

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 855074 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 855074

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P 13/00
C12N 1/20
C12P 41/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 17.04.1985

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 18.12.1985

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 18.12.1985

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 17.04.1985 PCT/US1985/000674
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

20.04.1984 US 602289

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Wisconsin Alumni Research Foundation, 614 North Walnut Street, Madison, WI 53705, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Sih, Charles J., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä L-karnitiinin valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av L-karnitin.

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

39647 ATCC

39648 ATCC

Menetelmä L-karnitiinin valmistamiseksi

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään L-karnitiinin valmistamiseksi.

Täsmällisemmin tämä keksintö kohdistuu menetelmään L-karnitiinin valmistamiseksi fermentaation avulla.

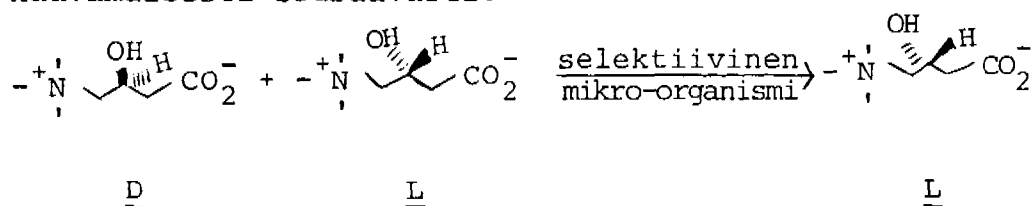
Vielä täsmällisemmin tämä keksintö kohdistuu menetelmään DL-karnitiinin hajottamiseksi mikrobiologisesti.

Tämä keksintö kohdistuu myös uuteen mikro-organismiin, jota voidaan käyttää DL-karnitiinin hajottamisessa.

Hyvin tiedetään, että monet mikro-organismit kykenevät käyttämään L-karnitiinia ainoana hiililähteenä. Esimerkiksi, osoitettiin, että bakteeri (kokeellisesti tunnistettu *Pseudomonas*), joka oli eristetty saastuneesta joenuomasta, käytti L-karnitiinia DL-seoksesta tuottaen D-karnitiinia suurella optisella saannolla $\sqrt{G}$. Fraenkel ja S. Friedman, *Vitam. Horm.* (N.Y.) 1957 16, 737. Tämän seurauksena tutkittiin D- ja L-karnitiinin metaboliaa *Pseudomonas putidan* ja *Acinetobacter calcoaceticuksen* lepotilassa olevilla soluilla. *Ps. putidan* solut, joita kasvatettiin DL-karnitiinin läsnäollessa, hajottivat ainoastaan L-karnitiinia glysiinibetainin akkumuloituessa stökiometrisesti $\sqrt{J}$. Miura-Fraboni ja S. Englard, *FEMS Microbiology Lett.* 18 (1983) 1137. Tiettyä ilmeistä vastakkaisuutta esiintyy suhteessa karnitiinin metaboliaan *A. calcoaceticuksella*. Eräässä artikkelissa väitettiin tämän organismin kasvavan vain L-karnitiinilla muodostaen trimetyyliamiinia $\sqrt{H.P.}$ Kleber et al., *Arch. Microbiol.* 112 (1977) 2017. D-karnitiinia metabolisoitui jos inkubointiseoksessa oli läsnä toista hiililähdettä, kuten L-karnitiinia, tai jos bakteereja esi-inkuboitiin L- tai DL-karnitiinilla, mutta ei lainkaan kasvua havaittu, kun D-karnitiini oli ainoa hiililähde. Toisaalta, J. Miura-Fraboni ja S. Englard väittivät, että *A. calcoaceticus* käytti kasvuun sekä karnitiinin D- että L-isomeerejä ainoana hiililähteenä trimetyyliamiinia muodostuessa stökiometrisesti, mutta ennen esillä olevaa keksintöä yhtäkään mikro-

organismeja ei ole esitetty, joka inkuboidessa DL-karnitiinia sisältävässä seoksessa ensisijaisesti hajottaa karnitiinin luonnossa esiintymätöntä muotoa, D-karnitiinia, johtaan halutun luonnollisen L-karnitiinin akkumuloitumiseen väliaineeseen.

