



CONFÉDÉRATION SUISSE
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑤① Int. Cl.³: C 12 P 13/00
C 07 C 101/30

Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein



⑫ FASCICULE DU BREVET A5

⑪

634 878

⑫① Numéro de la demande: 7505/78

⑫② Date de dépôt: 11.07.1978

⑫③ Priorité(s): 18.07.1977 FR 77 22183

⑫④ Brevet délivré le: 28.02.1983

⑫⑤ Fascicule du brevet
publié le: 28.02.1983

⑦③ Titulaire(s):
Institut Français du Pétrole, Rueil-Malmaison
(FR)

⑦② Inventeur(s):
Jean-Paul Vandecasteele, Fourqueux (FR)
Jeannine Lemal, Rueil-Malmaison (FR)

⑦④ Mandataire:
Gilbert Hochstrasser, Collonge-Bellerive

⑤④ Synthèse enzymatique de la L-carnitine.

⑤⑦ Procédé de synthèse de la L-carnitine consistant
à soumettre la 3-déshydrocarnitine à l'action de
la carnitine déshydrogénase, d'un coenzyme tel que
le nicotinamide adénine dinucléotide et d'un système
réducteur du coenzyme.

REVENDECATIONS

1. Procédé de production de L-carnitine, qui consiste à soumettre la 3-déshydrocarnitine ou l'un de ses sels à l'action simultanée, en milieu aqueux, de:

- a) la carnitine déshydrogénase,
- b) un coenzyme utilisable par la carnitine déshydrogénase pour la réduction de la déshydrocarnitine, et
- c) un agent réducteur du coenzyme utilisé.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le coenzyme b est présent en quantité catalytique.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel la carnitine déshydrogénase est présente en quantité catalytique.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel le coenzyme est le nicotinamide adénine dinucléotide.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel la déshydrocarnitine est injectée sous la forme d'une solution de pH inférieur à 2 en proportion limitante.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la carnitine déshydrogénase est produite par une bactérie du genre *Pseudomonas*.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel la carnitine déshydrogénase est produite par une bactérie appartenant au groupe des *Pseudomonas* fluorescents.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel l'agent réducteur du coenzyme est constitué par un système comprenant au moins deux éléments:

- a) un composé comportant une fonction oxydable, un formiate ou l'hydrogène moléculaire, l'élément a étant utilisé en quantité au moins stœchiométrique par rapport à la 3-déshydrocarnitine, et
- b) un enzyme approprié à l'oxydation de l'élément a.

9. Procédé selon la revendication 8 dans lequel le système réducteur du coenzyme comprend:

- a) le glucose, et
- b) la glucose déshydrogénase.

10. Procédé selon la revendication 8 dans lequel le système réducteur du coenzyme comprend:

- a) un formiate, et
- b) le formiate déshydrogénase.

11. Procédé selon la revendication 8, dans lequel le système réducteur du coenzyme comprend:

- a) l'éthanol, et
- b) l'alcool déshydrogénase.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel l'acétaldéhyde formé par oxydation de l'éthanol est éliminé au fur et à mesure de sa formation.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel l'agent réducteur du coenzyme est constitué par un dithionite de métal alcalin.

14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, dans lequel le pH auquel est effectuée la réaction est situé entre 6,5 et 8,5.

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, dans lequel la température à laquelle est effectuée la réaction est située entre 20 et 45°C.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, dans lequel un ou deux des enzymes utilisés dans la synthèse est (sont) sous forme de suspension de cellules de micro-organismes contenant le ou les enzymes correspondants.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, dans lequel un ou deux des enzymes utilisés dans la synthèse est (sont) sous forme immobilisée.

18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, dans lequel on opère à 10-60°C à pH de 5,5 à 10.

19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, dans lequel on opère à un pH de 6,5 à 8,5.

