



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1610/85

(22) Indleveringsdag: 10 apr 1985

(41) Alm. tilgængelig: 12 okt 1985

(44) Fremlagt: 07 sep 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 11 apr 1984 JP 70906/84 25 jun 1984 JP 129261/84

(51) Int.Cl.5

C 12 P 13/22

C 12 P 13/12

/(C 12 P 13/22,

C 12 R 1:06)

(C 12 P 13/12,

C 12 R 1:06)

(71) Ansøger: *DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA; 1-4-1 Yuraku-cho; Chiyoda-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Teruzo *Miyoshi; JP, Hironoshin *Kitagawa; JP, Masaaki *Kato; JP, Susumu *Chiba; JP

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af L-alfa-aminosyrer

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Bulletin De La Societe Chimique
De France, vol. II, side 91-95 (1980)

(57) Sammendrag:

1610-85

Fremgangsmåde til fremstilling af L-aminosyrer ved hjælp af et mikrobielt enzymesystem. Fremgangsmåden omfatter behandling af en 5-substitueret hydantoin eller et N-carbamylderivat af en aminosyre med en celle fra en stamme, der hører til slægten *Arthrobacter*, fortrinsvis en ny art *Arthrobacter* sp., og som er i stand til at omdanne den 5-substituerede hydantoin eller N-carbamylderivatet til en tilsvarende L-aminosyre. Der kan også anvendes kulturer af cellen og behandlede materialer af cellen, såsom lydbehandlede celler, frosne celler, lyophiliserede celler og homogenater og ekstrakter af cellen. I fremgangsmåden kan både L- og D-former af 5-substituerede hydantoiner eller N-carbamylderivater effektivt omdannes til tilsvarende L-aminosyrer.

Den foreliggende opfindelse angår en mikrobiel fremgangsmåde til fremstilling af en L- α -aminosyre, hvor en 5-substitueret hydantoin eller et N-carbamylderivat af en aminosyre behandles med celler eller indholdene af celler fra en eventuelt forud
5 for behandlingen dyrket stamme, som hører til slægten *Arthrobacter*, og som er i stand til at omdanne den 5-substituerede hydantoin eller N-carbamylderivatet til en tilsvarende L- α -aminosyre, hvilken aminosyre eventuelt udvindes.

10 Der er blevet foreslået mikrobielle fremgangsmåder til fremstilling af L-aminosyrer ud fra 5-substituerede hydantoiner ved hjælp af forskellige mikrobielle enzymkilder, se de japan-
ske patentpublikationer nr. 13850/67, 2274/79 og 8749/79. Disse fremgangsmåder menes imidlertid at være utilfredsstillende
15 ud fra et effektivitetssynspunkt.

På den anden side kendes en fremgangsmåde til fremstilling af L-methionin ud fra DL-N-carbamylmethionin under anvendelse af et mikrobielt enzym: se japansk patentpublikation nr.
20 29678/80. Denne fremgangsmåde kræver separation af L-methionin fra D-N-carbamylmethionin, der også forbliver i reaktionsblandingen, og det er derfor ikke en tilstrækkeligt effektiv fremgangsmåde.

25 Endvidere kendes fra Bulletin de la Societe Chimique, vol. II, 1980, side 91-95 fremstillingen af L- α -aminosyrer ud fra DL- α -aminosyrehydantoiner eller DL-N-carbamyl- α -aminosyrer ved behandling med *Arthrobacter ureafaciens*. Som det fremgår af det efterfølgende sammenligningseksempel er dette dog ikke til-
30 fredsstillende.

De foreliggende opfindere har fundet, at *Arthrobacter* sp. DK-200, er i stand til effektivt at omdanne 5-substituerede hydantoiner til L- α -aminosyrer og at omdanne N-carbamylderi-
35 vater af aminosyrer til tilsvarende L- α -aminosyrer. Det har overraskende vist sig, at DK-200 altid vil give 100% ren L-form.

Formålet med den foreliggende opfindelse er derfor at tilvejebringe en mere effektiv fremgangsmåde til fremstilling af en L- α -aminosyre ud fra en tilsvarende 5-substitueret hydantoin og endvidere fremstilling af en L- α -aminosyre ud fra et tilsvarende N-carbamylderivat af en aminosyre ved hjælp af mikroorganismen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at stammen er *Arthrobacter* sp. DK-200, FERM P-7472 (FERM BP-730) eller en mutant deraf med væsentligt samme egenskaber.