Nyt on havaittu, että DL-karnitiinin raseeminen seos voidaan hajottaa altistamalla se sellaisen entsyymien fermentatiiviselle toiminnalle, joita kehittävä mikro-organismi, jolle on tunnusomaista niiden ainutlaatuinen kyky ensisijaisesti metaboloida yhdisteen luonnossa esiintymätöntä D-muotoa, siten sallien halutun, luonnollisen L-karnitiinin akkumuloidumisen reaktioväliaineeseen, josta L-karnitiini voidaan helposti ottaa talteen. Tämä menetelmä voidaan esittää kaavamaisesti seuraavasti:



A. calcoeticuksen villikanta, jolla on tämä yllä mainittu ainutlaatuinen ominaispiirre, on eristetty jätevedestä. Tunnetut mikro-organismikannat, jotka metaboloivat karnitiinia, eivät saa aikaan DL-karnitiinin hajoamista, koska ne metaboloivat D- ja L-karnitiinia yhtä suurella nopeudella, kun taas tälle villikannalle, jolla on ATCC 39648:n tunnusmerkit, on ominaista sen kyky metaboloida D-karnitiinia nopeammin kuin L-karnitiinia nestemäisessä tai kiinteässä väliaineessa. Täten, tämä kanta vastaa niitä kriteerejä, jotka vaaditaan mikro-organismeilta esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän tarkoituksiin, ja jolla on ainutlaatuinen kyky hajottaa DL-karnitiinia ja sallia luonnollisen ja halutun karnitiinin muodon, L-karnitiinin, talteenottamisen.

Yllä identifioitujen villien kannan lisäksi on valmistettu tämän kannan mutantti, jolla on ATCC 39647:n tunnusmerkit. Mutantti voidaan erottaa villistä kannasta sen kyvystä sallia L-karnitiinin suurempien määrien akkumuloituminen reaktioväliaineeseen, kun sitä käytetään DL-karnitiinin hajottamiseen fermentatiivisella toiminnalla.

Mutanttia, ATCC 39647, voidaan saada kasvattamalla *A. calcoaceticus* ATCC 39648:aa sopivalla DL-karnitiinia sisältävällä alustalla ja sitten altistamalla nitrosoguanidiini (NTG) mutageenille. Mutantti valikoidaan sitten agar-maljoilta, jotka sisältävät joko D- tai L-karnitiinia ainoana hiililähteenä. Haluttu mutantti *A. calcoaceticus* ATCC 39647 kasvaa huonosti L-karnitiinia ainoana hiililähteenä sisältävällä alustalla, mutta kasvaa nopeasti maljoilla, jotka sisältävät D-karnitiinia ainoana hiililähteenä. Tämä valikointi saavutettiin toistomaljamenetelmällä [D. F. Spooner ja G. Sykes, *Methods in Microbiology*, Vol. 7B, s. 244 (1972)]⁷. Alan asiantuntijoille on ilmeistä, että muitakin mutatoimismenetelmiä voidaan käyttää menestyksellisesti tämän keksinnön mukaiseen menetelmään sopivien mutanttien tuottamiseen. Täten, nitrosoguanidiinin käyttämisen sijasta mutaation saavuttamiseksi voidaan käyttää muita kemiallisia mutageeneja, kuten esimerkiksi natriumnitriittiä, etyleeni-iminiä, 8-atsaguaniinia, N-metyyli-N'-nitrosoguaniinia tai sinappikaasuja, jonka jälkeen seuraa valinta. Lisäksi, voidaan käyttää fysikaalista mutagenointia käyttäen UV-valoa ja ionisoivaa tai korkeaenergistä säteilyä, kuten röntgensäteitä, gammasäteitä ja elektronisuihkua. Mutageneesi voidaan myös saada aikaan käyttämällä nykyään saatavissa olevia molekyylibiologiamenetelmiä, s.o. transduktiota, transformaatiota, konjugaatiota, solufuusiota, rekombinantti-DNA-tekniikkaa voidaan käyttää uusien mikro-organismikantojen aikaansaamiseksi.

Esillä olevan keksinnön mukainen edullinen menetelmä käsittelee mikro-organismin, jolla on *A. calcoaceticus* ATCC 39647:n identifioivat ominaispiirteet, viljelemisen vesipitoisessa ravintoliuoksessa aerobisissa olosuhteissa mineraalisuolaväliaineessa, joka sisältää DL-karnitiinia ainoana hiililähteenä. Vaihtoehtoisesti, DL-karnitiini voidaan lisätä mikro-organismiviljelmään sen jälkeen kun sitä on kasvatettu ravintoliuoksessa.

