

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 21816

(54) Procédé pour préparer la L-thréonine.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 C 101/30, 99/12.

(22) Date de dépôt..... 27 décembre 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : JP, 28 décembre 1981, n° 209984/81 et 209985/81.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 26 du 1-7-1983.

(71) Déposant : DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA. — JP.

(72) Invention de : Masaaki Kato, Teruzo Miyoshi, Iwao Kibayashi, Masahisa Ikemi, Haruo Gomi,
Yoshiaki Ishimatsu, Noriaki Koizumi et Hideaki Yamada.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

Procédé pour préparer la L-thréonine.

La présente invention concerne un procédé pour préparer la L-thréonine par réaction de la D-thréonine-aldolase ou de la D-thréonine-aldolase et de la L-allo-thréonine-aldolase sur une solution contenant au moins la
5 DL-thréonine.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé pour préparer la L-thréonine selon lequel on fait réagir la D-thréonine-aldolase sur la DL-thréonine ou bien la D-thréonine-aldolase et la L-allo-
10 thréonine-aldolase sur un mélange de DL-thréonine et de DL-allothréonine de façon à obtenir de la L-thréonine à partir de la DL-thréonine ou du mélange de DL-thréonine et de DL-allothréonine par décomposition de D-thréonine, de D-allothréonine et de L-allothréonine de façon asymé-
15 trique en glycine et acétaldéhyde.

La L-thréonine est l'un des acides aminés essentiels pour l'homme et les animaux, et, étant donné sa teneur relativement faible en diverses protéines animales et végétales, le besoin potentiel en L-thréonine comme
20 l'un des additifs utilisés dans les produits alimentaires est assez important. Jusqu'à maintenant, on produisait la L-thréonine par une méthode d'extraction à partir de substances naturelles ou une méthode de fermentation de substances naturelles, cependant, étant donné le coût relativement
25 élevé de la L-thréonine ainsi produite, on recherche un procédé pour produire celle-ci à un moindre coût.

Par ailleurs, bien que la L-thréonine soit facilement synthétisable à partir de glycine, etc, de la D-thréonine est sous-produite dans la même quantité que
30 la L-thréonine tandis que se forment simultanément les D-allothréonine et L-allothréonine, et leurs DL-isomères. En conséquence, les étapes d'isolement et de purification de L-thréonine à partir des produits de réaction sont extrê-

mement complexes. Le rendement en L-thréonine est faible et le prix de la L-thréonine ainsi produite par synthèse est très élevé. Par exemple, comme méthode de résolution optique de la DL-thréonine, on connaît les méthodes décrites dans Bull. Soc. Chim. Vol. 20, page 903 (1953) et
5 ibid., Vol. 23, page 447 (1956), cependant, ces méthodes pour la résolution optique de la DL-thréonine sont extrêmement pénibles et ne fournissent de la L-thréonine qu'avec un faible rendement. De plus, pour éliminer les allothréo-
10 nines, on utilise de façon inévitable une méthode inefficace et très pénible telle que celle décrite dans la publication de brevet japonais n° 36-19562(1961), dans laquelle on utilise un complexe de bis(acétaldéhyde)thréonine-cuivre, ou bien la méthode décrite dans le brevet US n° 2.461.847,
15 dans laquelle l'allothréonine et la thréonine sont converties en leurs sels sodiques dans l'éthanol, à l'aide d'éthylate de sodium, et les sels sont séparés grâce à la différence existant entre leurs solubilités.

De plus, il y a d'autres inconvénients dans le
20 procédé de synthèse en ce qu'il y a très peu de demandes pour la D-thréonine et l'allothréonine sur le marché, et que la racémisation de la D-thréonine en L-thréonine n'est pas facilement réalisée.

A la suite de l'étude menée par la demanderesse
25 pour mettre au point un procédé de préparation de L-thréonine à faible coût par utilisation de réactions enzymatiques résolvant ainsi les problèmes techniques, la demanderesse a trouvé une nouvelle enzyme qui catalyse la D-thréonine et également la D-allothréonine en les convertissant
30 en glycine et acétaldéhyde ; cette enzyme est dénommée l'enzyme D-thréonine-aldolase. A savoir, la demanderesse a trouvé de plus que dans le cas où l'on fait réagir la D-thréonine-aldolase avec le produit de la synthèse, c'est-à-dire la DL-thréonine, ou dans le cas où l'on fait
35 réagir la D-thréonine-aldolase en association avec la L-

allothréonine-aldolase sur des produits plus complexes de
synthèse, c'est-à-dire un mélange de DL-thréonine et de
DL-allothréonine, on obtient de la L-thréonine avec le
produit de décomposition utile, c'est-à-dire la glycine
5 et l'acétaldéhyde. Il en résulte que la préparation de
L-thréonine est facilement réalisée et que les sous-pro-
duits sont utilisables tandis que les problèmes ci-dessus
sont résolus.

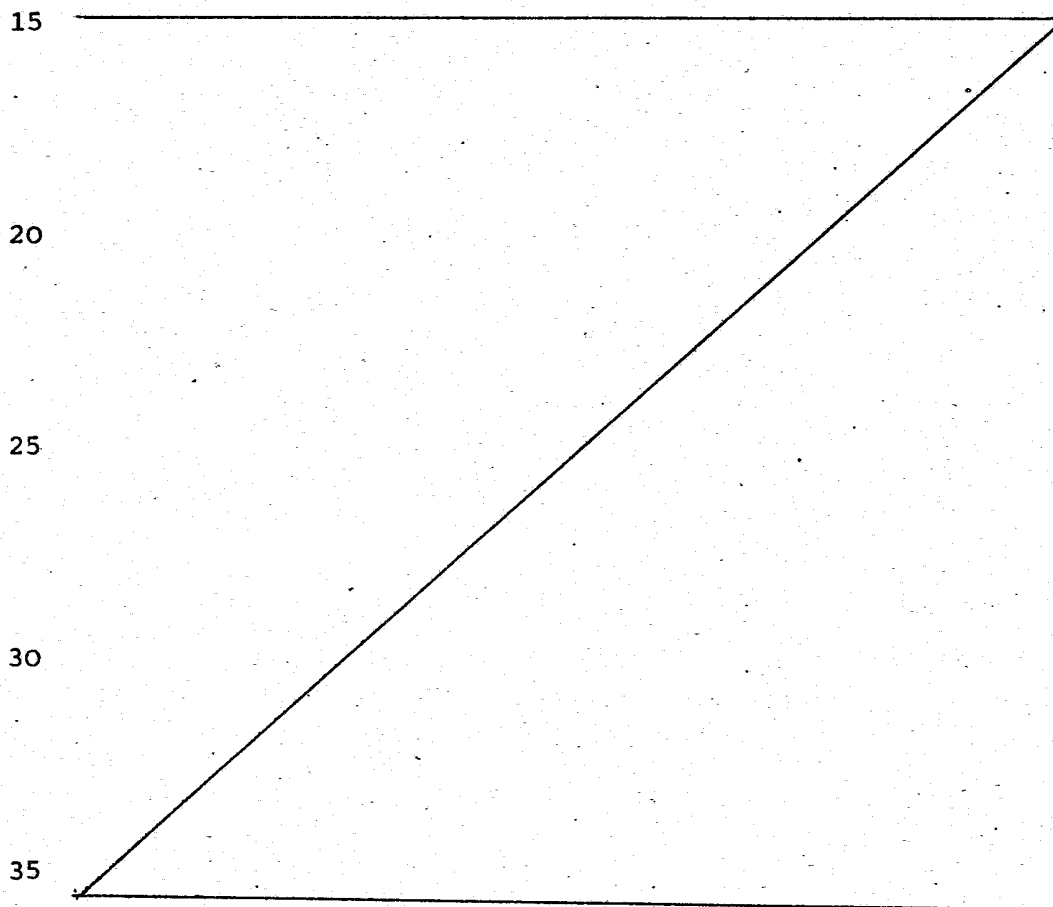
Selon une modalité de la présente invention, on
10 fournit un procédé pour préparer la L-thréonine selon le-
quel on fait réagir de la D-thréonine-aldolase ou de la
D-thréonine-aldolase et de la L-allothréonine-aldolase sur
une solution contenant au moins de la DL-thréonine. Plus
particulièrement, on fournit un procédé pour préparer la
15 L-thréonine selon le quel on fait réagir de la D-thréonine-
aldolase sur de la DL-thréonine ou on fait réagir de la
D-thréonine-aldolase et de la L-allothréonine-aldolase sur
un mélange de DL-thréonine et de DL-allothréonine de façon
à obtenir de la L-thréonine à partir de DL-thréonine ou du
20 mélange de DL-thréonine et de DL-allothréonine.