Den mikrobielle stamme, der er i stand til at omdanne 5-substituerede hydantoiner og/eller N-carbamylderivater af L-, D- eller DL-aminosyrer til tilsvarende L- α -aminosyrer, og som derfor kan anvendes ifølge opfindelsen, hører til slægten *Arthrobacter*. Stammen er *Arthrobacter* sp. DK-200, der for nylig er blevet isoleret af de foreliggende opfindere.

Stammen *Arthrobacter* sp. DK-200 blev den 27. februar 1984 anbragt i the Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, 1-3, Higashi 1-chome Yatabe-machi Tsukubagun Ibaraki-ken 305, Japan, og blev tildelt FERM P-nummeret 7472, hvilket svarer til FERM BP-730. DK-200 blev deponeret i overensstemmelse med Budapest-traktaten.

De taxonomiske karaktertræk for stammen *Arthrobacter* sp. DK-200, FERM P-7472 (FERM BP-730) er som følger.

1. Morphologiske egenskaber:

0,3-0,5 x 0,8-5,0 mikrometer i cellestørrelse, polymorphe, ikke bevægelige, ingen flageller, ingen sporer, negative eller let positive ved Gram-farvning, men med gram-positive granula, og ikke syrefaste,

2. vækstegenskaber i dyrkningsmedier:

næringsagarpladekultur: bleghvide, cirkulære, konvekse og

hele kolonier,

næringsagarskråkultur: moderat vækst, blanke og trådformede,

næringsvæskeskultur: ensartet uklart, udfældning og ingen

særlig vækst på væskeoverfladen,

5 næringsgelatinestikkultur: smeltning,

3. fysiologiske egenskaber:

nitrat reduceres ikke, positive i denitrifikation, negative

10 i MR-test, negative i VP-test, producerer ikke indol, pro-

ducerer ikke hydrogensulfid, hydrolyserer ikke stivelse,

citronsyre anvendes ikke, hverken i Koser-medium eller

i Christensen-medium, både nitrat og ammoniumsalte anvendes,

pigment produceres ikke, negative i ureaseaktivitet, negative

i oxidaseaktivitet, positive i katalaseaktivitet, aerobe,

15 vækst ved en temperatur i intervallet fra 17,8-33,2°C og

en pH-værdi i intervallet fra 5-10, oxidative i OF-test,

lysin som dibasisk aminosyre i cellevæg og ikke indeholdende

mesodiaminopimelinsyre og arabinose, positive i DNase-aktivi-

tet, positive i caseinhydrolyse og vækst på 2% NaCl og

20 svag vækst på 5% NaCl,

dannelse af syre og gas ud fra sukkerarter:

25

30

35

	Sukker	Syre	Gas
	L-arabinose	-	-
	D-xylose	+	-
5	D-glucose	±	-
	D-mannose	+	-
	D-fructose	±	-
	D-galactose	±	-
	maltose	±	-
10	saccharose	±	-
	lactose	±	-
	trehalose	±	-
	D-sorbitol	±	-
	D-mannitol	±	-
15	inositol	±	-
	glycerol	+	-

Assimilering af hydrocarboner:

	p-hydroxybenzoesyre	-
20	gluconsyre	-
	mælkesyre	-
	eddikesyre	-
	glucose	+
25	saccharose	+
	xylose	+
	lactose	-
	mannitol	+

30 Ifølge Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. udgave (1974), identificeres stammen DK-200 som tilhørende slægten Arthrobacter på basis af de taxonomiske karaktertræk, dvs. (1) polymorph, (2) gram-positive granula indeholdt i cellen og (3) lysin indeholdt i cellevæggen og ingen mesodiamino-

35 pimelinsyre eller arabinose indeholdt i cellevæggen. Desuden menes stammen DK-200 ifølge opfindelsen at høre til den nye art af slægten Arthrobacter, eftersom dens taxonomiske egenskaber er forskellige fra egenskaberne for enhver stamme hørende

til kendte arter. DK-200 adskiller sig fra *A. ureafaciens*, med hensyn til substratspecificitet og den optiske renhed af de fremstillede aminosyrer, hvad der fremgår af det efterfølgende sammenligningseksempel.

