

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-271996

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)12月2日

C 12 P 13/00

8213-4B※

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 L-カルニチンを製造する方法

⑯ 特 願 昭60-112828

⑰ 出 願 昭60(1985)5月25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-カルニチンを製造する方法

2. 特許請求の範囲

(1) クロトノバタインを含まない培地で培養した微生物菌体を用い、栄養および酸素量を制限した反応系でクロトノバタインよりL-カルニチンを得ることを特徴とするL-カルニチンの製造方法。

(2) 微生物菌体がマイコバクテリウム(Mycobacterium)属、ノカルディア(Nocardia)属、ストレプトマイセス(Streptomyces)属、ムコール(Hu cor)属、リゾプス(Rhizopus)属、アブシディア(Absidia)属、フィコマイセス(Phycomyces)属、エレモテシウム(Eremothecium)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、ペニシリウム(Penicillium)属、モナスカス(Monascus)属、ノイロスボラ(Neurospora)属、オオスボラ(Oospora)属、プルラリア(Pullularia)属、フサリウム(Fusarium)属、ジベレラ(Gibberella)属、ウ

スティラゴ(Ustilago)属、ケラチノマイセス(Keratinomyces)属、スポロトリクス(Sporothrix)属、トリコデルマ(Trichoderma)属、フェルティシリウム(Verticillium)属、イサリア(Isaria)属、グリオクラジウム(Gliocladium)属、トリコフィトン(Trichophyton)属、フィトフトラ(Phytophthora)属、シリンドロカルボン(Cylindrocarpus)属、サッカロマイセス(Saccharomyces)属、エレマスカス(Eremascus)属、エンドマイセス(Endomyces)属、エンドマイコプシス(Endomycopsis)属、シゾサッカロマイセス(Schizosaccharomyces)属、ピチア(Pichia)属、ハンセヌラ(Hansenula)属、シバニオマイセス(Schiwanniomyces)属、デバリオマイセス(Debaryomyces)属、サッカロマイコデス(Saccharomycodes)属、ハンセニアスボラ(Hanseniaspora)属、ナドソニア(Nadsonia)属、ネマトスボラ(Nematospira)属、リボマイセス(Lipomyces)属、スポロボロマイセス(Sporobolomyces)属、クリプトコッカス(Cryptococcus)属、トルロプシス(Torulopsis)属、ピティ

ロスボラム(*Pityrosporium*)属、ブレタノマイセス(*Brettanomyces*)属、キャンディダ(*Candida*)属、クロエッケラ(*Kloeckera*)属、トリゴノプシス(*Trigonopsis*)属、ウイカーハミア(*Wickerhamia*)属、クスイバロマイセス(*Kluyveromyces*)属、ブレラ(*Bullera*)属、ロドトルラ(*Rhodotorula*)属、トリコスポロン(*Trichosporon*)属、グレオフィラム(*Gleophyllum*)属、シゾフィラム(*Shizophyllum*)属、トラメテス(*Trametes*)属、よりなる群より選ばれた属に属する少なくとも一種である特許請求の範囲(1)記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

(発明の目的)

本発明はクロトノバタインを含まない培地で培養した微生物菌体を用いて栄養および酸素量を制限した反応系で、クロトノバタインよりL-カルニチンを生育させる方法すなわち培養液より遠心分離等で得た微生物菌体をクロトノバタインを含む溶液に加えることにより、クロトノバタインよりL-カルニチンを生成させる方法に関する。

療に用いられている。

(従来の技術)

(発明が解決しようとする問題点)

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-カルニチンニトリルに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4221, 869号)

(3) ギャブチロバ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

(産業上の利用分野)

本発明は、クロトノバタインを含まない通常の培地で培養した微生物菌体を用いて、安価に入手できるクロトノバタインより有利に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-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

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る菌体を用いて、クロトノバタインよりL-カルニチンを製造する方法。(特開昭 59-183694, 特開昭 59-192095)

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、原料となるギャブチロバ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)は、本発明者らの追試によれば好氣的に培養した菌体においては、カルニチンヒドロリアーゼ誘導物質存在下での培養にもかかわらず、カルニチンヒドロリアーゼ活性を取得し得ない菌種が多数存在するし、カルニチンヒドロリアーゼ活性を取得した菌株についてもその活性が弱い場

合が多い。

そこで本発明者らは、原料としてエビクロルヒドリンより安価に製造できるクロトノバタインに着目し、L-カルニチンの新規製造法の開発を目的として検討を行なった結果、DL-カルニチン、L-カルニチン、クロトノバタインなどのカルニチンヒドロリアーゼ誘導物質存在下、微生物を嫌氣的に培養すると多数の菌種の菌体において強いカルニチンヒドロリアーゼ活性が誘導されることを見出した(特願昭59-187378)。しかしながらこの方法においては、嫌気条件下の培養であるために、大部分の放線菌、カビ、酵母、担子菌は本L-カルニチンの製造には使用出来なかったし、もし使用出来たとしても弱い活性しか示さなかった。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは能力を有するにもかかわらず利用出来ないこれら多くの菌株を利用することを目的に鋭意検討を重ねた結果、通常の培地で好氣的に培養した菌体を栄養および酸素量を制限し