La présente invention concerne donc un procédé
pour obtenir de la L-thréonine à partir de DL-thréonine ou
d'un mélange de DL-thréonine et de DL-allothréonine, compre-
nant l'étape de catalyse de DL-thréonine contenue dans une
25 solution aqueuse avec de la D-thréonine-aldolase, ou la
catalyse d'un mélange de DL-thréonine et de DL-allothréo-
nine contenu dans une solution aqueuse avec un mélange de
D-thréonine-aldolase et de L-allothréonine-aldolase.

30 La D-thréonine-aldolase conforme à la présente
invention est une nouvelle enzyme qui décompose la D-thréo-
nine en glycine et acétaldéhyde et catalyse également la
D-allothréonine pour la décomposer en glycine et acétal-
déhyde. Une enzyme produite par une souche de Alcaligenes
35 faecalis, IFO 12669 (déposée à l'Institute for Fermentation

Osaka, Japon), une enzyme produite par une souche de Pseudomonas DK-2, (déposée au Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japon, sous le numéro de dépôt FERM-P 6200), et une enzyme produite par une souche d'Arthrobacter DK-19, (déposée aussi dans ce dernier Institut sous le numéro de dépôt FERM-P 6201) possèdent respectivement une aptitude à décomposer la D-thréonine et la D-allothréonine et en conséquence, chacune d'entre elles peut être utilisée conformément au procédé de la présente invention.

Les propriétés bactériologiques de la souche de Pseudomonas DK-2 (FERM-P 6200) et de la souche d'Arthrobacter DK-19 (FERM-P 6201) sont indiquées ci-dessous.



(a) Propriétés morphologiques.

	Rubrique	<u>Pseudomonas</u> DK-2	<u>Arthrobacter</u> DK-19
5	Forme des cellules	En forme de bâtonnets	En forme de bâtonnets
10	Dimension des cellules (μ)	1,5 x 0,8	2,5 x 0,8
15	Pléiomorphisme	Aucun	Mélange de bâtonnets linéaires ordinaires incurvés, en forme de V et cylindriques
20	Mobilité	Positive monotriche	Positive : très active péritriche
25	Spore	Aucune	Aucune
	Gram-coloration	Négative	Ayant des granules gram-positives à l'intérieur des cellules gram-négatives
	Acido-résistance	Aucune	Aucune

30

35

(b) Etat de la croissance dans divers milieux de culture.

	Rubrique	<u>Pseudomonas</u> DK-2	<u>Arthrobacter</u> DK-19
5	Culture sur bouillon gélosé en boîte	Colonies circulaires semi-transparentes avec protubérance convexe circulaire, brillantes	Colonies circulaires, de couleur crème, avec protubérance convexe circulaire, brillantes
10			
15	Culture sur bouillon gélosé incliné	Croissance modérée, semi-transparente et brillante	Croissance modérée, colonies semi-transparentes, filiformes, de couleur crème, brillantes
20	Culture sur bouillon nutritif liquide	Croissance modérée	Croissance favorable, état flocculeux
25	Culture sur bouillon gélatineux en piqûres	Croissance favorable sur la surface du milieu de culture	Croissance favorable sur la surface du milieu de culture, sous forme filiforme
30	Lait de tournesol	Changement en couleur alcaline	Décoloration sans liquéfaction

35

(c) Propriétés physiologiques.

Rubrique		<u>Pseudomonas</u> DK-2	<u>Arthrobacter</u> DK-19
5	Réduction de nitrate	+	-
	Dénitrification	+	+
	Test MR	-	-
	Test VP	-	-
	Production d'indole	-	-
10	Production de H ₂ S	+(faible)	+(faible)
	Hydrolyse de l'amidon	-	-
	Utilisation d'acide citrique dans le milieu :		
	de Koser	-	+
15	de Christensen	-	+
	Utilisation de source d'azote minérale :		
	Nitrate	-	-
	Sel d'ammonium	-	-
20	Production de colorant	-	-
	Activité comme uréase	-	-
	Activité comme oxydase	+	-
	Activité comme catalase	+	+
Gamme de croissance :			
25	pH	6 à 9,5	4,5 à 9,5 de préférence 8 à 8,5
	Température (°C)	5 à 50	15 à 38 de préférence 28 à 30
30			
35			.../...

(c) Propriétés physiologiques (suite)

Rubrique		<u>Pseudomonas</u> DK-2		<u>Arthrobacter</u> DK-19	
	Aérobisme	oui		oui	
5	Test O-F (méthode de Hush Leifson)	oxydant		oxydant	
	Production d'acide et de gaz à partir de sucre	acide	gaz	acide	gaz
	L-arabinose	-	-	-	-
10	D-xylose	-	-	-	-
	D-glucose	-	-	-	-
	D-mannose	-	-	-	-
	D-fructose	-	-	-	-
	D-galactose	-	-	-	-
15	Maltose	-	-	-	-
	Sacrose	-	-	-	-
	Lactose	-	-	-	-
	Tréhalose	-	-	-	-
	D-sorbitol	-	-	-	-
20	D-mannitol	-	-	-	-
	Inositol	-	-	-	-
	Glycérol	+ (faible)		-	-
	Amidon	-	-	-	-
	Raffinose	-	-	-	-
25	Inuline	-	-	-	-
	D-ribose	-	-	-	-
	Dulcitol	-	-	-	-
	Sorbose	-	-	-	-
	Carboxyméthylcellulose	-	-	-	-
30	Halotolérance dans :				
	5 % en poids de solution aqueuse de chlorure de sodium	se développe		se développe	

(c) Propriétés physiologiques (suite).

