

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭61-234788

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 P 13/00

識別記号 庁内整理番号  
8213-4B\*

⑭ 公開 昭和61年(1986)10月20日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 L-カルニチンの製造方法

⑯ 特 願 昭60-77925

⑰ 出 願 昭60(1985)4月11日

⑱ 発 明 者	河 村	昌 男	明石市東朝霧丘18-10
⑲ 発 明 者	安 久 津	成 一	加古川市山手2-24-15
⑳ 発 明 者	福 田	博 介	姫路市飾磨区今在家1044
㉑ 発 明 者	畑	啓 之	加古川市上荘町国包189-1
㉒ 発 明 者	森 下	剛 志	姫路市飾磨区今在家1044
㉓ 発 明 者	叶	健 児	姫路市飾磨区今在家1044
㉔ 発 明 者	西 森	弘 訓	姫路市飾磨区今在家1044
㉕ 出 願 人	製鉄化学工業株式会社		兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

L-カルニチンの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) クロトノベタイン存在下微生物を嫌気条件下で培養することにより、クロトノベタインより光学活性L-カルニチンを生産することを特徴とするL-カルニチンの製造方法。

(2) 微生物がエシエリヒア (Escherichia) 属, エンテロバクター (Enterobacter) 属, シトロバクター (Citrobacter) 属, バクテリウム (Bacterium) 属, アシネトバクター (Acinetobacter) 属, セラチア (Serratia) 属, プロテウス (Proteus) 属, サルモネラ (Salmonella) 属, ハフニア (Hafnia) 属, フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属, ミクロコッカス (Micrococcus) 属よりなる群より選ばれた属に属する少なくとも一種の微生物である特許請求の範囲 (1) 記載の方法。

(3) 嫌気条件下での培養時に微生物の産生する電子を受容し得る化合物を添加する特許請求の範囲 (1) 記載の方法。

(4) 電子を受容し得る化合物が硝酸カリウムまたは硝酸ナトリウムである特許請求の範囲 (3) 記載の方法。

3. 発明の詳細を説明

〔発明の目的〕

本発明は、クロトノベタイン存在下微生物を嫌気条件下で培養することにより、クロトノベタインより光学活性L-カルニチンを製造する方法に関する。

(産業上の利用分野)

本発明の新規性は、微生物をクロトノベタイン存在下で嫌氣的に培養して効率的にL-カルニチンを生産する点にある。

カルニチン (β-ヒドロキシ-γ-トリメチル-α-アミノ酪酸) にはD体およびL体の2種類の立体異性体が存在することはよく知られている。L

ーカルニチンは、通常生体内に存在し、活性化した長鎖の遊離脂肪酸をミトコンドリア膜から通過させるキャリアーとしての働きを有する。

カルニチンは左旋性のL-カルニチンのみが天然物の形態であるにもかかわらず、ラセミ体のカルニチンが食欲増進剤などに用いられてきた。

しかし最近、少なくともいくつかの治療学的使用に対しては、L-カルニチンのみを使用する方が効果的であることが明らかにされ、その重要性に対する関心が高まりつつある。

実際、心血管系での急性ならびに慢性の心筋虚血、狭心症、心臓性の不整脈または、心不全の治療に用いられている。

(従来の技術)

光学活性L-カルニチンの製法としては、例えば下記の方法が知られている。

(1) 化学的な合成法によって得られたラセミ体のカルニチンを光学分割する方法。その光学分割の方法は、前駆体であるDL-カルニチンニトリ

作が複雑で収率が悪い。

(2)は、原料の3-デヒドロカルニチンが不安定で取扱が困難な上、補酵素として高価なNADHあるいはNADを必要とする。

(3)は、原料となるア-ブチロベタインが高価であるなどの理由で、以上あげたいずれの方法も工業的製造法としては有利な方法とは云えない。

また、(4)の好気培養の場合、通気、攪拌を必要とし、培養管理が煩雑となり、また更に多くの付帯設備を必要とする。

そこで本発明者らは、エピクロルヒドリンより安価に製造できるクロトノベタインに着目し、L-カルニチンの新規製造法の開発を目的とし、鋭意検討を行なった結果、クロトノベタイン存在下微生物を嫌氣的に培養することにより、効率的にL-カルニチンを生産しうることを見い出し、本発明を完成するに至った。

更に嫌気条件下の培養においては、通気、攪拌などの煩雑な培養管理の必要がなく、かつ付帯設

備にN-アセチル-D-グルタミン酸または、N-アセチル-L-グルタミン酸を分割剤として加え塩を生成させ、溶解度の差を利用して分割し、次いでこれを加水分解して、L-およびD-カルニチンクロライドとなす(特公昭43-8248)、が代表的なものである。

(2) 3-デヒドロカルニチンを微生物の酵素(カルニチンデヒドロゲナーゼ)の作用で不斉還元して、L-カルニチンを得る方法。

(米国特許第4,221,869号)

(3) ア-ブチロベタインに微生物の酵素(ヒドロキシラーゼ)を反応させることにより、L-カルニチンを製造する方法。(特開昭57-39791)