5

10

Stammen DK-200 kan opformeres i store mængder ved hjælp af en hvilken som helst sædvanlig, aerob væskedyrking i et medium indeholdende en carbonkilde, en nitrogenkilde, uorganiske salte og en lille mængde organiske næringsstoffer, der kan assimileres af stammen. Enzymaktiviteten kan forøges ved tilsætning af en lille mængde L-carbamyltryptophan eller lignende til dyrkningsmediet. Dyrkningen kan udføres ved en pH-værdi i intervallet fra 4-11 og ved en temperatur i intervallet fra 15-40°C i en tidsperiode på 5-120 timer.

15

20

Den således opnåede kultur indeholdende cellerne kan fortrinsvis anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen som den celle, der skal omdanne 5-substituerede hydantoiner eller N-carbamylderivater af aminosyrer til tilsvarende ønskede L- α -aminosyrer. Ud over cellekulturen kan der ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes behandlede celler, såsom frosne celler, lyophiliserede celler, lydbehandlede celler, og cellerester, f.eks. homogenater og ekstrakter fra cellerne, såvel som intakte celler.

25

30

35

Nogle eksempler på 5-substituerede hydantoiner, der anvendes som udgangsmaterialer ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, omfatter 5-benzylhydantoin, 5-indolylmethylhydantoin og 5-(4-hydroxybenzyl)-hydantoin. Eksempler på N-carbamylderivater af aminosyrer omfatter N-carbamylphenylalanin, N-carbamyltryptophan og N-carbamyltyrosin. Disse udgangsmaterialer kan være i en hvilken som helst form af D, L eller DL. Udgangsmaterialerne er kendte eller kan fremstilles på en hvilken som helst sædvanlig måde. DL-N-carbamylderivater kan f.eks. fremstilles ved omsætning af DL-aminosyrer med kaliumcyanid, eller ved hydrolyse af DL-hydantoinderivater af aminosyrer under passende betingelser.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan der anvendes 0,1-40%, fortrinsvis 1-10 vægt% 5-substitueret hydantoin eller 0,1-50 vægt% N-carbamylderivat af aminosyre i reaktionsblandingen. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan hensigtsmæssigt udføres ved en pH-værdi i intervallet fra 4 til 11, fortrinsvis fra 6 til 9. Reaktionsbetingelser uden for disse intervaller er i praksis ineffektive med hensyn til enzymaktivitet og stabilitet. pH-værdien kan variere, når reaktionen skrider frem, og derfor bør pH-værdien bibeholdes på en ønsket værdi ved tilsætning af et passende, neutraliserende middel. Reaktionstemperaturen kan være i intervallet fra 15-50°C. Desuden vil en lille mængde, f.eks. 0,1-10 mM af en metalion, såsom Mn^{2+} , Co^{2+} eller lignende, give bedre resultater.

Den dannede L- α -aminosyre kan skilles fra reaktionsblandingen ved f.eks. at centrifugere blandingen for at fjerne uopløseligt stof, såsom cellerne, føre supernatanten gennem en kationbytterharpiks af en stærk syre- H^+ -type, for at adsorbere L- α -aminosyrerne, efterfulgt af eluering af disse med vandig ammoniak og yderligere koncentrering og afkøling for at afsætte krystaller.

Ifølge den foreliggende opfindelse kan L- α -aminosyrerne fremstilles meget effektivt ud fra 5-substituerede hydantoiner eller N-carbamylderivater af aminosyrer, uafhængigt af D-, L- eller DL-formen af udgangsmaterialerne.

Opfindelsen vil blive fuldstændigt illustreret af de følgende eksempler. I disse eksempler er % baseret på vægt, med mindre andet angives.

Eksempel 1

En mængde medium indeholdende 0,5% glucose, 0,2% gærekstrakt, 0,1% dinatriumhydrogenphosphat, 0,05% kaliumdihydrogenphosphat og 0,05% magnesiumsulfat, pH-værdi 7,5, blev fordelt i et antal testrør og steriliseret ved 120°C i 15 minutter. DL-

N-carbamyltryptophan, der på anden måde var blevet steriliseret, blev sat til hvert af testrørene til en endelig koncentration på 0,05%. *Arthrobacter* sp. DK-200-stamme blev derpå podet på mediet og dyrket under omrystning ved 30°C i 24 timer.

