

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-118899

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)5月30日

C 12 P 41/00

7823-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 L-カルニチンの製造方法

⑯ 特 願 昭60-260691

⑰ 出 願 昭60(1985)11月19日

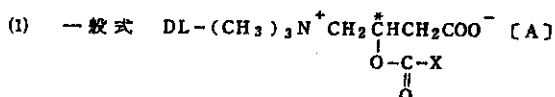
⑱ 発 明 者	河 村	昌 男	明石市東朝霞丘18-10
⑱ 発 明 者	安 久 津	成 一	加古川市山手2-24-15
⑱ 発 明 者	福 田	博 介	姫路市飾磨区今在家1044
⑱ 発 明 者	畑	啓 之	加古川市上荘町国包189-1
⑱ 発 明 者	森 下	剛 志	姫路市飾磨区今在家1044
⑱ 発 明 者	叶	健 児	姫路市飾磨区今在家1044
⑱ 発 明 者	西 森	弘 訓	姫路市飾磨区今在家1044
⑰ 出 願 人	製鉄化学工業株式会社		兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

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



(式中Xはアルキル基、アルケニル基、又は芳香族炭化水素基を示し、\*印は不斉炭素原子を示す。)で表されるDL-カルニチン誘導体及び/又はその塩に、微生物又は、該微生物より得られた酵素を作用させて立体特異的に加水分解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、プロテウス(Proteus)属、サルモネラ(Salmonella)属、セラチア(Serratia)属、シトロバクター(Citrobacter)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、マイクロコッカス(Micrococcus)属、コリネバク

テリウム(Corynebacterium)属、バシラス(Bacillus)属、シユードモナス(Pseudomonas)属、プレビバクテリウム(Brevibacterium)属、ハフニア(Hafnia)属、バクテリウム(Bacterium)属、ムコール(Mucor)属、リゾプス(Rhizopus)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、ノエロスポラ(Neurospora)属、フザリウム(Fusarium)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

(産業上の利用分野)

本発明は心血管系での急性ならびに慢性の心筋虚血、狭心症、心臓性の不整脈又は、心不全の治療薬として最近、その効果が認められるようになってきたL-カルニチンの製造方法に関する。

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体及び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、前記心血管系疾患等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。

(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-カルニチンニトリルにN-アセチル-D-グルタミン酸又は、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-及びD-カルニチ

Dropsy et al., Biotech. & Bioeng. ) 第26巻、911-915頁、1984年]

(6) ジエチル-3-ヒドロキシグルタレートを経微生物の酵素の作用で立体特異的に加水分解して、(S)-エチルヒドロジエン-3-ヒドロキシグルタレートを得、これを(R)-4-アミノ-3-ヒドロキシ酪酸とした後、メチル化剤でメチル化し、L-カルニチンとする方法。

[アラバムダ、S.ゴパランら、テトラヘドロンレターズ (Aravamudan S. Gopalan et al., Tetrahedron lett. ) 第25巻、5235-5238頁、1984年]などがある。

(発明が解決しようとする問題点)

(1)は光学分割法によるL-カルニチンの製造法として代表的であるが、しかし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、操作も複雑で収率が悪い。

(2)は、原料の3-デヒドロカルニチンが不安定で取扱いが困難な上、補酵素として高価なNADH

クロライドとなし、それからL-及びD-カルニチンを得る方法。(特公昭43-8248)

(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) アープ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) クロトノベタインを微生物の酵素の作用で不<sup>審</sup>水<sup>和</sup>してL-カルニチンを製造する方法。

(特開昭59-183694、特開昭59-192095、特開昭60-137295)

(5) DL-アシルカルニチンを電気ウナギ由来のコリンエステラーゼあるいは、馬血清由来のプロチルコリンエステラーゼの作用で立体特異的に加水分解して、L-カルニチンを得る方法。

[エリックP.ドロブシーら、バイオテクノロジー-アンドバイオエンジニアリング(Eric P.