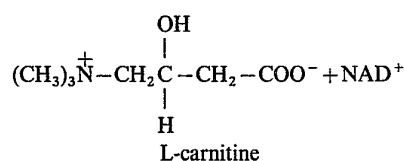
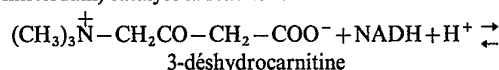
Des synthèses chimiques de la carnitine ont été décrites, mais elles fournissent le mélange racémique alors que le produit recherché pour son activité biologique est la L-carnitine.

La présente invention consiste en un procédé de préparation de la L-carnitine par réduction asymétrique de la 3-déshydrocarnitine dont la synthèse chimique a été décrite, par exemple, par Aurich et coll., «Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.», 349, 1310 (1968). Le procédé consiste à soumettre la 3-déshydrocarnitine ou l'un de ses sels à l'action simultanée en milieu aqueux des éléments suivants:

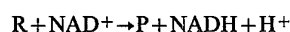
- a) la carnitine déshydrogénase,
- b) un coenzyme utilisable par la carnitine déshydrogénase pour la réduction de la déshydrocarnitine, tel que le nicotinamide adénine dinucléotide; dans la suite de l'exposé, on ne mentionnera que ce dernier composé dont l'emploi est préféré selon l'invention.
- c) un agent réducteur du coenzyme utilisé, cet agent réducteur pouvant être un agent réducteur chimique ou un système réducteur enzymatique, ce dernier étant composé d'un réducteur R et d'un enzyme E.

Les éléments a et b ainsi que l'enzyme E éventuellement utilisé en c sont employés de préférence en quantité catalytique. Le réducteur R utilisé en c est, par contre, un réactif et doit être présent en quantité substantielle, de préférence en quantité au moins stœchiométrique par rapport à la 3-déshydrocarnitine.

On peut interpréter de la façon suivante la réaction effectuée: la carnitine déshydrogénase qui porte le numéro E.C. 1.1.1.108 dans la nomenclature internationale des enzymes de 1972 (publiée par Elsevier, Amsterdam) catalyse la réaction:



Le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) est, dans cette réaction, oxydé à l'état de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). Il est ramené sous forme de NADH dans une deuxième réaction par un réducteur R qui est oxydé en un produit P. Cette deuxième réaction est, dans certains cas, catalysée par un enzyme E. On peut l'écrire sous la forme:



Le bilan global de synthèse de la L-carnitine s'écrit donc: Réducteur (R) + 3-déshydrocarnitine → Produit (P) + L-carnitine.

L'avantage d'un tel système est évident puisque le nicotinamide adénine nucléotide qui est un produit coûteux (sous forme réduite ou oxydée) peut n'être utilisé qu'en quantité catalytique.

La synthèse de la L-carnitine s'effectue dans un réacteur maintenu à une température comprise entre 10 et 60°C, de préférence entre 20 et 45°C. Le pH du milieu est maintenu, par exemple au moyen d'un dispositif de contrôle automatique, à une valeur choisie entre 5,5 et 10. Un pH situé entre 6,5 et 8,5 est particulièrement favorable pour la stabilité des enzymes utilisés et du nicotinamide adénine dinucléotide. Le choix du pH est en effet important pour ce dernier composé dont la forme réduite (NADH) est instable en milieu acide et la forme oxydée (NAD⁺) instable en milieu alcalin. La présence dans le milieu d'un tampon, par exemple un sel soluble de l'acide phosphorique tel qu'un phosphate d'ammonium, de sodium ou de potassium, peut être dans certains cas utile pour maintenir le pH du milieu et la stabilité des enzymes.