5 Til det dyrkede medium blev sat hver af de 5-substituerede hydantoiner, der er anført i tabel 1 nedenfor, og omrystning af kulturen blev foretaget ved 30°C i yderligere 24 timer. Efter reaktion blev cellerne fjernet ved centrifugering. Aminosyrer i supernatanten blev analyseret kvantitativt ved hjælp
10 af HPLC og en bioassay under anvendelse af *Lactobacillus arabinosus* (ATCC nr. 8014). Baseret på resultaterne af begge analyser blev hvert produkt identificeret som den respektive L- α -aminosyre, som vist i tabel 1.

15

Tabel 1

	5-substitueret	produkt	HPLC	bioassay
	hydantoin (0,1 M)	L-aminosyre	(mM)	(mM)
20	DL-5-benzylhydantoin	L-phenylalanin	58	58
	DL-5-indolylmethyl-hydantoin	L-tryptophan	61	61
	DL-5-(4-hydroxybenzyl)-hydantoin	L-tyrosin	55	55
25				

Eksempel 2

30 Til en 500 ml kolbe blev sat 100 ml medium indeholdende 0,5% glucose, 0,2% gærekstrakt, 0,1% dinatriumhydrogenphosphat, 0,05% kaliumdihydrogenphosphat, 0,05% magnesiumsulfat og 0,1% DL-5-indolylmethylhydantoin, pH-værdi 7,5, og kolben blev steriliseret ved 120°C i 15 minutter. Til kolben blev podet

35

5 ml af en podekultur af *Arthrobacter* sp. DK-200, der var blevet dyrket ved 30°C i 20 timer i et medium, pH-værdi 7,5, indeholdende 0,5% glucose, 0,5% gærekstrakt, 0,5% polypepton og 0,5% natriumchlorid. Efter 24 timers dyrkning ved 30°C blev cellerne skilt fra dyrkningsmediet ved centrifugering og vasket én gang med saltvand.

Cellerne blev suspenderet i 100 ml 0,1 M Tris HCl-puffer, pH-værdi 7,0, indeholdende 0,2 M DL-5-benzylhydantoin og 0,5 mM coboltchlorid, og inkuberet ved 35°C i 65 timer. Efter reaktion blev cellerne fjernet ved centrifugering. Supernatanten blev koncentreret til 20 ml og afkølet til udfældning af krystaller. Krystallerne blev analyseret ved hjælp af TLC, HPLC, NMR og polarimetri, og data svarende til en standardprøve af L-phenylalanin blev opnået som vist i tabel 2.

Tabel 2

L-phenylalanin	²⁰ [α] _D (c=2, H ₂ O)
Produkt ifølge eksempel 2	-34,6
Standardprøve	-34,7

Eksempel 3

Celler, opnået på samme måde som i eksempel 1, blev suspenderet i 2 ml 0,1 M Tris HCl-puffer, pH-værdi 7,5, indeholdende 0,5 mM coboltchlorid, og 1 mM manganchlorid. Suspensionen blev tre gange udsat for ultralydbehandling ved 20 kHz i 3 minutter under køling på et isbad.

0

D-5-benzylhydantoin blev tilsat (0,1 M) til suspensionen indeholdende cellerester, og blandingen blev inkuberet ved 35°C i 40 timer. Efter reaktion blev uopløseligt materiale fra-centrifugeret. Der opnåedes produktet L-phenylalanin fra super-
 5 natanten med et udbytte på 82%. Produktets identitet blev bekræftet ved HPLC og bioassay.

Eksempel 4

10

Et medium, pH-værdi 7,0, indeholdende 0,5% glucose, 0,2% gær-ekstrakt, 0,1% dinatriumhydrogenphosphat, 0,05% kaliumdihydrogenphosphat og 0,05% magnesiumsulfat blev fordelt i et antal testrør, hver i en mængde på 5 ml, og steriliseret ved 120°C i 15 minutter. DL-N-carbamyltryptophan, der på anden måde
 15 var blevet steriliseret, blev sat til hvert af rørene til en endelig koncentration på 0,1%. Arthrobacter sp. DK-200-stamme blev derpå podet på mediet og inkuberet ved 30°C i 24 timer under omrystning.