DL-karnitiinin edullinen pitoisuus (hydrokloridina) on noin 0,1 - noin 100 grammaa litrassa, riippuen väliaineen DL-karni-

tiinin ja ammoniakkin pitoisuuksien suhteesta. On ymmärrettävää, että kasvavilla DL-karnitiinikloridin pitoisuuksilla tarvitaan enemmän ammoniumioneja D-isomeerin metaboloitumisen optiminopeuden saavuttamiseksi. On myös ymmärrettävää, että termejä DL-karnitiini ja DL-karnitiinikloridi käytetään erotuksetta selityksessä ja vaatimuksissa, koska niitä voidaan käyttää erotuksetta keksinnön mukaisessa menetelmässä, ellei toisin erityisesti ilmoiteta. Samanlaista vaihtovaroisuutta voidaan käyttää myös D- ja L-karnitiinin ja niitä vastaavien suolojen suhteen.

Prosessi voi kestää 24 tunnista 5 vuorokauteen tai kauemmin. Inkubointilämpötila on yleensä 25° - 37° C. Sisältöä ilmastetaan sopivasti steriilillä ilmalla ja sekoitetaan mikro-organismin kasvun edistämiseksi ja siten prosessin tehokkuuden lisäämiseksi.

Kun fermentointiprosessi on päättynyt, haluttu L-karnitiini otetaan talteen alalla hyvin tunnetuilla menetelmillä. Esimerkiksi, fermentointiliuos ja solut voidaan ensin erottaa tavanomaisilla menetelmillä, nimittäin suodattamalla tai sentrifugoimalla, minkä jälkeen fermentointiliuos voidaan tyhjiötislata kuiviin. Saatua jäännöstä, joka sisältää halutun L-karnitiinin, voidaan uuttaa vedettömällä etanolilla, etanolipitoinen uute haihdutetaan kuiviin tyhjiössä, ja L-karnitiini muutetaan hydrokloridisuolakseen käsittelemällä jäännöstä 6 N HCl:lla. Sen jälkeen kun vesipitoinen liuos on haihdutettu kuiviin, L-karnitiinikloridi voidaan kiteyttää absoluutisesta etanoli-asetoniseoksesta. Vaihtoehtoisesti L-karnitiinin sisäinen suola voidaan saada kromatografioimalla etanoliuutteen jäännös Dowex-1-OH ioninvaihtokolonnilla [F. Strack ja I. Lorenz, Z. Physiol. Chemie 318 (1960) 129].

On ymmärrettävää, että mikäli halutaan, mikro-organismin solut voidaan immobilisoida [S. Fukui, A. Tanaka, Ann. Rev. of Microbiol. 1982, Vol. 36, s. 145], mikä sallii menetelmän suorittamisen jatkuvatoimisesti. On myös ilmeistä, että lisäämään stereo-selektiivisyyttä, kasvualustaa voidaan muokata tai suorittaa mutantin edelleenmutatoimista.

Seuraavia esimerkkejä on pidettävä vain esillä olevaa keksintöä valaisevina, eikä niitä pidä tulkita rajoittaviksi. Prosentit on annettu painosta ja liuotinseososuudet on ilmaistu tilavuuksina ellei toisin ole ilmoitettu. Eristetty L-karnitiini karakterisoitiin protonimagneettiresonanssi-spektrianalyysillä, sulamispisteen avulla, liikkuvuuden avulla ohutkerroskromatografiassa ja optisen rotaation avulla.

Esimerkki 1

Acinetobacter calcoaceticus ATCC 39648:n villikannan (df-2) eristäminen

A. calcoaceticus ATCC 39648 eristettiin jätevesinäytteestä, joka oli saatu vaahdonerottimesta käyttäen valikoivaa alustaa seuraavan menetelmän mukaisesti:

Otettiin kymmenen millilitraa rasvamaista pintavettä viemäri-verkon vaahdonerottimesta (Nine Springs-käsittelylaitos, Madison, WI) ja 1 ml tätä näytettä lisättiin 250 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joka sisälsi 50 ml modifioitua Johnsonin alustaa (Alusta A):

Alusta A

Hiivauute (Difco)	50 mg
KH_2PO_4	5,5 g
Na_2HPO_4	10,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2,0 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,5 g
CaCl_2	15 mg
$\text{MgDO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,6 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,2 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2 mg
Deionisoitu tislattu vesi	1 litra