On introduit dans le réacteur les éléments nécessaires à la synthèse considérée, c'est-à-dire le NAD⁺ (ou le NADH), la carnitine déshydrogénase, le réducteur R (et éventuellement l'enzyme E qui en catalyse l'oxydation). Il peut contenir en outre un tampon et des agents de stabilisation des enzymes. Parmi ces derniers, les composés comportant un groupement thiol tel que le 2-mercaptoéthanol, le

dithiothréitol, etc., sont particulièrement efficaces. D'une façon habituelle cependant, on préfère éviter la présence dans le réacteur d'une concentration importante de 3-déshydrocarnitine, car on a constaté que ce produit se décarboxylait très rapidement à tous les pH, excepté aux pH très acides (inférieurs à 2). Pour cette raison, on préfère introduire de façon continue dans le réacteur ce composé sous la forme d'une solution très acide. Dans ce cas, le débit d'injection est réglé pour que le paramètre limitant de la réaction soit l'apport de déshydrocarnitine, ce dernier composé étant immédiatement transformé en L-carnitine au fur et à mesure de son introduction dans le réacteur. L'apport de déshydrocarnitine est dit limitant lorsqu'une modification en plus ou en moins de cet apport entraîne une modification dans le même sens de la vitesse de production de L-carnitine.

Lorsqu'une quantité suffisante de L-carnitine a été produite, on peut l'extraire du milieu liquide, par exemple par passage sur une résine échangeuse d'ions. Après élution, on peut l'obtenir sous forme solide par évaporation sous vide.

Les enzymes et le nicotinamide adénine nucléotide qui ont un rôle catalytique dans cette synthèse sont donc réutilisables et leur coût peut justifier dans certains cas leur récupération en fin de réaction. Pour les enzymes, cette récupération est particulièrement simple (par exemple par décantation ou filtration) lorsqu'on les utilise sous forme immobilisée sur un support solide. Ces enzymes peuvent être utilisés sous forme purifiée ou non; on peut aussi, dans des conditions appropriées, employer directement les micro-organismes contenant les enzymes nécessaires. En ce qui concerne le nicotinamide adénine dinucléotide, sa récupération pour une utilisation ultérieure peut être effectuée par exemple par passage sur une colonne garnie d'un adsorbant convenable comme le charbon actif.

Lorsque l'on utilise le nicotinamide adénine dinucléotide sous forme de dérivé à haut poids moléculaire soluble ou sous forme fixée à un support soluble, sa récupération est possible par dialyse, dans le premier cas, ou par simple décantation, dans le second cas.

Les coenzymes utilisables par la carnitine déshydrogénase pour la réduction de la déshydrocarnitine sont le nicotinamide adénine dinucléotide ou ses équivalents fonctionnels qui sont en général des composés dont la structure est du type pyridine purine dinucléotide, par exemple le nicotinamide hypoxanthine dinucléotide ou l'acétylpyridine adénine dinucléotide. Ces coenzymes peuvent être fixés à un dérivé de haut poids moléculaire soluble ou à un support solide, comme il a été dit plus haut. On préfère utiliser le nicotinamide adénine dinucléotide en raison de l'activité élevée qu'il permet d'obtenir pour la réduction de la déshydrocarnitine.

Les enzymes nécessaires à la synthèse effectuée sont obtenus généralement par culture d'un micro-organisme producteur dans des conditions appropriées. Certains de ces enzymes sont disponibles commercialement. En ce qui concerne la carnitine déshydrogénase, on a constaté que les bactéries du genre *Pseudomonas*, en particulier les *Pseudomonas* du groupe fluorescent tel que défini par Stanier et coll. («J. Gen. Microbiol.», 43, 159-271, 1966) constituaient une bonne source de cet enzyme. On peut notamment utiliser des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* (ou *Pseudomonas ovalis*), par exemple *P. putida* T₁ et *P. putida* 572 de la collection de l'Institut français du pétrole, *P. putida* CIP 52191 (CIP désignant la collection de l'Institut Pasteur), *Pseudomonas fluorescens*, par exemple *P. fluorescens* CIP 7325 ou *P. fluorescens* CIP 6913.