	Rubrique	Pseudomonas DK-2	Arthrobacter DK-19
5	10 % en poids de solution aqueuse de chlorure de sodium	ne se développe pas	se développe légèrement
	Activité de décomposition vis-à-vis de la gélatine	-	-
10	Activité comme DNA-ase	-	-
	Vitamines essentielles	Thiamine et acide folique	Acide pantothénique et acide nicotinique
15	Source d'isolement	Sol	Sol

En classant ces deux souches en fonction de leurs propriétés bactériologiques d'après le "Manual of Determinative Bacteriology, 8e Ed. (1974)" par Burgey, la souche DK-2 est identifiée comme appartenant au genre Pseudomonas, parce qu'il s'agit d'un bâtonnet gram-négatif, monotriche, et dont l'action est positive au test d'activité à titre d'oxydase et de dénitrification.

Par ailleurs, la souche DK-19 est identifiée comme appartenant au genre Arthrobacter, parce qu'il s'agit d'un bâtonnet faiblement gram-positif ayant un pléiomorphisme, qui est pérित्रиче et incapable d'utiliser des saccharides.

L'enzyme présentant à la fois l'activité de D-thréonine-aldolase et l'activité de D-allothréonine-aldolase conformément à la présente invention peut être produite par culture, par exemple d'une des souches dans un milieu de culture nutritif, qui peut être identique à ceux qui sont utilisés ordinairement pour cultiver une quelconque souche de bactéries contenant des saccharides

tels que du glucose, du glycérol, des mélasses et similaires, ou un acide carboxylique organique tel que l'acide acétique, l'acide malique et similaires comme source de carbone, du sulfate d'ammonium, du chlorure d'ammonium, de l'urée ou similaires comme source d'azote, un extrait de levure, de la peptone, un extrait de viande, de la liqueur de macération de maïs, etc, comme élément nutritif organique, et du magnésium, du fer, du manganèse, du potassium, du phosphate, etc, comme ion minéral. La culture peut être réalisée dans les conditions classiques, c'est-à-dire à un pH dans la gamme de 4 à 10 pour le milieu de culture, à une température de 20 à 60°C pendant 1 à 3 jours de culture aérobique après inoculation.

En cultivant l'une de ces souches dans les conditions indiquées plus haut, on produit l'enzyme présentant à la fois l'activité de D-thréonine-aldolase et l'activité de D-allothrénine-aldolase dans les éléments bactériens dans lesquels elle s'accumule. Afin d'isoler l'enzyme à un état plus pur à partir du milieu de culture, les produits de prolifération de la souche de microorganisme (dénommés par la suite "cellules bactériennes") sont détruits par une méthode connue telle qu'une méthode mécanique, un traitement utilisant une enzyme et une méthode autolysante de façon à obtenir un extrait brut de l'enzyme, et ensuite, cet extrait brut est soumis à une purification par une association convenable de précipitation par du sulfate d'ammonium ou un solvant organique comme l'acétone ou le méthanol, et de chromatographie utilisant un échangeur d'ions tel que du diéthylaminoéthyle (dénommé par la suite "DEAE")-céphalose, DEAE-cephadex et gel de phosphate de calcium, etc, ou un adsorbant, etc. Afin d'obtenir la manifestation de l'activité enzymatique de celui-ci, la présence d'une co-enzyme, le pyridoxal-5'-phosphate, est nécessaire dans sa réaction, en une quantité ordinaire de 10^{-5} à 10^{-3} M.

Les propriétés physico-chimiques de la nouvelle

enzyme conforme à la présente invention sont expliquées de la façon suivante.

(1) Activité et spécificité du substrat.

La nouvelle enzyme conforme à la présente invention décompose à la fois la D-thréonine et la D-allothrénine en glycine et acétaldéhyde, et d'un autre côté, n'agit pas du tout sur la L-thréonine et la L-allothrénine.

(2) pH optimum.

En déterminant l'aldéhyde produit par la nouvelle enzyme à partir de la D-thréonine comme substrat, à 30°C pendant 10 minutes, à un pH d'une série, on a constaté que le pH optimum de la nouvelle enzyme était dans la gamme de 7 à 9. Les solutions tampon respectives utilisées sont un tampon de phosphate 0,1 M pour la gamme de pH de 4 à 7,5, un tampon de tris-HCl 0,1 M pour la gamme de pH de 7 à 9 et un tampon de carbonate de sodium 0,1 M pour la gamme de pH de 9 à 11.

(3) Gamme de pH dans laquelle la nouvelle enzyme est stable.

En déterminant l'activité restante de la nouvelle enzyme, après chauffage d'une solution de l'enzyme pendant une heure à 30°C, à un pH d'une série, on a constaté que la gamme de pH dans laquelle la nouvelle enzyme pouvait exister à l'état stable allait de 6 à 9. La solution tampon respective utilisée dans la culture est un tampon de phosphate 0,1 M pour une gamme de pH de 4 à 7,5, un tampon de tris-HCl 0,1 M pour une gamme de pH de 7 à 9, et un tampon de carbonate de sodium 0,1 M pour une gamme de pH de 9 à 11.

(4) Méthode de détermination de l'activité enzymatique.

On détermine selon la méthode de Paz (voir Arch. Biochem. Biophys., Vol. 109, page 548 (1965)) la quantité d'acétaldéhyde formée lorsque 0,1 ml d'un liquide contenant la nouvelle enzyme est ajouté à 0,4 ml d'une solution tampon de tris-HCl 0,1 M contenant 100 micromoles de D-thréonine à pH 8,0 et que le mélange est chauffé à

30°C pendant 10 minutes ; l'activité enzymatique correspondant à la décomposition de 1 micromole de D-thréonine à 30°C sert de référence, c'est-à-dire qu'elle constitue une unité (U).

5 (5) Gamme de température optimum pour l'activité.

A partir de la détermination de la quantité d'acétaldéhyde produit par la nouvelle enzyme dans les conditions de pH optimum (8,0) à une température d'une série pendant 10 minutes, en utilisant une solution tampon de tris-HCl 0,1 M, on a constaté que la gamme de température optimum pour l'enzyme était de 40 à 50°C.

(6) Stabilité à la chaleur de la nouvelle enzyme.

A partir de la détermination de l'activité restante après chauffage d'une solution de la nouvelle enzyme dans une solution tampon de tris-HCl 0,1 M à un pH de 8,0 pendant une heure, à une température d'une série, on a constaté que la température à laquelle l'enzyme est stable est inférieure à 40°C.

(7) Conditions d'inactivation de la nouvelle enzyme.

La nouvelle enzyme conforme à la présente invention est complètement inactivée à un pH inférieur à 5 et supérieur à 11 et également complètement inactivée après chauffage pendant une heure à une température supérieure à 70°C.

25 (8) Agents inhibant , activant ou stabilisant l'activité.

La nouvelle enzyme est activée et stabilisée par le mercaptoéthanol, le sulfite de sodium, le sulfite acide de sodium, le dithiothréitol et les ions Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} ou Mg^{2+} , et d'un autre côté, l'activité de l'enzyme est inhibée par l'ion Ag^+ monovalent, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Pd^{2+} , l'hydroxylamine et le p-chloromercuribenzoate.

(9) Coenzyme.

