase de restriction Hind III à 37°C pendant 5, 10, 20, 30 ou 60 min pour scinder les chaînes d'ADN, et on chauffe ensuite à 65°C pendant 5 min, respectivement. On traite également 10 γ de l'ADN vecteur avec une endonucléase de restriction Hind III à 37°C pendant 1 h pour 15 scinder complètement l'ADN et on chauffe ensuite à 65°C pendant 5 min, respectivement.

On mélange la solution d'ADN chromosomique digéré et la solution d'ADN vecteur scindé et on soumet à la réaction de ligation de fragments d'ADN par une ligase de l'ADN phage T_4 en présence 20 d'ATP et de dithiothréitol à 10°C pendant 24 h. On chauffe ensuite le mélange de réaction à 65°C pendant 5 min, et on ajoute deux fois son volume d'éthanol. On récupère l'ADN recombinant précipité.

(4) Transformation génétique par le plasmide hybride recevant l'information génétique relative à la production de proline.

25 On cultive les souches mutantes n° 19(NRRL B-12394) et n° 30 (NRRL B-12396) qui sont résistantes à la S-(2-aminoéthyl)-cystéine et à la sulfaguanidine, respectivement, qui proviennent d'*Escherichia coli* K-12 par mutagénèse par la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine dans 10 ml de milieu L et on cultive à 37°C en 30 agitant. On récolte les cellules dans la phase de croissance exponentielle et on les met en suspension dans une solution de $MgCl_2$ 0,1M et, ensuite, dans une solution de $CaCl_2$ 0,1M au bain de glace; on prépare ainsi les cellules "compétentes" capables de fixer l'ADN.

Dans la suspension de cellules compétentes, on ajoute 35 l'ADN obtenu à l'étape (3) qui contient l'ADN de plasmide hybride. On maintient la suspension au bain de glace pendant 30 min, puis on chauffe à 42°C pendant 2 min, et on laisse à nouveau reposer au bain

de glace pendant 30 min; les cellules contenant ainsi l'ADN de plasmide hybride sont inoculées dans le milieu L et on agite le milieu à 37°C pendant 2 h; la réaction de transformation est ainsi terminée. On récolte les cellules, on les lave et on les remet 5 en suspension. On étale une faible portion de la suspension de cellules sur une plaque de gélose contenant 2 g de glucose, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g de K_2HPO_4 , 2 g de KH_2PO_4 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de citrate de sodium, $2\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de S-(2-aminoéthyl)-cystéine, HCl, et 2 g de gélose par litre et contenant en outre 20 γ/ml d'ampicil-10 line par litre (ajustée à pH 7,2). On fait incuber la plaque à 37°C. Après 3 jours d'incubation, on prélève toutes les colonies apparaissant sur la plaque, on les purifie et on les isole.

On obtient comme transformants des colonies qui sont résistantes à la fois à l'ampicilline et à la S-(2-aminoéthyl)-L-15 cystéine et capables de produire la L-proline. La résistance à l'ampicilline (50 γ/ml et à la S-(2-aminoéthyl)-L-cystéine (500 γ/ml) est essayée avec un milieu L-gélose, et on examine la production de L-proline par culture à 31°C pendant 72 h. On obtient les transformants AJ 11543 (FERM-P 5483 et NRRL B-12403) AJ 11544 (12404) à partir des 20 souches réceptrices n° 19 et 30, respectivement.

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

Le tableau ci-après indique les résultats expérimentaux de la production par fermentation de L-proline en utilisant les 25 souches AJ 11543 et AJ 11544.

Le milieu de fermentation contient 5 g/dl de glucose, 2,5 g/dl de sulfate d'ammonium, 0,2 g/dl de KH_2PO_4 , 0,1 g/dl de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/dl d'extrait de levure, 1 mg/dl de chlorhydrate de thiamine, 1 mg/dl de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/dl de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et 2,5 g/dl 30 de CaCO_3 (stérilisé séparément) et le pH est ajusté à 7,0.

On place des lots de 20 ml de milieu de fermentation dans des ballons de 500 ml inoculés chacun au moyen d'une boucle de platine avec l'inoculum du micro-organisme d'essai, et on effectue la culture à 31°C pendant 72 h.

35 La quantité de L-proline dans la liqueur surnageante du bouillon de fermentation est déterminée par dosage microbiologique.

T A B L E A U

Micro-organisme essayé	Quantité de L-proline accumulée (mg/dl)
EG-19	0,8
n° 19	0
n° 30	0
AJ 11543	15,0
AJ 11544	25,0

REVENDEICATIONS

1 - Procédé pour la production de L-proline par fermentation, caractérisé en ce que l'on cultive dans un milieu de culture un micro-organisme producteur de L-proline et on recueille la
5 L-proline accumulée dans le milieu de culture, ledit micro-organisme étant obtenu par incorporation, dans une souche réceptrice du genre Escherichia, d'un plasmide hybride dans lequel est inséré un fragment d'ADN portant l'information génétique relative à la production de L-proline, ledit fragment étant dérivé d'une souche donneur du genre
10 Escherichia qui est résistante à un analogue de la proline.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche réceptrice appartient au genre Escherichia coli.

3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche donneur appartient au genre Escherichia coli.

15 4 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche réceptrice est Escherichia coli K-12 ou un de ses mutants.

5 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche donneur est Escherichia coli K-12 ou un de ses
20 mutants.

6 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit plasmide hybride est dérivé de pBR 322.