Le système de réduction du NAD⁺ (encore appelé système de régénération du NADH) peut être chimique. Il est alors constitué du réducteur R qui peut être, par exemple, un dithionite de métal alcalin ou l'hydrogène en présence d'un catalyseur actif, par exemple un métal noble du groupe VIII tel que le platine. Quand le système de régénération du NADH est enzymatique, les réducteurs R utilisables sont très divers et sont des composés dont l'oxydation est catalysée par une déshydrogénase capable d'utiliser le NAD⁺, c'est-à-dire un enzyme de la classe 1.1.1. de la nomenclature internationale des enzymes mentionnée plus haut. Cette dernière constitue alors l'enzyme E en général spécifique du réducteur R utilisé qui est alors appelé substrat de l'enzyme E. Le système de régénération du NADH est de

préférence choisi pour que le réducteur R soit un composé peu coûteux et que l'enzyme E soit obtenu aisément notamment par culture d'un micro-organisme approprié. On utilise par exemple l'alcool déshydrogénase (E.C. 1.1.1.1) que l'on peut obtenir en quantité importante à partir de la levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) et dont le substrat est l'éthanol (réaction catalysée: éthanol + NAD⁺ ⇌ acétaldéhyde + NADH + H⁺). Un autre exemple est celui de la glucose déshydrogénase (E.C. 1.1.1.47) (réaction catalysée:

glucose + NAD⁺ ⇌ gluconolactone + NADH + H⁺) que l'on peut obtenir notamment par culture de bactéries du genre *Bacillus*, en particulier *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*. L'utilisation de ce dernier système s'est montrée particulièrement intéressante, car la glucose déshydrogénase est d'une bonne stabilité dans les conditions utilisées, et les rendements en carnitine ont été excellents, comme l'illustrent les exemples donnés ci-dessous. On peut penser que ces bons rendements résultent au moins en partie du fait que la réaction d'oxydation du glucose est fortement favorisée parce que le produit formé, la gluconolactone, s'hydrolyse spontanément en acide gluconique, favorisant ainsi fortement la formation de

NADH. D'autres réactions où la formation de NADH est favorisée présentent en outre un autre point d'intérêt. C'est le cas des réactions catalysées par les hydrogénases, notamment les hydrogénases à NAD⁺ (hydrogène: NAD⁺ oxydoréductases E.C. 1.1.2.1.2) que l'on peut obtenir à partir des bactéries utilisant l'hydrogène aérobiquement, par exemple *Alcaligenes eutrophus* (*Hydrogenomonas eutrophus*), *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas ruhlandii*, *Nocardia opaca*. La réaction catalysée par cet enzyme: H₂ + NAD⁺ ⇌ NADH + H⁺ présente en effet l'avantage qu'elle évite tout problème de séparation de la L-carnitine synthétisée d'avec un produit

ou un réactif de la réaction de formation du NADH. Des avantages similaires (réaction favorisant la formation de NADH, absence de produits à séparer) se retrouvent dans l'utilisation de la formiate déshydrogénase (E.C. 1.2.1.2) qui catalyse la réaction: HCOO⁻ + NAD⁺ → CO₂ + NADH. La source de l'ion HCOO⁻ peut être un sel soluble de l'acide formique, par exemple un sel de sodium, de potassium ou d'ammonium. La formiate déshydrogénase peut être obtenue notamment par culture de micro-organismes méthylotrophes stricts (n'assimilant que le méthane, le méthanol ou la méthylamine) tels que les bactéries appartenant aux groupes *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, ou de méthylotrophes facultatifs (assimilant tant les composés à un atome de carbone que d'autres sources de carbone). Parmi ces derniers, on peut utiliser des levures appartenant notamment aux genres *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis* ou des bactéries appartenant en particulier aux genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*.

Les exemples suivants, donnés à titre non limitatif, illustrent l'invention. Dans ce qui suit, on entend par M ou mM la concentration d'une solution exprimée en moles ou millimoles de soluté par litre de solution.