La coenzyme de l'enzyme est le pyridoxal-5'-phosphate.

35 (10) Poids moléculaire.

Le poids moléculaire de l'enzyme est dans la gamme de 100.000 à 150.000 déterminé par filtration sur gel, sur Cephadex (dénomination commerciale) G-200.

(11) Composition analytique élémentaire.

- 5 50,7 à 52,7 % de carbone,
6,8 à 8,8 % d'hydrogène et
14,7 à 16,7 % d'azote .

- Comme la thréonine-aldolase et l'allothréonine-aldolase connues ne décomposent que la L-thréonine et la
10 L-allothréonine respectivement, et que les enzymes qui décomposent le D-isomère n'ont jamais été connues, chaque enzyme trouvée dans les souches respectivement est une nouvelle enzyme présentant une nouvelle activité.

- A savoir, toute enzyme présentant une activité
15 D-thréonine-aldolase peut être utilisée dans le procédé conforme à la présente invention dans la mesure où cette enzyme peut décomposer à la fois la D-thréonine et la D-allothréonine en les convertissant en glycine et acétaldéhyde.

- 20 La L-allothréonine-aldolase utilisée dans le procédé selon l'invention est une enzyme catalysant la L-allothréonine en la convertissant en glycine et acétaldéhyde, et la présence de celle-ci est connue dans le foie de mouton et la semence de maïs en germination, cependant,
25 la production microbiologique de cette enzyme n'est pas connue.

- Cependant, la demanderesse a constaté que certaines bactéries appartenant respectivement aux genres Bacillus, Pseudomonas, Arthrobacter et Alcaligenes produi-
30 sent l'enzyme, et elle a mis au point une méthode pour produire l'enzyme industriellement à grande échelle. Comme exemples de microorganismes capables de produire la L-allothréonine-aldolase, on peut utiliser une souche de Bacillus DK-315 (déposée au Fermentation Research Institute, Agency
35 of Industrial Science and Technology, Ministry of Inter-

national Trade and Industry, Japon, sous le numéro de dépôt FERM-P 6202) isolée à partir d'un sol, une souche de Arthrobacter DK-19 (FERM-P 6201), la souche de Pseudomonas DK-2 (FERM-P 6200) et une souche d'Alcaligenes faecalis (déposée à l'Institute for Fermentation Osaka, Japon sous le numéro de dépôt IFO-12669).

Les propriétés bactériologiques de la souche de Bacillus DK-315 (FERM-P 6202) sont les suivantes.

(a) Propriétés morphologiques.

- 10 (1) Forme et dimensions des cellules : bâtonnets de 0,8 x 2,0 micromètres,
- (2) Pléiomorphisme : aucun,
- (3) Mobilité : positive, multitriche,
- (4) Spore : configuration ellipsoïdale existant en position extérieure au centre,
- 15 (5) Gram-coloration : positive,
- (6) Acido-résistance : aucune.

(b) Etat de la croissance dans divers milieux de culture.

- (1) Bouillon gélosé en boîte : croissance favorable avec colonies circulaires,
- 20 (2) Bouillon gélosé incliné : favorable, semi-transparent, avec lustre,
- (3) Bouillon de culture liquide : favorable,
- (4) Bouillon gélatineux en piqure : favorable, filiforme à la surface du milieu de culture,
- 25 (5) Lait de tournesol : décoloré et liquéfié.

(c) Propriétés physiologiques.

- (1) Réduction de nitrate : +
- (2) Dénitrification : +
- 30 (3) Test MR : +(faible)
- (4) Test VP : -
- (5) Production d'indole : -
- (6) Production de H₂S : -
- (7) Hydrolyse de l'amidon : +
- 35 (8) Utilisation d'acide

	citrique dans le milieu		
	de Koser :	-	
	de Christensen :	-	
5	(9) Utilisation d'azote minéral		
	Nitrate :	-	
	Sel d'ammonium :	+	
	(10) Production de colorant :	-	
	(11) Activité comme uréase :	-	
10	(12) Activité comme oxydase :	+	
	(13) Activité comme catalase :	+(faible)	
	(14) Gamme de croissance		
	pH :	5 à 12	
	Température :	5 à 40°C	
15	(15) Aérobisme :	oui	
	(16) Test O-F (méthode de Hush Leifson) :	F	
	(17) Production d'acide et de gaz à partir de sucres :	(acide)	(gaz)
20	L-arabinose	-	-
	D-xylose	-	-
	D-glucose	+	+
	D-mannose	+	+
	D-fructose	+	+
25	D-galactose	+	+
	Maltose	+	-
	Saccharose	-	-
	Lactose	-	-
	Tréhalose	+	-
30	D-sorbitol	-	-
	D-mannitol	+	-
	Inositol	-	-
	Glycérol	+	+
	Amidon	+	-
35	(18) Halotolérance dans une solution de chlorure de		

sodium aqueuse à 5 % : ne se développe pas

(19) Activité de décomposition vis-à-vis de la gélatine: +

(20) Activité à titre de DNA-ase : +

(21) Vitamines essentielles : aucune

5 A partir des propriétés bactériologiques indiquées ci-dessus, en se référant au "Manual of Determinative Bacteriology", 8e Ed (1974) par Burgey, on identifie la souche DK-315 comme appartenant au genre Bacillus, parce qu'il s'agit de bâtonnets gram-positifs, péritriches, capables de former des spores.

10 La L-allothréonine-aldolase peut être produite par la culture de chacune des souches indiquées plus haut dans un milieu nutritif qui est utilisé généralement pour la culture d'une souche bactérienne contenant un saccharide
15 tel que du glucose, du glycérol et des mélasses ou un acide organique tel que l'acide acétique, l'acide malique et similaires comme source de carbone, du sulfate d'ammonium, du chlorure d'ammonium, de l'urée et similaires comme source d'azote, de l'extrait de levure, une peptone, un extrait de viande,
20 une liqueur de macération de blé et similaires comme source nutritive organique, et un sel de métal tel que le magnésium, le fer, le manganèse, le potassium, et des phosphates comme ion minéral généralement selon la méthode classique de culture des bactéries à pH 4 à 10 pendant un à
25 trois jours, de 20 à 60°C de façon aérobique, avec un pH de culture dans la gamme de 4,0 à 10,0.

Ainsi, la L-allothréonine-aldolase est produite et s'accumule dans les éléments bactériens, et en conséquence, dans le cas où on isole l'enzyme à partir du milieu de culture, les cellules bactériennes sont brisées
30 par une méthode connue telle que des moyens mécaniques, des moyens enzymatiques ou une méthode autolysante, et ensuite, l'extrait brut de l'enzyme est préparé. L'extrait brut est traité par une association convenable d'une précipitation par du sulfate d'ammonium ou un solvant tel que
35

l'acétone ou l'éthanol et une chromatographie utilisant des échangeurs d'ions tels que du DEAE-Cepharose, DEAE-Cephadex, du gel de phosphate de calcium ou des adsorbants, de façon à fournir une enzyme de haute qualité. Les propriétés physico-chimiques simples de la L-allothrénine-aldolase ainsi purifiée sont les suivantes.