あるいはNADを必要とする。

(3)は、カタラーゼ、2-オキシグルタール酸、アスコルビン酸等の副原料を必要とし、その上原料のアープロベタインが高価なため、L-カルニチンを経済的に製造するには好適な方法とはいえない。

(4)は、反応混合物中に残存する未反応のクロトノベタインと目的物であるL-カルニチンの分離が困難である。

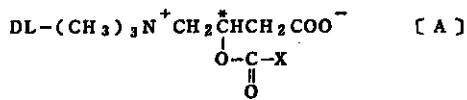
(5)は、加水分解反応に用いる酵素が手に入り難く、又高価につくため、好適な方法とはいえない。

(6)は、工程が長く複雑であるため、収率が悪い。

以上述べたように、上記の方法はいずれも工程的に又コスト的にみて、L-カルニチンの工業的製造法としては有利な方法とはいえない。

(問題を解決するための手段)

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一般式、



(式中Xはアルキル基、アルケニル基、又は芳香族炭化水素を示し、\*印は不斉炭素原子を示す。)で表されるDL-カルニチン誘導体及び/又はその塩を原料として用いることに着目し、それからL-カルニチンを得る方法について鋭意検討を行なった。

その結果、式[A]で表されるDL-カルニチン誘導体及び/又はその塩に、特定の微生物あるいは該微生物より得られた酵素を作用させると、L体のエステルのみが、立体特異的に加水分解してL-カルニチンを与え、D体は何らの作用も受けずにそのまま反応液中にエステル形で残存するという興味ある事実を発見し本発明に至った。

L-カルニチンの定量は、カルニチン(D-及び/又はL-カルニチン)中のL-カルニチンの

みを選択的に酵素で定量するD. J. ビアソンらの酵素法、(メソッドインエンチモロジー (D. J. Perrson et al., Methods in Enzymol.) 第14巻、612頁、1969年)で行なった。

又、未反応の原料即ち式[A]で表される化合物とカルニチン(D-及び/又はL-カルニチン)の合計量は、J. S. ヘイズらの高速液体クロマトグラフィー法(HPLC法) (アナリティカキミカアクト (J. S. Hayes et al., Analytica Chimica Acta.) 第80巻、361頁、1975年)の変法で定量した。

上記2法を組み合わせることにより、反応生成物の全量をも、又その中のL-カルニチンのみをも定量することが可能である。

前記のL体のエステルのみに作用して立体特異的に加水分解する能力のある微生物としては、例えば、

エシエリヒア コリ (IFO3301)

エンテロバクター クロアカエ (IFO3320)

プロテウス ミラビリス (ATCC12453)  
 サルモネラ チフィムリウム (IFO12529)  
 セラチア マルセセンス (IFO3736)  
 シトロバクター インターメディアス (IFO13539)  
 クレブシエラ ニューモニアエ (IFO3512)  
 フラボバクテリウム エステロアロマティカム (IFO3751)  
 ミクロコッカス フラブス (IFO3242)  
 コリネバクテリウム ファジアンス (IAM1079)  
 パシラス スファエリカス (IFO3528)  
 シユードモナス コンベクサ (IFO3757)  
 プレバクテリウム リネンス (IFO12141)  
 ハフニア アルベイ (IFO3731)  
 バクテリウム グラシル (IFO3231)  
 ムコール ジャパニカス (IFO4570)  
 リゾプス オリザエ (IFO4744)  
 アスベルギルス ニガー (IFO6661)  
 ノエロスボラ クラッサ (IFO6068)  
 フザリウム ソラニ (IFO5232)

などがある。

微生物の培地は使用する菌株により、多少異なるが、一般的には炭素源、窒素源、無機イオンなどを含有する通常の培地を用いることができる。炭素源としてはグルコース、サッカロースなどの炭水化物、フマル酸、酢酸などの有機酸、メタノール、エタノールなどアルコール類、その他、窒素源としては硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどのアンモニウム塩、ペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、その他、無機塩類としては硫酸マグネシウム、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸第一鉄、塩化マンガ、塩化ニッケル、硫酸コバルトなどが使用できる。

又、培地に予めDL-カルニチンあるいは式[A]で表される化合物を添加して菌の培養を行なうと、得られる菌体の立体特異的な加水分解能即ち、L-カルニチンを産生する能力を高めることができる。

この培地に菌を接種し、好氣的あるいは嫌氣的

条件で培養する。培養に適した温度は通常15～60℃であるが好ましくは25～40℃であり、培地の初発pHは通常3～9、好ましくは5～8の範囲である。

培養は通常1～10日間行なり。

上述の条件で得られた培養液にそのまま原料の式〔A〕で表される化合物を添加するか、あるいは培養液から遠心分離などの通常の方法により取出した菌体を式〔A〕で表される化合物を含む水溶液に添加することによって加水分解を行なり。この時、式〔A〕の化合物を分割して添加すると良好な結果が得られる。~~ことがあり。~~