Exemple 1:
Production de la carnitine déshydrogénase

On a cultivé une souche de *Pseudomonas putida* (*P. putida* CIP 52191) dans deux fioles de Fernbach de 1 l contenant chacune 200 ml de milieu minéral comprenant par litre d'eau distillée:

PO ₄ H ₂ K	4 g
PO ₄ HNa ₂ , 12 H ₂ O	6 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,3 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	1 mg
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,1 mg
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,1 mg
MnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,04 mg

On a ajouté à ce milieu minéral 20 g/l de chlorhydrate de DL-carnitine comme seule source de carbone et d'azote (nécessaire pour l'induction de la synthèse de la carnitine déshydrogénase par la bactérie). Le pH du milieu a été ajusté à 7,0 par la potasse et, après stéri-

lisation par autoclavage à 115° C pendant 20 min, on a ensemencé avec 10 ml d'une culture faite dans les mêmes conditions à partir d'un échantillon de la souche conservée sur gélose. La culture a été effectuée à 30° C pendant 24 h avec agitation (mouvement alternatif à 80 périodes/min). On a récolté les cellules à 4° C par centrifugation; on a obtenu 3,6 g de cellules (poids humide) pour 400 ml de milieu.

Les cellules ont été suspendues dans un tampon phosphate de potassium (100 mM) à pH 7,0 (3,6 g de cellules dans 6 ml de tampon) et cassées par traitement aux ultrasons à une température entre 0 et 10° C. Le surnageant obtenu après centrifugation constituait l'extrait enzymatique utilisé. Cet extrait contenait 95 mg/ml de protéines et possédait une activité carnitine déshydrogénase de 0,55 unité par milligramme de protéines. (L'unité enzymatique internationale est employée pour tous les enzymes utilisés dans la présente invention. Elle est définie comme l'activité permettant la transformation de 1 µmol de substrat par minute; les conditions de mesure adoptées ici étant une concentration de substrat saturante, le pH d'activité maximale et une température de 30° C.)

Synthèse de la L-carnitine

La synthèse de la L-carnitine a été effectuée dans un réacteur contenant 51 ml d'un milieu contenant les composants suivants aux concentrations indiquées en millimoles par litre (mM): phosphate d'ammonium 100 mM (pH 6,8), NAD⁺ 1 mM, dithiothréitol 0,2 mM, glucose 200 mM. On y a ajouté alors la glucose déshydrogénase (enzyme purifiée Boehringer réf. 171697) 0,5 ml (75 unités) et 0,5 ml de l'extrait de carnitine déshydrogénase (26 unités). On a commencé alors l'injection dans le réacteur d'une solution aqueuse 0,4M de chlorhydrate de déshydrocarnitine (amenée à pH 0,5 par addition d'acide chlorhydrique). Le débit d'injection était de 0,5 ml/h. Le réacteur était thermostaté à 25° C et le pH était maintenu à 6,8 par l'addition d'ammoniaque N contrôlée par un pH-mètre régulateur. Après 40 ½ h la réaction a été arrêtée. La L-carnitine formée a été dosée enzymatiquement au moyen de la carnitine acétyltransférase. Une concentration 80 mM de L-carnitine a été mesurée dans un volume de 95,5 ml, ce qui correspond à la production de 1,5 g de carnitine (exprimée ici et dans la suite du texte sous forme de chlorhydrate) avec un rendement de 94% par rapport au chlorhydrate de déshydrocarnitine.

Purification de la L-carnitine

Le milieu réactionnel a été versé en haut d'une colonne de résine échangeuse de cations Dowex AG 50W-X8 de 20 × 200 mm. Cette colonne avait été préalablement mise sous forme H⁺ par lavage avec 350 ml de HCl à 10% puis 500 ml d'eau. Après introduction de l'échantillon, la colonne a été lavée par 400 ml d'eau, puis éluée par une solution normale d'ammoniaque. La fraction sortant de la colonne (entre 150 et 225 ml) après le début de l'éluion avec l'ammoniaque a été recueillie. Le dosage avec la carnitine acétyltransférase a indiqué qu'elle contenait 1,48 g de carnitine. L'échantillon a été ensuite évaporé sous vide, redissous dans l'eau (15 ml) et à nouveau évaporé. La carnitine base contenue a été mise sous forme de chlorhydrate par addition de 8 ml d'une solution normale de HCl et à nouveau évaporée. Le produit déliquescant obtenu a été dissous dans 75 ml d'un mélange anhydre en proportions 3/2 d'acétone et d'éthanol. On a ajouté à la solution 210 ml d'acétone à 0° C et on l'a placé à -9° C pendant 12 h. Les cristaux recueillis ont été lavés à l'éther, puis séchés sous vide. Un poids de 0,91 g de carnitine a été obtenu. Le produit final, par dosage à la carnitine acétyltransférase, contenait 89,5% de chlorhydrate de L-carnitine. Il a été obtenu avec un rendement global de 57% par rapport au chlorhydrate de déshydrocarnitine.