- (1) pH optimum : 8 à 9,
- (2) Température optimum : 60 à 70°C,
- (3) Conditions d'inactivation :
 - 10 Enzyme inactivée en une heure à 30°C, à un pH dans la gamme de 5 à 11, ou en une heure à une température supérieure à 50°C et à un pH de 8,
- (4) Eléments inhibants : Cu^{2+} , Hg^{2+} et Ag^{1+} ,
- (5) Stabilisants : mercaptoéthanol, dithiothréitol et sulfite de sodium,
- 15 (6) Coenzyme : pyridoxal-5'-phosphate.

Comme la L-allothrénine-aldolase requiert du pyridoxal-5'-phosphate comme coenzyme pour manifester son activité, on fait coexister généralement 10^{-3} à 10^{-5} M de pyridoxal-5'-phosphate avec l'enzyme à chaque fois que l'on fait réagir celle-ci.

- (7) Poids moléculaire : 100.000 à 150.000 déterminé par filtration sur gel avec du Cephadex (dénomination commerciale) G-200.
- 25 (8) Données d'analyse élémentaire :
 - 51,4 à 53,4 % de carbone
 - 6,5 à 8,5 % d'hydrogène et
 - 14,2 à 16,2 % d'azote.

La L-allothrénine-aldolase utilisée conformément à la présente invention est suffisante pour le but recherché si elle décompose la L-allothrénine en glycine et acétaldéhyde, et il va sans dire que l'enzyme n'est pas limitée à celles dérivées des microorganismes.

Les enzymes utilisées dans la présente invention, c'est-à-dire la D-thrénine-aldolase et la L-allothrénine-

aldolase, suffisent respectivement pour le propos recherché dans le cas où elles se trouvent respectivement dans les conditions telles qu'elles sont capables de manifester leur activité enzymatique, et elles ne sont donc pas limitées à une condition isolée, et en conséquence, des produits semi-purifiés, un extrait brut, de plus, le milieu de culture, les cellules vivantes, les cellules lyophilisées, les cellules séchées à l'acétone, les cellules broyées, du foie de mouton broyé et similaires peuvent être utilisés tels
10 quels. L'enzyme immobilisée ou les cellules immobilisées par des moyens connus peuvent être utilisées. A titre de méthode d'immobilisation, on peut utiliser largement une méthode de combinaison avec un support, une méthode de réticulation, une méthode de piégeage, une méthode d'agglutination et similaires.
15

La DL-thréonine ou un mélange de DL-thréonine et de DL-allothréonine peuvent être le produit obtenu par une quelconque méthode connue, et par exemple, une méthode dans laquelle un acétoacétate est utilisé comme matière de départ pour obtenir un ester d'acide alpha-amino-bêta-hydroxybutyrique et l'acétoacétate est traité avec du
20 chlorure de thionyle pour former un oxazoline-ester, puis l'ester est hydrolysé en le produit recherché par chauffage (voir J. Am. Chem. Soc., 71, 1101 (1949)) ; ou bien une méthode selon laquelle on utilise comme matière de départ de l'acétate de vinyle que l'on soumet à hydroformylation par le procédé oxo pour obtenir l'alpha-acétoxypropionaldéhyde, on fait réagir l'aldéhyde avec du cyanure d'hydrogène et de l'ammoniac pour obtenir de l'alpha-amino-bêta-hydroxybutyronitrile, que l'on traite à son tour avec
25 du phosgène pour former un dérivé d'oxazolidone, puis on soumet le dérivé à une hydrolyse pour obtenir le produit (voir la publication du brevet japonais n° 40-11608 (1965)). Cependant, puisque dans le procédé selon la présente invention, le produit recherché est la L-thréonine et le sous-
35

produit est composé de glycine et d'acétaldéhyde, on préfère utiliser une méthode de synthèse qui produit les formes allo en plus petite quantité et nécessite de la glycine et de l'acétaldéhyde comme matières de départ. A ce propos, 5 une méthode selon laquelle un sel métallique est traité avec de la glycine pour obtenir un complexe métallique de glycine, ensuite l'acétaldéhyde est condensé avec le complexe métallique de glycine (voir publications de brevets japonais n° 36-19562 (1961) et 47-39093 (1972)), constitue une 10 méthode convenable pour produire un mélange de DL-thréonine et de DL-allothrénine. La solution contenant le mélange peut être une solution aqueuse qui est obtenue par dissolution dans l'eau du produit une fois obtenu sous forme de cristaux, cependant, ce peut être le liquide obtenu par la 15 synthèse, ou un quelconque liquide intermédiaire obtenu au cours de la préparation des cristaux du mélange. En bref, le liquide contenant la DL-thréonine et la DL-allothrénine utilisé dans le procédé selon la présente invention peut être une solution contenant la DL-thréonine et 20 la DL-allothrénine, et le rapport du D-isomère au L-isomère dans la solution ainsi que le rapport des thréonines aux allothrénines dans la solution sont hors de la question. De plus, la solution peut renfermer toutes autres impuretés s'ajoutant à la DL-thréonine et à la DL-allothrénine. 25 Toute impureté inhibant la réaction enzymatique, s'il y en a, doit être éliminée au préalable. Par exemple, dans le cas où un ion métallique utilisé dans la synthèse est nuisible à la réaction enzymatique, on doit l'éliminer à l'aide d'une résine échangeuse de cations, etc, avant de 30 procéder à la réaction enzymatique.

Il n'y a aucune difficulté particulière dans le traitement (catalyse) d'une solution contenant de la DL-thréonine par la D-thréonine-aldolase ou le traitement (catalyse) d'une solution contenant à la fois la DL-thréo- 35 nine et la DL-allothrénine avec le mélange de D-thréonine-

aldolase et de L-allothréonine-aldolase. En bref, l'enzyme indiqu  e peut être présente dans la solution aqueuse de la substance indiqu  e. La concentration en DL-thréonine et/ou DL-allothréonine dans la solution peut être telle qu'elle n'inhibe pas remarquablement l'activité enzymatique et elle est de préférence dans la gamme de 0,1 à 2 moles/litre. Le solvant du système de réaction enzymatique est en principe de l'eau, cependant, un solvant organique peut être compris dans celle-ci s'il n'inhibe pas la réaction enzymatique. Bien que le pH du système de réaction dépende de l'enzyme, il est préférable de travailler autour de pH 7 à 10 dans les cas où l'enzyme est obtenue dans les exemples décrits. Bien que la température de réaction dépende de l'enzyme, il est préférable de travailler à 30 à 45  C dans le cas où l'on utilise l'enzyme pr  par  e dans les exemples décrits. De plus, dans le cas où l'on utilise l'enzyme pr  par  e dans l'exemple, la réaction enzymatique peut être acc  l  r  e par l'apport d'une quantité molaire de 10^{-3} à 10^{-5} de pyridoxal-5'-phosphate dans le système à titre de coenzyme. De plus, un agent tensio-actif peut être ajouté au système de réaction pour divers buts. La réaction enzymatique peut être effectu  e de façon continue ou discontinue. La D-thréonine-aldolase et la L-allothréonine-aldolase peuvent être ajout  es ensemble ou séparément.