DL-karnitiini-HCl:a (Sigma) lisättiin (10 g/l) ja pH säädettiin 6,8:ksi 4 N NaOH:lla ennen steriloinnista 121°C:ssa 20 minuuttia. Siirrostettua pulloa inkuboitiin ravistelijassa (250 rpm, 2" tahtia, 27°C). 16 tunnin jälkeen siirrettiin yksi ml sameata lientä toiseen pulloon, joka sisälsi samanlaista alustaa ja reinkuboitiin ravistelijassa 16 tuntia. Menettely toistettiin kolmannen kerran, minkä jälkeen samea liemi laimennettiin sarjassa käyttäen M/15 fosfaattipuskuria, pH 7,4. Tasamäärä (0,1 ml) jokaista laimennosta levitettiin tasaisesti petrimaljan agarpinnalle, joka sisälsi 1 % DL-karnitiinia ja 2 % agarua modifioidussa Johnsonin alusta A:ssa. Erilaisia pesäketyyppejä valittiin maljoilta, jotka sisälsivät välillä 30 ja 300 pesäkettä per malja. Pesäkkeet siveltiin 1 % DL-karnitiinikloridilla modifioiduille Johnsonin alusta agarmaljoille ja niiden puhtaus testattiin. Sitten testattiin puhtaiden eristettyjen mikrobien kyky käyttää D-karnitiinia ja L-karnitiinia ainoana hiililähteenä modifioidulla Johnsonin alustalla, joka sisälsi 0,5 % joko D- tai L-karnitiinia. Havaittiin, että eristetty mikrobi "df-2" kasvoi huomattavasti nopeammin D-karnitiinilla kuin L-karnitiinilla. Täten tämä villikanta valittiin seuraaviin mutaatiotutkimuksiin.

Esimerkki 2

Mutantin *A. calcoaceticus* ATCC 39647:n valmistaminen *A. calcoaceticus* ATCC 39648:n villikannasta "df-2".

a) Nitrosoguanidiinimutagenointi

Villiä kantaa "df-2", identifioitu *Acinetobacter calcoaceticus* (University Hospital Clinical Microbiology Laboratory, Madison, WI) säilytettiin 1 % DL-karnitiinikloridilla modifioiduilla Johnsonin agaralustavinopinnoilla ja varastoitettiin 4°C:ssa. 250 ml Erlenmayer-pullo, joka sisälsi 50 ml 1 % DL-karnitiinilla modifioitua Johnsonin alustaa, siirrostettiin vinopinnalta ja sitten inkuboitiin 16 tuntia ravistelijassa (250 rpm, 2" tahti, 27°C). Tähän yön yli kasvaneeseen viljelmään lisättiin N-etyyli-N'-nitro-N-nitrosoguanidiinia (Aldrich) (NTG) lopulliseen pitoisuuteen 300 µg/ml alustaa. Pullo laitettiin takaisin ravistelijaan ja sitä inkuboitiin

täsmälleen 30 minuuttia. Aikaisemmin oli osoitettu, että 300 μ g NTG/ml alustaa 30 minuutissa tappoi noin 99,9 % elävistä soluista. 30 minuutin NTG:lle altistamisen jälkeen solut sentrifugoitiin alas (10 000 rpm, 15 minuuttia). Solukakku suspendoitiin uudelleen 5 ml:ssa modifioitua Johnsonin alustaa, joka sisälsi 1 % DL-karnitiinikloridia. Kaksi ml tätä suspensiota käytettiin siirrostamaan 250 ml Erlenmeyer-pullo, joka sisälsi 50 ml 1 % DL-karnitiinikloridilla modifioitua Johnsonin alustaa. Sen jälkeen kun pulloa oli inkuboitu ravistelijassa (200 rpm, 27°C) 16 tuntia, sameus määritettiin Gilford UV-näkyvävalo-spektrofotometrillä (Malli 240) määrittämällä absorbanssi 600 nm:ssä. Näistä tuloksista voitiin laskea sopiva laimennos käytettäväksi maljoilla ja mutanttien valikointiin.

b) Mutantti A. calcoaceticus ATCC 39647:n valikointi ja eristys

Mutatoidut solut, kuten yllä on kuvattu, laimennettiin sargassa M/15 fosfaattipuskurilla, pH 7,4, ja levitettiin maljoille, jotka sisälsivät 1 % DL-karnitiinikloridilla modifioitua Johnsonin agaralustaa. Noin neljän päivän inkuboinnin jälkeen 28°C:ssa saadut pesäkkeet replikoitiin modifioidulla Johnsonin agaralustalla A, joka sisälsi 0,5 % L-karnitiinia tai 0,5 % D-karnitiinia.