形で回収することはかなり困難であった。

しかし本発明の方法においては培養液からのバタイン化合物の回収を考慮する必要は全くない。しかも特筆すべきことに反応系においてアープチロバタインの生成が全く認められない。

さらに本発明の方法において生成されるL-カルニチン濃度は従来の方法において培養液中に蓄積されるL-カルニチン濃度よりも高い場合が多い。

本発明の方法は無栄養または微栄養溶液中での反応であるため菌体の増殖はほとんどなく、培養法で問題となるコンタミネーションが起こらない。また反応系のpHの変化もほとんどないためpH調整用の緩衝剤をほとんど添加しなくてもすむ。これらの点はL-カルニチン精製時に用いるイオン交換樹脂に負荷を与える培地成分や緩衝剤の量を低減させるという効果も併せ持つ。

本発明の実施態様の一例を説明すると、菌体取得のためには例えば、麦芽エキス5%、酵母エキス0.3%よりなる液体培地5mlに、斜面培地か

ら反応系でクロトノバタインを含む溶液に加えるとクロトノバタインよりL-カルニチンが生成することを見出し、本発明に至った。

本発明の方法によれば、クロトノバタインを含まない培地より好氣的に得られた菌体を栄養制限下クロトノバタインと共存させることにより、L-カルニチンが得られることが認められ、この際酸素量を制限するほどL-カルニチンの収率の向上が認められた。同時に本発明によると好氣的に増殖させた菌体を用いるため高濃度の菌体液が調製でき、反応にあずかる菌体数も多くなるため結果として反応時間の短縮、基質濃度の向上が可能となる。換言すれば小容量の好氣的培養で大容量の反応を行なうことも可能となる。

(作用)

従来の方法では培養時にクロトノバタインあるいはDL-カルニチンを加えたため、培養液からそれらに由来するバタイン化合物の分離が必要であった。しかも副生してくるアープチロバタインのためにクロトノバタイン、カルニチンを純粋な

らロドトルラ ミヌタ(IFO 0387)の種菌を1白金耳量接種し、30℃で2日間、好氣的に培養した。この培養液から遠心分離により得られた菌体を5mlの生理食塩水で洗浄後反応に供した。反応は得られた菌体をクロトノバタイン1.5%(105mM)を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6)中に添加した後、30℃で2日間密栓下酸素を制限した状態で振盪することにより反応を行なった。得られた反応液から遠心分離により菌体を取り除いた後、80℃で5分間加熱処理を行なったこの処理液はD.J.Pearsonらの酵素法(Method in Enzymology 14,612(1969))で分析すると45mMのL-カルニチンを含んでいた。

本発明においてクロトノバタインをL-カルニチンに変換せしめる能力を有する微生物としては、例えばマイコバクテリウム アビウム IFO 3082、ノカルディア アステロイデス IFO 3423、ストレプトマイセス アルプス IFO 13014、ムコールラセモサス IFO 4581、リゾプス オリザエ IFO 4705、アプシディア コエルレア IFO

4011、フィコマイセス ニテンス IF0 5695、
 エレモテシウム アシビイ IF0 0557、アスペル
 ギルスニガー IF0 4416、ベニシリウム オキサ
 リカム IF0 5748、モナスカス アンカ IF0 596
 5、ノイロスボラ クラッサ IF0 6660、オオス
 ボラ ビスコサ IF0 4604、アルラリア ベルネ
 ッキ IF0 6407、フサリウム ソラニ IF0 5232、
 ジベレラ フジクロイ IF0 6604、ウスティラゴ
 ゼアエ IF0 6907、ケラチノマイセス アジェ
 ロイ IF0 7865、スポロトリクス シェンキイ I
 F0 5983、トリコデルマ ビリデ IF0 4847、フ
 ェルティシリウム アルポーアトラム IF0 5922、
 イサリア コガネ IF0 5299、グリオクラジウム
 デリクエセス IF0 6617、トリコフィトン
 メンタグロフィテス IF0 5466、フィトフトラ
 インフェスタンス IF0 4872、シリンドロカルボ
 ン デストラクタンス IF0 6796、サッカロマイ
 セス セレビシアエ IF0 0259、エレマスカス
 フェルティリス IF0 0691、エンドマイセス レ
 シ IF0 1112、エンドマイコプシス カプスラリ