La durée de réaction peut être choisie éventuellement en fonction de l'utilisation finale prévue de la L-thréonine. Par exemple, dans le cas où l'on cherche à obtenir de la L-thréonine dans laquelle l'existence d'isomère non décomposé est possible, la réaction peut être arr  t  e avant l'achèvement de la décomposition enzymatique de l'isomère. De toute façon, une durée de réaction de 5 à 100 heures est suffisante pour chaque enzyme.

Lorsque la réaction enzymatique est terminée, les substances en suspension dans le mélange réactionnel sont   limin  es par centrifugation ou filtration, si n  ces-

saire, et le mélange réactionnel résultant est purifié par traitement sur une résine échangeuse d'ions et cristallisation, et après décoloration de la solution de réaction par du charbon actif, etc, la solution décolorée est condensée pour fournir les cristaux de L-thréonine à l'état pur. Le produit de réaction autre que la L-thréonine comprend de la glycine et de l'acétaldéhyde dans le cas où l'on utilise de la D-thréonine-aldolase et également dans le cas où l'on emploie de la D-thréonine-aldolase et de la L-allothrénine-aldolase ; la glycine peut être séparée et isolée par chromatographie, par exemple avec une résine échangeuse d'ions. Comme on constate une condensation non enzymatique de l'acétaldéhyde avec la glycine pendant la réaction enzymatique, ou la recombinaison avec la glycine par chaque enzyme, il peut être mieux de récupérer l'acétaldéhyde pendant la réaction enzymatique par distillation, etc.

Conformément au procédé selon la présente invention, l'élimination de D-thréonine ou de DL-allothrénine d'un mélange de thréonine qui était auparavant difficile peut être effectuée au cours d'une étape simple et commode. En conséquence, la présente invention a résolu le gros problème qui a empêché la séparation de l'isomère et a fourni une méthode pour produire la L-thréonine à un faible prix à partir de thréonine, qui est produite par synthèse. En particulier, il est plus avantageux de combiner le procédé avec une méthode de synthèse de production de thréonine à partir de glycine et d'acétaldéhyde, parce que les sous-produits de la réaction enzymatique peuvent être réutilisés comme matières de départ.

La présente invention est davantage expliquée à l'aide des exemples ci-après.

Cependant, la présente invention n'est pas limitée à ces exemples. A partir de la description ci-dessus, le spécialiste saura déterminer les caractéristiques essen-

tielles de cette invention, et sans sortir du cadre de celle-ci, envisager divers changements et modifications de façon à l'adapter à divers usages et conditions.

De plus, tous les pourcentages indiqués sont en poids. L'activité de la D-allothrénine-aldolase et celle de la L-allothrénine-aldolase sont mesurées de la même façon que celle de la D-thrénine-aldolase, si ce n'est que le substrat est modifié en fonction de chaque enzyme. On évalue le titre de l'activité en attribuant la valeur d'une unité (1 U) à l'activité correspondant à la décomposition d'une micromole d'allothréonine, le substrat, en une minute.

Exemple 1 de préparation.

Production d'une enzyme ayant l'activité de D-thrénine-aldolase et l'activité de D-allothrénine-aldolase.

On prépare un milieu de culture dont le pH est ajusté à 7,5, comprenant 0,5 % de polypeptone, 0,2 % d'extrait de levure, 0,1 % de sulfate diacide de potassium, 0,05 % de sulfate de magnésium, 0,1 % d'acide L-glutamique et 0,5 % de D-thrénine ; dans un récipient de culture de 5 litres, on introduit 3 litres de ce milieu de culture, puis on stérilise celui-ci à 120°C pendant 10 minutes. Dans le milieu de culture ainsi stérilisé, on inocule une souche d'Arthrobacter DK-19 (FERM-P 6201) et on cultive pendant 20 heures à 30°C en assurant une aération et une agitation.

Lorsque la culture est terminée, les cellules sont recueillies à partir du liquide de culture par centrifugation, et après lavage des cellules avec une solution aqueuse à 0,9 % de chlorure de sodium, les cellules humides sont mises en suspension dans 100 ml d'une solution tampon de phosphate 0,1 M contenant 10 mM de mercaptoéthanol et 0,1 mM de pyridoxal-5'-phosphate. Après traitement de la suspension de cellules ainsi obtenue par des ultrasons à 20 kHz pendant 5 périodes de 5 minutes, la suspension est

centrifugée et le liquide surnageant recueilli. On ajoute du sulfate de protamine au liquide surnageant pour éliminer l'acide nucléique, on fractionne le liquide avec du sulfate d'ammonium pour recueillir une fraction contenant une enzyme ayant l'activité de D-thréonine-aldolase.

On soumet la fraction ayant l'activité de D-thréonine-aldolase à une dialyse vis-à-vis d'un tampon de phosphate 0,01 M contenant 10 mM de mercaptoéthanol et 0,1 mM de pyridoxal-5'-phosphate à pH 7,5 ; le dialysat est envoyé à travers une colonne garnie de 100 ml de DEAE-Cephadex (dénomination commerciale) A-50, puis la fraction adsorbée sur la colonne est soumise à une élution fractionnée selon une méthode dans laquelle la concentration en chlorure de potassium se fait graduellement, de façon à recueillir la fraction contenant l'enzyme ayant l'activité de D-thréonine-aldolase. En condensant la fraction par une méthode d'ultrafiltration, on recueille 10 ml d'une solution de D-thréonine-aldolase purifiée. L'activité de D-thréonine-aldolase et l'activité de D-allothrénine-aldolase de la solution ainsi obtenue sont respectivement de 5 U/ml et 12,5 U/ml.

Exemple 2 de préparation.

Production d'enzymes ayant l'activité de D-thréonine-aldolase et l'activité de D-allothrénine-aldolase.

On cultive respectivement une souche de Pseudomonas DK-2 (FERM-P 6200) et une souche d'Alcaligenes faecalis IFO 12669 dans la même sorte de milieu de culture, selon les méthodes décrites dans l'exemple 1 de préparation, et à partir du milieu ainsi cultivé, on recueille des fractions de 10 ml d'une solution de D-thréonine-aldolase purifiée selon les méthodes décrites dans l'exemple 1 de préparation. L'activité de D-thréonine-aldolase et l'activité de D-allothrénine-aldolase de l'enzyme obtenue par culture de la souche de Pseudomonas DK-2 sont de 4,5 U/ml et de 10,8 U/ml respectivement, et celles obtenues

par culture de la souche d'Alcaligenes faecalis sont de 4,2 U/ml et de 9,5 U/ml respectivement.

Exemple 3 de préparation.

Production de L-allothrénine-aldolase.

- 5 Une souche de Bacillus DK-315 (FERM-P 6202) est cultivée dans le même milieu de culture et selon la méthode décrite dans l'exemple 1 de préparation ; on obtient 10 ml de solution aqueuse de L-allothrénine-aldolase purifiée selon les méthodes d'isolement et de purification décrites
- 10 dans l'exemple 1 de préparation. L'activité de L-allothrénine-aldolase de la solution ainsi obtenue est de 4,5 U/ml, et la solution ne présente aucune activité sur la D-allothrénine et la D-thréonine.

Exemple 1 de synthèse.

- 15 Synthèse de la DL-thréonine.