Pesäkkeet, jotka kasvoivat hyvin D-karnitiinimaljalla, mutta huonosti L-karnitiinimaljalla, puhdistettiin levittämällä 0,5 % D-karnitiinilla modifioiduille Johnsonin agarmaljoille (alusta A). Kasvamisen jälkeen 28°C:ssa pesäkkeet kerättiin agarmaljoilta vinopinnoille ja sitten kasvatettiin ravistelupulloissa.

c) Ravistelupullokasvatus

Ravistelupulloihin (250 ml), jotka sisälsivät 50 ml 1 % DL-karnitiinikloridilla modifioitua Johnsonin nestemäistä alustaa A, siirrostettiin useita silmukallisia agarvinopinalta otettuja soluja. 24 tunnin rotaatoravistelijassa pitämisen jälkeen 50 ml tätä sameata lientä käytettiin toisen

2 litran Erlenmayer-pullon siirrosteena, joka sisälsi 500 ml samaa alustaa. Sen jälkeen kun oli inkuboitu 27°C:ssa rotaatiotioravistelijassa (250 rpm, 2" tahtia) 44 tuntia, 100 ml pullon sisällöstä haihdutettiin kuiviin tyhjiössä ja jäännös uutettiin absoluuttisella etanolilla. Etanolipitoinen uute haihdutettiin jälleen kuiviin tyhjiössä ja jäännös liuotettiin 10 ml:aan 6 N HCl karnitiinin muuttamiseksi kloridisuolakseen. Vesipitoinen näyte konsentroitiin sitten kuiviin vakuumissa ja jäännös L-karnitiinikloridi kiteytettiin absoluuttisesta etanoli-asetonista. Tuotteen korkea negatiivinen rotaatio ($[\alpha]_D^{25} -23,07^\circ\text{C}$ (c, 3,5 H₂O)) vahvisti D-karnitiinin selektiivisen hajoamisen uudella mutantilla, joka oli saatu *A. calcoaceticus* ATCC 39648 isäntävilikannasta.

Acinetobacter calcoaceticus ATCC 39647:ksi ja ATCC 39648:ksi identifioituilla kannoilla on seuraavat ominaisuudet:

Morfologiset tunnusmerkit

Alusta - Difco ravintoagar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan);

Solun muoto ja koko - Sauvoja 1-1,6 μm halkaisijaltaan ja arviolta 1,5-22 μm pituudeltaan;

muuttuvat pyöreiksi (kokkisauvat) kasvun stationäärivaiheessa; usein esiintyvät pareittain ja vaihtelevan pituisina ketjuina. Ei flagelloita.

Ei itiöitä.

Gram-negatiivinen.

Ei käytä happoa.

Viljelmän kasvuolosuhteet

Alusta - Difco ravintoagar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan)

Pesäkkeet ovat melko suuria (2-3 mm 24 tunnissa), ovat sameita ja värittömiä;

Organismi voi kasvaa yksinkertaisella mineraalisuola-alustalla, joka sisältää yksinkertaista hiililähdettä, kuten etanolia, asetaattia, laktaattia, pyruvaattia, malaattia tai alfa-ketoglutaraattia;

Typpilähteinä toimivat ammoniumsuolat;
 Gelatiini ei nesteytynyt gelatiinipistoviljelmässä ja kasvu rajoittui 3 mm:iin alustan pinnasta;
 Emäsreaktio litmus-maidossa ilman koaguloitumista tai nesteytymistä ja hyvin huonoa kasvua.

Fysiologiset ominaisuudet

Nitraatin pelkistys - negatiivinen
 Denitrifikaatioreaktio - negatiivinen
 MR-koe - negatiivinen
 Indolin tuotto - negatiivinen
 VP-koe - negatiivinen
 Rikkivedyn tuotto - hyvin, hyvin heikkoa
 Tärkkelyksen hydrolyysi - negatiivinen
 Nitraatin käyttäminen - positiivinen
 Käyttää ammoniumsuoloja
 Värin tuotto - kellertävää solunsisäistä veteen liukenevaa pigmenttiä, joka vapautuu alustaan 2-3 päivän autolysoinnin jälkeen.
 Ureaasi - positiivinen
 Oksidaasi - positiivinen
 Kasvuolosuhteet - pH 5-8,5
 - lämpötila 5-35°C
 - ei kasva anaerobisesti millään alustalla.