20

Celler, opsamlet fra mediet ved centrifugering, blev vasket med den samme mængde saltvand og suspenderet i 5 ml 0,1 M Tris-HCl-puffer, pH-værdi 7,5, indeholdende 0,1 mM mangan-chlorid og 0,1 M L-N-carbamylaminosyre, der alle er opført i tabel 3 nedenfor. Reaktionen blev udført ved 35°C i 20 timer.
 25 Kvantitative målinger af produkterne ved bioassay med Lactobacillus arabinosus, ATCC nr. 8014, og HPLC blev udført, og resultaterne er vist i tabel 3. Som vist i tabel 3 blev de opnåede produkter identificeret som de tilsvarende respektive L-aminosyrer.

30

Tabel 3

Substrat (0,1 M)	Produkt L- α -aminosyre	HPLC (mM)	Bioassay (mM)
L-N-carbamylphenylalanin	L-phenylalanin	85	85
L-N-carbamyltryptophan	L-tryptophan	79	
79			
L-N-carbamyltyrosin	L-tyrosin	84	84

35

Eksempel 5

Celler, der var blevet opnået på samme måde som i eksempel 4 bortset fra, at der anvendtes 500 ml Erlenmeyerkolber indeholdende 100 ml medium, blev suspenderet i 100 ml 0,1 M Tris-HCl-puffer, pH-værdi 7,0, indeholdende 0,1 M D-N-carbamyl-aminosyre, opført i tabel 4 nedenfor, 0,5 mM coboltchlorid og 1 mM manganchlorid, og inkuberet ved 35°C i 60 timer. HPLC-analyse af reaktionsblandingen viste, at reaktionen var blevet næsten fuldendt ved denne fremgangsmåde.

Efter centrifugering for at fjerne cellerne blev supernatanten koncentreret til 25 ml, og ca. 5 ml ethanol blev tilsat og afkølet til 5°C for at udfælde krystaller. Krystallerne blev rekrySTALLiseret og analyseret ved HPLC, TLC, bioassay, NMR og polarimetri. Sammenligninger af de opnåede data med de for standardprøver af de tilsvarende L- α -aminosyrer gav sikkerhed for identiteten af produkterne, som vist i tabel 4.

Tabel 4

Substrat (0,1 M)	Produkt L- α -aminosyre	Krystal (g)	specifik rotation $[\alpha]_D^{20}$ (H ₂ O)
D-N-carbamylphenyl- alanin	L-phenylalanin	1,2	-34,4 (-34,5)*
D-N-carbamyltrypto- phan	L-tryptophan	0,9	-33,6 (-33,7)*
D-N-carbamyltyrosin	L-tyrosin	0,7	-11,8** (-11,8)*

* standardprøve

** i 5N HCl-opløsning

Eksempel 6

Fremgangsmåderne fra eksempel 5 blev gentaget bortset fra,

at D-N-carbamylaminosyrerne blev erstattet med DL-N-carbamylaminosyrer. Analyseresultaterne af de opnåede produkter svarede til de for standardprøver, som vist i tabel 5.

Tabel 5

Substrat (0,1 M)	Produkt L- α -aminosyre	Krystal (g)	specifik rotation $[\alpha]_D^{20}(\text{H}_2\text{O})$
DL-N-carbamyl-phenylalanin	L-phenylalanin	1,7	-34,4 (-34,5)*
DL-N-carbamyl-tryptophan	L-tryptophan	1,3	-33,6 (-33,7)*
DL-N-carbamyl-tyrosin	L-tyrosin	1,4	-11,8** (-11,8)*

* standardprøve

** i 5N HCl-opløsning

Eksempel 7

Celler, opnået på samme måde som i eksempel 5, blev suspenderet i 20 ml 0,1 M Tris-HCl-puffer, pH-værdi 7,0, indeholdende 0,5% mM coboltchlorid og 1 mM manganchlorid. Suspensionen blev tre gange underkastet ultralydsbehandling ved 20 kHz i 3 minutter under køling på et isbad.

DL-N-carbamylaminosyre blev sat til cellerestopløsningen i en koncentration på 0,1 M, og blandingen blev inkuberet ved 30°C i 20 timer. Efter reaktion blev uopløseligt materiale fjernet ved centrifugering, og den resulterende supernatant blev analyseret ved hjælp af HPLC og bioassay. Produkterne blev således identificeret som de tilsvarende L- α -aminosyrer på basis af resultaterne af analyserne, som vist i tabel 6.