Exemple 2:

On a utilisé pour cette synthèse la carnitine déshydrogénase obtenue comme dans l'exemple 1. La synthèse de L-carnitine a été effectuée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 1, sauf en ce qui concerne le système de régénération du NADH, car on a employé ici le système alcool déshydrogénase de levure et éthanol au lieu du sys-

tème glucose déshydrogénase et glucose. Le glucose est donc remplacé dans le milieu réactionnel par de l'éthanol (concentration dans le réacteur 4% en volume) et la glucose déshydrogénase par 4 mg (700 unités) d'alcool déshydrogénase de levure purifiée (Sigma réf. A 3263). De plus, on a effectué un barbotage d'azote (80 ml/min) dans le réacteur pour éliminer l'acétaldéhyde formé par oxydation de l'alcool, et faciliter ainsi la régénération du NADH. Après 30 h, on a produit dans le réacteur 0,325 g de L-carnitine avec un rendement de 27% à partir du chlorhydrate de déshydrocarnitine.

Exemple 3:

On a effectué la synthèse de la carnitine comme dans l'exemple 2, mais le système générateur de NADH comprenait cette fois, en plus de l'alcool déshydrogénase, l'aldéhyde déshydrogénase (E.C. 1.2.1.5) qui oxyde l'aldéhyde (formé par action de l'alcool déshydrogénase sur l'éthanol) en acide acétique. On formait donc deux molécules de NADH à partir d'une molécule d'éthanol (au lieu d'une dans l'exemple précédent) et, de plus, l'équilibre réactionnel était fortement déplacé en faveur de la formation de NADH et d'acide acétique. Il n'y avait donc plus lieu d'éliminer l'acétaldéhyde formé comme dans l'exemple précédent. Les conditions étaient donc celles de l'exemple 2, mais on a ajouté au milieu réactionnel 125 unités d'aldéhyde déshydrogénase purifiée (Boehringer réf. 171832) et supprimé le barbotage d'azote. Après 24 h, on a produit dans le réacteur 0,764 g de L-carnitine avec un rendement de 77,5% par rapport au chlorhydrate de déshydrocarnitine.

Exemple 4:

On a effectué la synthèse de la carnitine comme dans l'exemple 2, mais l'alcool déshydrogénase de levure, au lieu d'être utilisé sous forme d'enzyme libre purifiée, a été utilisé sous forme non purifiée et insolubilisée. On a utilisé en fait les cellules elles-mêmes de levure de boulangerie (qui sont riches en alcool déshydrogénase) après un traitement de perméabilisation et immobilisation dans un gel de polyacrylamide. Le traitement de perméabilisation a été effectué de la façon suivante: 18 g de cellules de levure de boulangerie du commerce ont été suspendues dans 36 ml de tampon phosphate de potassium (40 mM) à pH 8. On a centrifugé et, après décantation, les cellules ont été reprises dans 36 ml du même tampon. On a ajouté 1,8 ml d'un mélange 1:4 en volume de toluène et d'éthanol et on a incubé 30 min à 30° C. Puis on a centrifugé et on a lavé deux fois avec 36 ml de tampon. Les cellules ainsi perméabilisées ont été immobilisées dans un gel préparé en resuspendant les cellules dans 4 ml de tampon phosphate (40 mM) à pH 8 et en y ajoutant 500 mg d'acrylamide, 40 mg de N,N'-méthylènebisacrylamide, 0,5 ml de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine à 0,805% et 0,5 ml de persulfate d'ammonium à 2,5%. La solution a été versée dans un récipient rempli de billes de verre de 2 mm de diamètre. On a laissé la polymérisation s'effectuer 1 h à 30° C. On a éliminé les billes, ce qui a fourni un gel fragmenté qu'on a lavé avec le même tampon.