Tuottaa happoja ja kaasuja seuraavasti:

		ATCC 39648		ATCC 39647	
		Avoin	Peitetty	Avoin	Peitetty
1)	L-arabinoosi	A	-	A	-
2)	D-ksyloosi	A	-	A	-
3)	D-glukoosi	A	A ^μ	A	-
4)	D-mannoosi	A	-	A	-
5)	D-fruktoosi	A ^μ	-	A ^μ	-
6)	D-galaktoosi	A	-	A	-
7)	maltoosi	-	-	-	-
8)	sakkaroosi	-	-	-	-
9)	laktoosi	-	-	-	-

	ATCC 39648		ATCC 39647	
	Avoin	Peitetty	Avoin	Peitetty
10) trehaloosi	-	-	-	-
11) D-sorbitaali	-	-	-	-
12) D-mannitoli	-	-	-	-
13) inositoli	-	-	-	-
14) glyseriini	-	-	-	-
15) tärkkelys	-	-	-	-

Avain: A = happoreaktio

μ = heikko reaktio

- = ei muutosta tai emäksinen reaktio

Muita tunnusmerkkejä

Hapettaa etyylialkoholia;

Omaa korkean natriumkloridin sietokyvyn (2-3 % NaCl);

Voi kasvaa 33°C:ssa,

Fenyylialaniini ei deaminoidu;

Lysiini ei dekarboksyloidu;

Ornitiini ei dekarboksyloidu.

Talletusnumeroilla ATCC 39647 ja 39648 identitoidut kannat tallennettiin American Type Culture Collectioniin, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776 huhtikuun 2., 1984.

Esimerkki 3

Edullinen D-karnitiinin käyttäminen A. calcoaceticus ATCC 39648:lla

Pintakasvusto yhden viikon vanhalta A, calcoaceticus ATCC 39648:n vinopinnalta suspendoitiin 5 ml suolaliuosta (0,85 %). Kaksi ml tätä suspensiota käytettiin siirrostaamaan 50 ml modifioitua Johnsonin alustaa A, joka sisälsi 1 % yllä mainittua Dl-karnitiinikloridia, ja jota pidettiin 250 ml:n Erlenmayer-pullossa (F-1 vaihe). Pulloa inkuboitiin 25°C:ssa rotaatoravistelijassa (250 rpm/min - 50 mm:n säde) 24 tuntia, minkä jälkeen siirrettiin 10 tilavuus-% kahden litran Erlenmayer-pulloon (F-2 vaihe), joka sisälsi 500 ml samaa alustaa. Oltuaan 12 tuntia rotaatoravistelijassa 100 ml alustaa poistettiin ja sentrifugoitiin ja sitten haihdutettiin kuiviin tyhjiössä. Jäännöstä uutettiin

kuumalla etanolilla ja etanolipitoinen uute konsentroitiin kuiviin tyhjiössä. Jäännös liuotettiin 10 ml:aan 6 N HCl ja vesipitoinen liuos konsentroitiin kuiviin. Jäännöksen kiteytys absoluuttisesta etanoli-asetonista tuotti karnitiinikloridinäytteen (216 mg, 43 % saanto) ($[\alpha]_D^{25} -12,0^\circ$) (c, 7,2 H₂O) osoittaen 0,51:n enantiomeeristä ylimäärää (ee).

Esimerkki 4

Yhden viikon vanhan *A. calcoaceticus* ATCC 39648:n vinopinnan pintakasvusto suspendoitiin 5 ml:aan alustaa A. Neljä ml tätä suspensiota käytettiin siirrostamaan 50 ml modifioitua Johnsonin alustaa A, joka sisälsi yllä mainittua DL-karnitiinikloridia 250 ml Erlenmayer-pullossa (F-1 vaihe). Pulloa inkuboitiin 25°C:ssa rotaatoravistelijassa (250 rpm/min - 50 mm:n säde) 24 tuntia, minkä jälkeen 10 tilavuus-% siirrettiin kahden litran Erlenmayer-pulloon (F-2 vaihe), joka sisälsi 500 ml seuraavaa alustaa (alusta B):

Alusta B

Hiivauute (Difco)	50 mg
KH ₂ PO ₄	5,5 g
Na ₂ 4PO ₄	10,0 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	3,5 mg
CaCl ₂	15 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,6 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,2 mg
Deionisoitu tislattu vesi	1 litra

Lisättiin DL-karnitiini-HCl:a (Sigma) (20 g/l) ja pH säädettiin 6,8:ksi 4 N NaOH:lla ennen sterilointia 121°C:ssa 20 minuuttia.