Dans 5 litres d'eau chaude, on dissout 75 g de glycine et on ajoute lentement 100 g de carbonate de cuivre basique à la solution, et on fait réagir le mélange en le chauffant. Lorsque la réaction est terminée, on élimine par

20 filtration de la solution chaude l'excès de carbonate de cuivre basique, et après condensation du filtrat sous pression réduite, le filtrat concentré est refroidi et fournit 110 g de complexe de cuivre-glycine cristallin.

- Dans un litre d'eau, on ajoute 58 g de sel de
- 25 cuivre de glycine, 40 g d'une résine échangeuse d'anions SA 21A (type HCO_3) et 45 ml d'acétaldéhyde et l'on fait réagir le mélange en le chauffant à 40°C pendant 2 heures sous agitation. Lorsque la réaction est terminée, On laisse reposer le mélange réactionnel tel quel à 5°C pendant 24
- 30 heures pour obtenir les cristaux séparés de complexe de cuivre-bisacétaldéhyde-thréonine. On recueille les cristaux avec le catalyseur en les filtrant, puis on met les matières solides en suspension dans 0,6 litre d'une solution aqueuse à 3 % d'ammoniaque et filtre la suspension. Le
- 35 filtrat est envoyé à travers une colonne garnie de 1,2

litre d'une résine chélatante, la Dowex (dénomination commerciale) A-1 (type NH_4), pour éliminer le cuivre du filtrat, puis la fraction réagissant positivement à la ninhydrine est recueillie et condensée sous pression réduite.

- 5 Par addition de méthanol au condensat, on obtient des cristaux que l'on recristallise dans une solution méthanolique aqueuse et recueille 41 g de DL-thréonine ne contenant pas du tout d'allothréonine.

Exemple 2 de synthèse.

- 10 Synthèse d'un mélange de DL-thréonine et de DL-allothréonine.

Dans 5 litres d'eau chaude, on dissout 75 g de glycine et on ajoute lentement à la solution 100 g de carbonate de cuivre basique, puis on fait réagir le mélange en le chauffant. Lorsque la réaction est terminée, l'excès
15 de carbonate de cuivre basique est éliminé par filtration de la solution chaude et après condensation du filtrat sous pression réduite, le filtrat concentré est refroidi, pour fournir 110 g de complexe de cuivre-glycine cristallin.

- Dans 0,8 litre de méthanol contenant 6 g d'hydroxyde de potassium, on introduit 58 g du complexe de cuivre-glycine et 50 g d'acétaldéhyde que l'on fait réagir à 50 à 60°C pendant 1,5 heure sous agitation. Lorsque la réaction est terminée, le mélange réactionnel est filtré pour éliminer une petite quantité de matière non dissoute,
25 et après addition de 6,4 g d'acide acétique au filtrat, il est soumis à distillation sous pression réduite pour éliminer le solvant. Le composé brut de cuivre-thréonine reste sous forme de résidu de distillation, on le lave suffisamment avec de l'eau, puis on dissout le composé cristallin
30 dans 0,5 litre d'une solution aqueuse 6 N d'ammoniaque, et envoie la solution à travers une colonne garnie de 2 litres de Dowex (dénomination commerciale) A-1 (type NH_4), une résine chélatante, pour éliminer le cuivre de la solution et recueillir la fraction contenant la thréonine. La fraction
35 est condensée, sous une pression réduite, à 100 ml, et

400 ml de méthanol sont ajoutés au condensat, puis le mélange est refroidi pour obtenir des cristaux qui sont ensuite recristallisés dans une solution méthanolique aqueuse et fournissent 38 g de DL-thréonine cristalline contenant
5 10 % de DL-allothrénine.

Exemple 1.

Dans 20 ml d'une solution aqueuse contenant 10^{-6} mole de pyridoxal-5'-phosphate, 10^{-4} mole de mercaptoéthanol, 10^{-3} mole de chlorure de manganèse et 2,38 g des cristaux de DL-thréonine qui sont obtenus dans l'exemple 2 de
10 synthèse et qui contiennent 10 % de DL-allothrénine, on ajoute 10 ml de la solution contenant l'enzyme purifiée qui est obtenue dans l'exemple 1 de préparation et présente à la fois l'activité de D-thréonine-aldolase et l'activité
15 de D-allothrénine-aldolase, et 10 ml de la solution de D-allothrénine-aldolase purifiée qui est obtenue dans l'exemple 3 de préparation ; tout en soumettant le mélange à une distillation sous pression réduite pour éliminer et récupérer l'acétaldéhyde formé dans la réaction de l'enzyme,
20 on fait réagir le mélange à 30°C pendant 24 heures. Le pH du mélange réactionnel pendant la réaction est maintenu dans la gamme de 7,5 à 8,5 par addition de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N.

Lorsque la réaction est terminée, le mélange
25 réactionnel est neutralisé avec de l'acide chlorhydrique dilué et le produit de neutralisation est envoyé à travers une colonne garnie de 100 ml de Dowex (dénomination commerciale) 50 Wx-8 (type H^+). La colonne est lavée à l'eau et la thréonine, la glycine, etc, qui ont été adsorbées sur
30 la colonne, sont éluées avec une solution aqueuse 0,2 N d'ammoniaque. L'éluat est condensé à sec sous pression réduite, la substance solide résiduelle est dissoute dans 20 ml d'eau et le pH de la solution ainsi obtenue est ajusté à 3 à l'aide d'acide chlorhydrique dilué ; puis la
35 solution est renvoyée à travers une colonne garnie de 100ml

de Dowex (dénomination commerciale) 50 WX-8 du type H^+ . Après lavage de la colonne à l'eau, une solution aqueuse d'ammoniaque 0,1 N est envoyée à travers la colonne pour éluer une fraction contenant la thréonine et l'éluat est
5 séché à sec sous pression réduite. La matière solide est dissoute dans 4 ml d'eau et 10 ml d'éthanol sont ajoutés lentement à la solution pour obtenir des cristaux qui sont isolés. Le poids à sec des cristaux est de 0,9 g et l'analyse
10 par chromatographie sur papier confirme qu'il s'agit bien de cristaux de thréonine pure. La rotation spécifique du cristal est de $[\alpha]_D^{27} = -28,7^\circ$ (dans l'eau), ce qui coïncide avec la rotation déterminée sur un spécimen authentique de L-thréonine pure.

La solution aqueuse 0,1 N d'ammoniaque est pas-
15 sée à nouveau dans la colonne restante pour éluer une fraction contenant la glycine. L'éluat est séché à sec sous pression réduite et la matière solide est dissoute dans 1 ml d'eau. En ajoutant 4 ml d'éthanol lentement à la solution, des cristaux apparaissent dans la solution, qui sont isolés
20 et séchés ; on recueille 0,65 g de glycine après confirmation par chromatographie sur papier.

Par ailleurs, l'acétaldéhyde récupéré pendant la réaction sous pression réduite représente 0,34 g.

Exemple 2.