Ce gel a été introduit dans le réacteur et la synthèse de la carnitine a été effectuée. Dans ces conditions, on a produit en 25 h 0,436 g de L-carnitine à partir de 1,105 g de chlorhydrate de déshydrocarnitine.

Exemple 5:

On a effectué la synthèse de la carnitine comme dans l'exemple 1, mais on a remplacé le système générateur de NADH, glucose et glucose déshydrogénase, par le système formiate de sodium utilisé à une concentration de 150 mM et formiate déshydrogénase (quantité utilisée: 9 unités). Dans ces conditions, on a synthétisé en 15 h 80 mg de L-carnitine à partir de 590 mg de chlorhydrate de carnitine.

La préparation de formiate déshydrogénase utilisée dans cet essai a été réalisée de la façon suivante: on a utilisé la levure *Torulopsis candida* GFP 206 déposée au Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology of Japan MITI (Bikoken) sous le numéro 3645. On a cultivé cette levure avec le méthanol comme source de carbone dans les conditions décrites dans l'exemple

4 du brevet français N° 75.24320 du 30 juillet 1975. Les cellules ont été recueillies par décantation et 40 ml du sédiment ont été additionnés de 6 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M (pH 6,8) et de 30 g de billes de verre (diamètre 0,5 mm) et broyées par agitation avec un broyeur (3 périodes de 1 min à une température inférieure à 10°C). Après centrifugation, le surnageant a été ajusté à une concentration de sulfate d'ammonium de 350 g/l. Le précipité a été éliminé et la concentration en sulfate d'ammonium du surnageant a été portée à 500 g/l. Le précipité formé a été recueilli et dialysé contre du tampon phosphate de potassium (50 mM) pH 6,8. Il a constitué la préparation de formiate déshydrogénase utilisé pour la synthèse de la carnitine.

Exemple 6:

La régénération du NADH a été effectuée dans cette synthèse par voie chimique, le dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) étant le réducteur utilisé. La synthèse a été effectuée en l'absence d'oxygène, le dithionite s'oxydant à l'air. Le dithionite a été, de plus, injecté sous forme de solution alcaline au fur et à mesure de son utilisation, car il se décompose en milieu acide ou neutre. Le milieu réactionnel contenait dans un volume de 50 ml: tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,8, dithionite de sodium 10 mM, NAD 1 mM, carnitine déshydrogénase (obtenue comme dans l'exemple 1) 0,5 ml. Un courant

d'azote (20 ml/min) était établi dans le réacteur. La déshydrocarnitine était injectée comme dans l'exemple 1 et la solution de dithionite de sodium 600 mM (qui contenait aussi du carbonate bipotassique 200 mM) était injectée anaérobiquement à un débit de 0,5 ml/h. La température était maintenue à 25°C et le pH à 7,8. Après 21 h de fonctionnement, on a recueilli la L-carnitine produite par passage sur résine échangeuse d'ions comme décrit dans l'exemple 1.

Exemple 7:

On a répété l'exemple 1 (synthèse de la L-carnitine) en portant toutefois à 400 mM la concentration en glucose et en ajoutant au milieu 0,02% en poids d'azoture de sodium (NaN_3) comme antiseptique, les autres conditions étant les mêmes que celles de l'exemple 1. On a obtenu en 89 ½ h une quantité de L-carnitine de 2,7 g avec un rendement de 95%.

Exemple 8:

On a répété l'exemple 1 (synthèse de la L-carnitine) dans les mêmes conditions, sauf que la concentration de la solution de chlorhydrate de déshydrocarnitine était 1 M, l'agent neutralisant étant ici la potasse 4N. On a obtenu en 18 ½ h 1,52 g de L-carnitine avec un rendement voisin de 100%.