44 tunnin inkuboinnin jälkeen rotaatoravistelijassa 25°C:ssa, 50 ml sisällöstä sentrifugoitiin solujen poistamiseksi ja supernatantti haihdutettiin sitten kuiviin. L-karnitiinikloridi (196 mg, 38 % saanto) eristettiin esimerkissä 3 kuvatun menetelmän mukaisesti. Optisen puhtauden arvioitiin olevan suurempi kuin 96,5 % ee arvosta $[\alpha]_D^{25} -22,9^\circ$ (c, 2,65 H₂O).

Esimerkki 5

Esimerkin 4 mukainen menetelmä toistettiin paitsi, että DL-karnitiinikloridin pitoisuus F-2 vaiheessa oli 50 g/l 250 ml:n Erlenmayer-pullossa, joka sisälsi 50 ml samaa alustaa. Sen jälkeen kun F-2 vaiheen oli annettu jatkua 68 tuntia, L-karnitiinikloridi (180 mg, 42 % saanto) eristettiin samalla menetelmällä (esimerkki 3) 17 ml:sta fermentointiliuosta. Näytteen optinen puhtaus oli suurempi kuin 86 % ee, kuten arvo $[\alpha]_D^{25} -20,43^\circ$ (c, 2,36 H₂O) osoitti.

Esimerkki 6

Toistettiin esimerkin 2c mukainen menetelmä paitsi, että 1 % DL-karnitiinikloridipitoisuus koostui seoksesta, jossa oli 0,3 % L-karnitiinikloridia ja 0,7 % D-karnitiinikloridia alustalla A. Fermentointi suoritettiin 2 litran Erlenmayer-pullossa, joka sisälsi 250 ml alustaa A, käyttäen A. calcoaceticus ATCC 39647:ää. Sen jälkeen kun F-2 vaiheen oli annettu jatkua 44 tuntia, 100 ml liuoksesta poistettiin ja L-karnitiinikloridi eristettiin $\underline{36}$ mg (12 % saanto), $[\alpha]_D^{25} -21,2^\circ$, c, 3,6 H₂O.

Esimerkki 7

Esimerkin 2c mukainen menetelmä toistettiin paitsi, että 2 % karnitiinikloridipitoisuus koostui seoksesta jossa oli 1,6 % L-karnitiinikloridia ja 0,4 % D-karnitiinikloridia alustalla A käyttäen A. calcoaceticus ATCC 39647:ää. Sen jälkeen kun F-2 vaiheen oli annettu jatkua 44 tuntia, 100 ml liuosta

poistettiin ja L-karnitiinikloridi eristettiin $\underline{551}$ mg (34 % saanto), $\underline{\alpha}\text{-}\underline{\gamma}_D^{25} -23,05^\circ$, c, 2,6, H_2O .

Esimerkki 8

Esimerkin 2c mukainen menetelmä toistettiin paitsi, että DL-karnitiinikloridipitoisuus vaihetta F-2 varten oli 50 g/l, joka käsitti 3 osaa L-karnitiinikloridia ja 7 osaa D-karnitiinikloridia 250 ml:ssa alustaa B kahden litran Erlenmayer-pullossa 69 tunnin inkuboinnin jälkeen *A. calcoaceticus* ATCC 39647:llä (F-2 vaihe). 50 ml liuosta sentrifugoitiin (9 000 x 6, 20 minuuttia) solujen poistamiseksi. Supernatantti haihduutettiin kuiviin tyhjiössä ja jäännös uutettiin vedettömällä etanolilla. Etanolipitoinen uute konsentroitiin kuiviin ja jäännös liuotettiin tislattuun veteen ja kromatografoitiin Dowex 1-X-4 OH-kolonnilla (5 x 22 cm), jolloin saatiin L-karnitiinia $\underline{140}$ mg (23 % saanto), $\underline{\alpha}\text{-}\underline{\gamma}_D^{25} -29,2^\circ$, c, 1,5 H_2O .