25 En procédant de la façon décrite dans l'exemple 1 si ce n'est que l'on utilise 10 ml de la solution de D-thréonine-aldolase purifiée obtenue à partir de Pseudomonas DK-2 FERM-P 6200 dans l'exemple 2 de préparation à la place de la solution de D-thréonine-aldolase purifiée ob-
30 tenue dans l'exemple 1 de préparation, on réalise la décomposition de la DL-thréonine contenant 10 % de DL-allothréonine pour obtenir 0,91 g de cristaux de thréonine ne contenant pas du tout d'allothréonine, 0,66 g de glycine cristalline et 0,34 g d'acétaldéhyde. La rotation spécifique
35 de la thréonine cristalline est de $[\alpha]_D^{27} = -28,7^\circ$ (dans

l'eau), ce qui montre que les cristaux ne sont constitués que de L-thréonine.

Exemple 3.

En procédant de la façon indiquée dans l'exemple 1 si ce n'est que l'on utilise 10 ml de la solution de D-thréonine-aldolase purifiée obtenue à partir d'Alcaligenes faecalis IFO 12669 dans l'exemple 2 de préparation, à la place de la solution de D-thréonine-aldolase obtenue dans l'exemple 1 de préparation, on effectue la décomposition de la DL-thréonine contenant 10 % de DL-allothréonine puis son isolement. Ainsi, on recueille 0,91 g de thréonine cristalline ne contenant pas du tout d'allothréonine, 0,66 g de glycine cristalline et 0,34 g d'acétaldéhyde. La rotation spécifique de la thréonine cristalline est de $[\alpha]_D^{27} = -28,7^\circ$ (dans l'eau), ce qui montre que les cristaux ne sont constitués que de L-thréonine.

Exemple 4.

Dans 30 ml d'une solution aqueuse contenant 2,38 g de DL-thréonine obtenue dans l'exemple 1 de synthèse, 10^{-6} mole de pyridoxal-5'-phosphate, 10^{-4} mole de mercaptoéthanol, 10^{-3} mole de chlorure de manganèse, on ajoute 10 ml de la solution de D-thréonine-aldolase purifiée obtenue dans l'exemple 1 de préparation et en éliminant et récupérant l'acétaldéhyde formé pendant la réaction enzymatique, on fait réagir le mélange à 30°C pendant 24 heures. Le pH du système de réaction est maintenu dans la gamme de 7,5 à 8,5 par addition d'une solution aqueuse 0,1 N d'hydroxyde de sodium.

Lorsque la réaction est terminée, on neutralise le mélange réactionnel avec de l'acide chlorhydrique dilué et on envoie ce mélange à travers une colonne garnie de 100 ml de Dowex (dénomination commerciale) 50 WX-8 (type H^+). Après lavage de la colonne à l'eau, la thréonine et la glycine adsorbées sur la colonne sont éluées avec une solution aqueuse 0,2 N d'ammoniaque. L'éluat est séché à

sec sous pression réduite, la matière solide est dissoute dans 20 ml d'eau, puis le pH de la solution est ajusté à 3 par addition d'acide chlorhydrique dilué et cette solution est envoyée à travers la colonne garnie de 100 ml de Dowex
5 (dénomination commerciale) 50 WX-8 (type H^+). Après lavage de la colonne à l'eau, une solution aqueuse 0,1 N d'ammoniaque est envoyée à travers la colonne lavée pour éluer la fraction contenant la thréonine. L'éluat est séché à sec sous pression réduite, puis la matière solide est dissoute
10 dans 4 ml d'eau. En ajoutant 10 ml d'éthanol lentement à la solution, on constate l'apparition de cristaux dans la solution, lesquels sont isolés et séchés. Les cristaux ainsi recueillis pèsent 0,95 g et l'analyse confirme qu'il s'agit de thréonine pure ayant une rotation spécifique de
15 $[\alpha]_D^{27} = -28,7^\circ$ (dans l'eau), ce qui coïncide avec la valeur obtenue pour un specimen authentique de L-thréonine.

La solution d'ammoniaque 0,1 N est à nouveau envoyée à travers la colonne sus-mentionnée pour éluer la fraction contenant la glycine, et l'éluat est condensé à sec
20 sous pression réduite. Après dissolution de la matière solide dans 1 ml d'eau, 4 ml d'éthanol sont ajoutés lentement à la solution pour que les cristaux se séparent. Après séchage, l'analyse par chromatographie sur papier indique que les cristaux pesant 0,6 g consistent uniquement en glycine.
25 Par ailleurs, l'acétaldéhyde récupéré pendant la réaction sous pression réduite représente 0,3 g.

Exemple 5.

On répète les méthodes de réaction enzymatique et de séparation des produits telles que décrites dans
30 l'exemple 1 si ce n'est que l'on n'effectue pas de distillation sous pression réduite pendant la réaction enzymatique. Il en résulte que l'on recueille 0,8 g de thréonine cristalline contenant 10 % d'allothréonine, 0,3 g de glycine cristalline et 0,05 g d'acétaldéhyde.

35 Exemple 6.

La souche de Pseudomonas DK-2 (FERM-P 6200) est cultivée dans les conditions indiquées dans l'exemple 1 de préparation et la fraction ainsi obtenue représentant 10 ml ayant une activité de D-thréonine-aldolase ainsi que la fraction ainsi obtenue représentant 10 ml ayant une activité de L-allothrénine-aldolase, sont respectivement condensées par ultrafiltration pour obtenir deux sortes de solutions, contenant respectivement la D-thréonine-aldolase et la L-allothrénine-aldolase.

- 10 En ajoutant les deux sortes de solutions ainsi obtenues à un mélange de 2 g de DL-thréonine et 1 g de DL-allothrénine dans les conditions décrites dans l'exemple 1 si ce n'est que la température est de 35°C au lieu de 30°C dans l'exemple 1, on obtient 0,85 g de L-thréonine
- 15 cristalline ne contenant ni D-thréonine ni DL-allothrénine, 1,01 g de glycine et 0,51 g d'acétaldéhyde. La rotation spécifique de la L-thréonine ainsi obtenue est de $[\alpha]_D^{27} = -28,6^\circ$ (dans l'eau).

REVENDICATIONS

1. Procédé pour préparer la L-thréonine, caractérisé en ce que l'on fait réagir de la D-thréonine-aldolase ou de la D-thréonine-aldolase et de la L-allothrénine-aldolase sur une solution contenant au moins de la DL-thréonine.
5
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que cette solution est une solution de DL-thréonine.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé
10 en ce que cette solution est une solution d'un mélange de DL-thréonine et de DL-allothrénine.
4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que cette solution est traitée avec de la D-thréonine-aldolase.
- 15 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que cette solution est traitée avec de la D-thréonine-aldolase et de la L-allothrénine-aldolase.
6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la D-thréonine-aldolase est une enzyme ayant une
20 activité telle qu'elle décompose la D-thréonine et la D-allothrénine de façon asymétrique en glycine et acétaldéhyde.
7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la L-allothrénine-aldolase est une enzyme
25 ayant une activité telle qu'elle décompose la L-allothrénine de façon asymétrique en glycine et acétaldéhyde.
8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'enzyme est un produit d'une souche de microorganisme appartenant au genre Arthrobacter, Pseudomonas
30 ou Alcaligenes.
9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la L-allothrénine-aldolase est un produit d'une souche de microorganisme appartenant au genre Bacillus, Arthrobacter, Pseudomonas ou Alcaligenes.