0743、グレオフィラム トラベウム IF0 6429、
 シゾフィラム コムネ IF0 4928、トラメーテス
 サンギネア IF0 6490 等がある。

菌の培養条件は使用する菌株により多少異なる
 が、一般的にいえば炭素源として、グルコース、
 フラクトース、シュクロース、マルトースなど
 の糖質やグリセロールなど、窒素源として硫酸ア
 ンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸カリウム、
 尿素、アミノ酸、ペプトン、カザミノ酸、コーン
 スティープリカー、ふすま、米ぬか、酵母エキス
 など、無機塩類として硫酸マグネシウム、塩化ナ
 トリウム、炭酸カルシウム、リン酸一水素カリウ
 ム、リン酸二水素カリウムなど、他の栄養源とし
 て麦芽エキス、酵母エキス、ファーマメディアな
 どを含む培地が用いられるが、これらに限定され
 るものではない。

この培地に菌株を接種し、好氣的に培養する。
 培養に適した温度は、通常は15～60℃である
 が、更に好ましくは25～40℃である。培地の
 初発pHは、通常は3～9、好ましくは5～8の

ス IF0 0672、シゾサッカロマイセス ボンベ I
 F0 0346、ピチア ポリモルファ IF0 0195、ハ
 ンセヌラ アノマラ IF0 0149、シバニオマイセ
 ス オクシデンタリス IF0 0371、デバリオマイ
 セス ハンセニイ IF0 0023、サッカロマイコデ
 ス ルドビギイ IF0 1043、ハンセニアスボラ
 バルビエンシス IF0 0115、ナドソニア エロン
 ゲータ IF0 0665、ネマトスボラ コリーリ IF0
 0658、リボマイセス リポファー IF0 0673、
 スポロポロマイセス ホルサティカス IF0 1034、
 クリプトコッカス アルビダス IF0 0378、トル
 ロプシス キャンディダ IF0 0768、ピティロス
 ボラム オーバーレ IF0 0656、プレタノマイセス
 アノマラス IF0 0642、キャンディダ ルゴー
 サ IF0 0591、クロエッケラ ジャバニカ IF0 1
 094、トリゴノプシス バリアピリス IF0 0671、
 ウイカーハミア フルオレセンス IF0 1116、ク
 ルイペロマイセス ポリスボラス IF0 0996、ア
 ルラ アルバ IF0 1192、ロドトルラ ミヌタ I
 F0 0387、トリコスボロン キャビテイタム IF0

範囲である。通常8時間～10時間の培養で菌を
 生育させる。

このようにして得られた嫌気培養液から通常の
 方法により取り出した菌体は、クロトノバタイン
 を含む溶液と接触せしめることによって、L-カル
 ニチンを生産することが可能である。反応のp
 Hは通常2～10が、好ましくは5～7がよい結
 果を与える。反応の温度は、通常10～60℃が、
 好ましくは25～40℃である。最初に添加する
 クロトノバタイン量は、通常0.1～10%であ
 るが、好ましくは1～6%である。クロトノバタ
 インを分割添加するとよい結果を与えることもあ
 る。また、反応時にたとえば100ppm程度以下
 の実質的に菌体が増殖しない微量のコーンステ
 ープリカー、ファーマメディア、酵母エキスなど
 を加えるとよい結果を与えることがある。反応系に
 亜鉛、カリウム、カルシウム、クロム、コバルト、
 ストロンチウム、鉄、銅、ナトリウム、ニッケル、
 バリウム、マグネシウム、マンガン、モリブデン、
 リチウム等の化合物を添加すると反応収率が向上

することもある。反応は嫌気条件下等の酸素量を制限した条件で行なうほどL-カルニチンの収率が向上する。

(実施例)

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

ペプトン1%、肉エキス0.5%、酵母エキス0.1%、NaCl 0.5%よりなるPH7の培地5mlに、斜面培地から第1表に示す菌株を植菌し、30℃で2日間好気的に培養した。このようにして得られた培養液より遠心分離により菌体を得た。得られた菌体を5mlの生理食塩水で洗浄後、クロトノバタイン1.5% (105mM)を含む0.01Mのリン酸緩衝液 (PH6) 50ml中に添加した後、窒素置換し密栓下に、30℃で2日間密栓下振盪することにより反応を行なった。得られた反応液は遠心分離により菌体を取り除いた後、80℃で5分間加熱処理を行ない、酵素法で分析し第1表の結果を得た。

第 1 表

菌 名	生成L-カルニチン(mM)
マイコバクテリウム アビウム IF0 3082	19
ノカルディア アステロイデス IF0 3423	21
ストレプトマイセス アルプス IF0 3014	17

実施例2

培養に麦芽エキス5%、酵母エキス0.3%からなる液体培地を用い、種菌として第2表に示す菌株を用いた以外は実施例1と同様に行ない、第2表の結果を得た。なお、菌体は必要に応じて濾過により分離した。