Esimerkki 9

Esimerkin 8 mukainen menetelmä toistettiin paitsi, että DL-karnitiinikloridin pitoisuus F-2 vaiheessa oli 50 g/l, joka sisälsi 8 osaa L-karnitiinikloridia ja 2 osaa D-karnitiinikloridia. L-karnitiinin sisäinen suola eristettiin kuten aikaisemmin 50 ml:sta fermentointiseosta (F-2 vaihe, 69 tuntia) $\underline{1,216}$ g (75 % saanto), $\underline{\alpha}\text{-}\underline{\gamma}_D^{25} -30,4^\circ$, c = 2,8 H_2O .

Esimerkki 10

Esimerkin 8 mukainen menetelmä toistettiin paitsi, että DL-karnitiinikloridin pitoisuus F-2 vaiheessa oli 50 g/l. Sen jälkeen kun F-2 vaiheen oli annettu jatkua 90 tuntia, 40 ml fermentointiliuosta poistettiin ja sentrifugoitiin. L-karnitiinin sisäinen suola eristettiin kuten ennen $\underline{0,62}$ g (75 % saanto), $\underline{\alpha}\text{-}\underline{\gamma}_D^{25} -27,0^\circ$, c = 4,4 H_2O .

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä L-karnitiinin tai sen suolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että DL-karnitiinin tai sen suolan raseeminen seos altistetaan entsyymien fermentatiiviselle toiminnalle, joita tuottavat mikro-organismit, edullisesti suvun Neisseriaceae, erityisesti laji Acinetobacter tai sen mutantti, jolle on tunnusomaista sen ainutlaatuinen kyky hajottaa ensisijaisesti luonnossa esiintymätöntä muotoa, D-karnitiinia, mainitussa seoksessa sallien halutun luonnollisen muodon, L-karnitiinin, akkumuloitumisen.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että bakteerilla on Acinetobacter calcoaceticus ATCC 39647:n tai ATCC 39648:n tai niiden mutantin tunnusmerkit.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että se suoritetaan mikro-organismin kasvaessa viljelmässä vesipitoisella ravintoalustalla, joka edullisesti sisältää mineraalisuoloja, mineraali-ioneja ja DL-karnitiinia ainoana hiililähteenä, aerobisissa olosuhteissa, edullisesti lämpötilassa 25-37°C.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mineraalisuola-alusta on Johnsonin alusta A tai B.
5. Patenttivaatimuksen 3 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että karnitiinin D-isomeerin metabolianopeus kasvaa, kun lisätään reaktioväliaineen ammoniumionipitoisuutta DL-karnitiinipitoisuuden lisääntyessä.
6. Minkä tahansa edellä olevan vaatimuksen mukainen menetelmä DL-karnitiinin hajottamiseksi, ilman että ensin tarvitsee valmistaa sen johdannaisia, t u n n e t t u siitä, että DL-karnitiini per se altistetaan entsyymien fermentatiiviselle toiminnalle, joita tuottavat mainitut mikro-organismit, luonnossa esiintymättömän D-muodon ensisijaiseksi hajottamiseksi ja L-muoto otetaan talteen reaktioväliaineesta.

7. Suvun Neisseriaceae-bakteeri, edullisesti laji *Acinetobacter* tai sen mutantti tai geneettisesti saatu variantti, t u n n e t t u siitä, että niillä on kyky hajottaa DL-karnitiinin raseemista seosta hajottamalla ensisijaisesti luonnossa esiintymätöntä karnitiinin D-muotoa raseemisessa seoksessa sallien L-muodon akkumuloitumisen.
8. *Acinetobacter calcoaceticus*-lajin mikro-organismi tai sen mutantti tai geneettisesti saatu variantti.
9. *Acinetobacter calcoaceticus*-mikro-organismi, jolla on ATCC 39648:n identifiointiominaisuudet.
10. *Acinetobacter calcoaceticus*-kannan mikro-organismi, jolla on ATCC 39647:n identifiointiominaisuudet.
11. *Acinetobacter calcoaceticus*-mikro-organismeja sisältävä viljelmä, t u n n e t t u siitä, että se kykenee hajottamaan DL-karnitiinin raseemista seosta ensisijaisesti hajottamalla luonnossa esiintymätöntä D-muotoa raseemisessa seoksessa.