Tabel 6

	Substrat (0,1 M)	Produkt L- α -aminosyre	HPLC (mM)	Bioassay (mM)
5	DL-N-carbamylphenyl- alanin	L-phenylalanin	78	78
	DL-N-carbamyltryp- tophan	L-tryptophan	75	75
10	DL-N-carbamyltyrosin	L-tyrosin	69	69

Sammenligningseksempel

15

Sammenligningsforsøgene blev foretaget mellem stammerne A. sp. DK-200 og A. ureafaciens.

(1) Substratspecificitet.

20

Tabel 7

		Relativ aktivitet (%)	
		<u>DK-200</u>	<u>A. ureafaciens</u>
25	Hydantointryptophan	100	100
	Hydantoinphenylalanin	95	97
	Hydantoinmethionin	< 10	44

Som det fremgår af tabel 7 ovenfor er der en signifikant forskel i aktiviteten med hensyn til hydantoinmethionin.

30

(2) Optimal pH-værdi.

Den optimale pH-værdi for A. ureafaciens er i intervallet fra 7,5 til 8 (eller 7,8), idet reaktionen ikke vil foregå ved pH-værdi 6. På den anden side kan DK-200 bevare høje aktiviteter ved pH-værdi 6 eller selv ved 5,5 (se tabel 8 nedenfor).

35

Tabel 8

<u>Resultater efter 115 timers reaktion (DK-200)</u>		
Reaktion- pH-værdi	Molært udbytte (%) af aminosyre	Optisk renhed (%) i L-form
5		
7,5	95,7	100
6,5	93,2	100
6,0	90,9	100
10	5,5	83,2
		100

(3) Optisk renhed

Den optiske renhed af phenylalanin, som blev opnået under anvendelse af A. ureafaciens, vil variere med reaktionsbetingelserne og kan være over ca. 90%. I modsætning hertil vil DK-200 altid give 100% L-form, som det fremgår af tabel 8 ovenfor. Set fra et industrielt synspunkt er denne forskel meget vigtig, idet produktet, som opnås ved anvendelse af A. ureafaciens kan indeholde så meget som 10% D-form og det vil være nødvendigt med en opspaltningsproces til sådanne anvendelser, som kræver L-form med højere renheder. DK-200 og A. ureafaciens har forskellige mycologiske egenskaber, og DK-200 har fordele som det fremgår af det ovenstående sammenlignet med A. ureafaciens.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en L- α -aminosyre, hvor en 5-substitueret hydantoin eller et N-carbamylderivat af en aminosyre behandles med celler eller indholdene af celler fra en eventuelt forud for behandlingen dyrket stamme, som hører til slægten Arthrobacter, og som er i stand til at omdanne den 5-substituerede hydantoin eller N-carbamylderivatet til en tilsvarende L- α -aminosyre, hvilken aminosyre eventuelt udvindes, k e n d e t e g n e t ved, at stammen er Arthrobacter

sp. DK-200, FERM P-7472 (FERM BP-730) eller en mutant deraf med væsentligt samme egenskaber.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
5 at den 5-substituerede hydantoin er L-, D- eller DL-5-benzyl-
hydantoin, og at L- α -aminosyren er L-phenylalanin.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
10 at den 5-substituerede hydantoin er L-, D- eller DL-5-indolyl-
methylhydantoin, og at L- α -aminosyren er L-tryptophan.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
15 at den 5-substituerede hydantoin er L-, D- eller DL-5-(4-hy-
droxybenzyl)-hydantoin, og at L- α -aminosyren er L-tyrosin.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
at N-carbamylderivatet er L-, D- eller DL-N-carbamylphenyl-
alanin, og at L- α -aminosyren er L-phenylalanin.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
20 at N-carbamylderivatet er L-, D- eller DL-N-carbamyltrypto-
phan, og at L- α -aminosyren er L-tryptophan.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
25 at N-carbamylderivatet er L-, D- eller DL-N-carbamyltyrosin,
og at L- α -aminosyren er L-tyrosin.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
at cellerne er en kultur af *Arthrobacter* sp. DK-200.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
30 at indholdene fra cellerne er en lydbehandlet celle, en fros-
sen celle, en lyofiliseret celle eller et homogenat eller eks-
trakt, hydrørende fra cellen.