第2表

菌名	IFO番号	生成L-カルニチン(%)
ムコール ラセモサス	IFO 4581	25
リゾプス オリザエ	IFO 4705	21
アブシディア コエルレア	IFO 4011	12
フィコマイセス ニテンス	IFO 5695	20
エレモテシウム アンビイ	IFO 0557	16
アスペルギルス ニガー	IFO 4416	19
ベニシリウム オキサリカム	IFO 5748	13
モナスカス アンカ	IFO 5965	12
ノイロスポラ クラッサ	IFO 6660	10
オオスポラ ビスコサ	IFO 4604	16
ブルラリア ベルネッキ	IFO 6407	11
フサリウム ソラニ	IFO 5232	18
ジベレラ フジクロイ	IFO 6604	20
ウスティラゴ ゼアエ	IFO 6907	23
ケラチノマイセス アジェロイ	IFO 7865	24
スポロトリクス シェンキイ	IFO 5983	14
トリコデルマ ビリデ	IFO 4847	19
フェルティシリウム アルポーアトラム	IFO 5922	20
イサリア コガネ	IFO 5299	23
グリオクラジウム デリクエセス	IFO 6617	22
トリコフィトン メンタグロフィテス	IFO 5466	17
フィットトラ インフェスタンス	IFO 4872	10
シンドロカルボン デストラクタンズ	IFO 6796	17
サッカロマイセス セレビスシアエ	IFO 0259	32
エレマスカス フェルティリス	IFO 0691	19
エンドマイセス レシ	IFO 1112	21
エンドマイコアシス カアスラリス	IFO 0672	13
シソサッカロマイセス ボンバ	IFO 0346	36
ピチア ポリモルファ	IFO 0195	26
ハンセヌラ アノマラ	IFO 0149	39
シバニオマイセス オクシデンタリス	IFO 0371	21

菌名	IFO番号	生成L-カルニチン(%)
デハリオマイセス ハンセニイ	IFO 0023	18
サッカロマイセス ルドビギイ	IFO 1043	41
ハンセニアスポラ ハルビエンシス	IFO 0115	45
ナドソニア エロンゲータ	IFO 0665	16
ネマトスポラ コリナー	IFO 0658	19
リボマイセス リボフラー	IFO 0673	20
スポロコックス ホルサチイカス	IFO 1034	29
クリプトコックス アルビダス	IFO 0376	29
トリオアアシス キャンヂイダ	IFO 0768	32
ピライロスボラム オバーレ	IFO 0656	23
プレタノマイセス アノマラス	IFO 0642	18
キャンヂイダ ルゴーサ	IFO 0591	42
クロエツケラ ジャハニカ	IFO 1094	12
トリコノアシス バリアピリス	IFO 0671	24
ウイカーハミア フルオレシス	IFO 1116	10
クワイバロマイセス ポリスボラス	IFO 0996	14
アルラ アルバ	IFO 1192	23
ロドリコスボロン ミヌタ	IFO 0387	45
トリコフィウム キヤビテイタム	IFO 0743	20
シソフィラム トラバウム	IFO 6429	37
シソフィラム コムネ	IFO 4928	12
トラメーテス サンギネア	IFO 6490	27

実施例3

培養スケール、反応スケールを共に10倍とし、ロドトルラ ミヌタ IFO 0387 を用いた以外は実施例2と同様に行なった。この反応スケールでは最初に加えるクロトノベタインは7.5g (52.4 mmol)であった。反応液より、菌体を遠心分離により除去して得られた上清を Dowexカラム長さ80cm、内径5cmに通し、カルニチン画分を得た。このカルニチン画分より亜硫酸水素ナトリウムで処理する方法(特願昭59-187377)を用いてクロトノベタインを除き、3.3g (20.5mmol)のL-カルニチンを得た。このL-カルニチンの比旋光度は $(\alpha)_D^{20} = -30.5^\circ$ (C=1.0水溶液)であった。

〔発明の効果〕

本発明の実施により微生物菌体を用いて工業的に有利にクロトノバタインより光学活性L-カルニチンを生成させることができ、下記の様な効果を奏することができる。

1. 小容量の培養で大容量の反応を行なうことができる。
2. γ-アチロバタインの副生が全く認められず反応液よりの分離回収が容易である。
3. 反応時にコンタミネーションが起こらない。
4. pH調整の必要がない。
5. イオン交換樹脂の量を低減させることができる。
6. 従来利用できなかった微生物菌体、特に好気性菌を利用することができる。

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

⑨Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
//(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:32)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:365)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:465)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:785)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:845)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:645)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:66)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:80)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:77)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:885)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:85)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:84)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:78)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:88)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:72)		