(4) 好氣的培養法、あるいは好氣的培養法により得られた菌体を用いる方法によりクロトノベタインより、L-カルニチンを製造する方法(特開昭59-183694、特開昭59-192095)がある。

しかしながら、(1)は光学分割剤として用いるN-アセチル-D-グルタミン酸が高価であり、操

備の軽減が可能となった。

本発明において用いるクロトノベタインより光学活性L-カルニチンを生産せしめる能力を有する微生物としては、例えば、エシエリヒア コリIFO3301、プロテウス ブルガリカス IFO3851、プロテウス ミラビリス ATCC12453、シトロバクター インターメディアス IFO13539、フラボバクテリウム エステロアロマティカム IFO3751、サルモネラ チフィムリウム IFO12529、バクテリウム グラシル IFO3231、エンテロバクター クロアカエ IFO3320、アシネトバクター カルコアセチカス IFO13006、セラチア マルセンサス、IFO3736、ハフニア アルベイ IFO3731、ミクロコッカス ロゼウス IFO3768等がある。

本発明に用いられる培地は、クロトノベタインを含むほかは炭素源：窒素源：無機イオンなどを含有する通常の培地である。

更にビタミン・アミノ酸などの有機微量栄養素を添加すると望ましい結果が得られる場合が多い。

炭素源としては、グルコース、マルトースなどの炭水化物、酢酸などの有機酸、アルコール類、その他が使用できる。

窒素源としては、アンモニウム塩、ペプトン、酵母エキス、コーンステイプリカーなどを用いることができる。

無機イオンとしては、マグネシウムイオン、磷酸イオン、カリイオン、その他が必要に応じて適宜使用できる。

更に嫌気条件下での培養時に微生物の産生する電子を受容し得る化合物、例えば硝酸塩、トリメチルアミンオキシド、フマル酸、メチオニンスルホキシドなどを添加すると、望ましい結果が得られる場合が多い。

培養は、嫌気的条件下で行なう。培養に適した温度は通常は、15～60℃、好適には25～40℃とするのがよい。

培地の初発pHは3～9、好適には5～8がよい結果を与える。

通常1～10日間の培養を行なえば望ましい結果が得られる。

以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明する。

実施例 1

表-1に記した微生物を0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.7%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5% 酵母エキス、0.5% ポリペプトン、0.5% クロトノベタイン、pH 7.0の組成の培地20mlに接種した後、密栓し温度30℃で嫌氣的に48時間培養した。

培養終了後、培養上清に含まれるL-カルニチン量をカルニチンアセチルトランスフェラーゼと、DTNBを用いる方法(Methods in Enzymology 14 612(1969))で定量した。

結果を表-1に示す。

表 - 1

菌 名	生成L-カルニチン濃度(%)
エシエリア コリ IFO3301	0.14
プロテウス プルガリス IFO3851	0.22
プロテウス ミラビリス ATCC12453	0.08
シトロバクター インターメディアス IFO13539	0.16
フラボバクテリウム エステロプロマチイカム IFO3751	0.13
サルモネラ チフィリウム IFO12529	0.12
バクテリウム グラシム IFO3231	0.11
エンテロバクター クロアキエ IFO3320	0.16
アシネトバクター カルコアセチイカス IFO13006	0.12
セラチアキ マルセンサス IFO3736	0.18
ハフニア アルベイ IFO3731	0.14
ミクロコッカス ロゼウス IFO3768	0.13

実施例 2

エシエリア コリ IFO3301を実施例1に示した培地に接種し、表-2に示す化合物を0.5%濃度となるように添加した後、温度30℃で嫌氣的に48時間培養した。培養終了後、培養上清に含まれるL-カルニチン量を実施例1に示した方法で測定した。結果を表-2に示す。

表 - 2

化 合 物	生成L-カルニチン濃度(%)
無 添 加	0.12
$\text{KNO}_3$	0.25
$\text{NaNO}_3$	0.24
フ マ ー ル 酸	0.19
トリメチルアミンオキシド	0.24
メチオニンスルホキシド	0.18

## 実施例 3

プロテウス ミラビリス ATCC12453を、  
 0.5%硝酸カリウムを共存させた以外は実施例1  
 に示したと同様の組成の培地25ℓに接種し、温  
 度30℃で嫌氣的に48時間培養した。培養終了  
 後、遠心分離して得られた培養上清より、陽イオ  
 ン交換樹脂を使って粗カルニチン画分を得た。こ  
 の粗カルニチン画分を亜硫酸水素ナトリウムを用  
 いる方法(特願昭59-187377)によってクロ/  
 トノベタインを除いた後、減圧濃縮、アセトン-  
 エタノールを添加する方法(特願昭59-187377)により、4.2gのL-カルニチンを得た。

得られたL-カルニチンの旋光度は、 $[\alpha]_D^{25} = -30.3^\circ$  (C = 1.06, 水溶液)であった。

出願人 製鉄化学工業株式会社

代表者 佐々木 浩

## 第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号
//(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:185)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:01)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:425)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:42)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:20)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:265)		