加水分解は反応温度、通常10～60℃、好ましくは25～40℃、pH、通常2～10、好ましくは5～7で行なり。反応は、静置又は攪拌下に8時間～4日間行なり。

立体特異的に加水分解を受けた式〔A〕で表される化合物中のL-体から生成したL-カルニチンは反応系内に蓄積される。

処理方法により得られた菌体処理物、例えば無細胞抽出液、アセトンパウダーヤドライセルあるいは界面活性剤処理した菌体を用いたり、固定化菌体あるいは固定化酵素も有効である。

固定化に用いる担体としては、カラギーナン、アルギン酸、寒天、コラーゲン、ゼラチン、ペクチン、などの天然化合物あるいは、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、エチレンアクリル酸共重合体、光架橋性樹脂などの合成高分子をも利用できる。

又、予め培地中に式〔A〕の化合物を含ませおき、前記の微生物を培養しながら加水分解反応を行なりことも可能である。即ち、微生物の培養に必要な前記の炭素源、窒素源、無機イオンなどの栄養素を含有する培地に式〔A〕で表される化合物を加え、前記の培養条件で好氣的あるいは嫌氣的に培養を行なえば、菌の増殖と同時に加水分解反応が起こり目的物であるL-カルニチンが培地中に蓄積される。

上述の加水分解反応によって得られたL-カルニチンを反応液から分離するには

(1) イオン交換樹脂を用いて直接L-カルニチンを分取する方法。(エリック・P・ドロブシーら、バイオテクノロジー アンド バイオエンジニアリング (Eric P. Dropsy et al., Biotech. & Bioengineering.) 第26巻, 911-915頁, 1984年)

(2) あるいは予め未反応の式〔A〕の化合物をn-プロパノール、イソプロパノールなどの溶媒で抽出、除去

【バイオケミカ バイオフィジカ アクタ

(Biochim. Biophys. Acta.) 280 422-433, 1972年]

以後で上述のイオン交換樹脂法によりL-カルニチンを分取する方法。

などによって単離する。

前記の反応の酵素源としては、微生物の菌体そのものを用いているが、この他に菌体より公知の

生成したL-カルニチンを培養液から分離するには、前述の方法と同様にして行なり。

以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明する。なお生成したL-カルニチンの定量は前述のとおり、D.J. ピアソンらの酵素法により行なった。

#### 実施例1.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%, ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5% から成る液体培地 (pH7) に予めDL-カルニチン塩酸塩を0.3%加え、全体を5mlにして第1表に示す菌を1白金耳量接種した。

30℃で2日間振とう培養(100 r.p.m.)した後、得られた培養液を遠心分離し菌体を得た。得られた菌体を5mlの生理食塩水で洗浄後、DL-カルニチンと酢酸クロリドから常法により合成したDL-アセチルカルニチン塩酸塩 1% (42mM) を含む0.1Mリン酸緩衝液 (pH7) 1mlに添加し、30℃で18時間振とう(100

r. p. m.) することにより加水分解反応を行なった。得られた反応液は80℃で5分間加熱処理を行ない、遠心分離により菌体を取り除いて、D. J. ピアソンらの酵素法で生成したL-カルニチンの定量を行なった。L-カルニチン生成量を第1表に示した。

第 1 表

菌 名	L-カルニチン生成量 (mM)
エシエリヒア コリ (IFO3301)	5.5
エンテロバクター クロアカエ (IFO3320)	4.3
プロテウス ミラビリス (ATCC12453)	13.8
サルモネラ チフィムリウム (IFO12529)	3.4
セラチア マルセセンス (IFO3736)	9.2
シトロバクター インターメデウス (IFO13539)	19.9
クレブシエラ ニューモニアエ (IFO3512)	11.3
フラボバクテリウム エステロプロマティカム (IFO3751)	8.7
シクロコッカス フラブス (IFO3242)	5.2
コリネバクテリウム ファシアンス (IAM1079)	4.8
バシラス スファエリカス (IFO3528)	9.6
シエードモナス コンベクサ (IFO3757)	12.5
プレバクテリウム リネンス (IFO12141)	3.1
ハフニア アルベイ (IFO3731)	6.9
バクテリウム グラシル (IFO3231)	7.2
ムコール ジャパニカス (IFO4570)	2.4
リゾプス オリザエ (IFO4744)	9.6
アスペルギルス ニガー (IFO6661)	6.1
ノエロスポラ グラッサ (IFO6068)	1.7
アザリウム ソラニ (IFO5232)	9.3

実施例 2

第1表の中からシトロバクター インターメデウス (IFO13539) を選び、培養条件は実施例1と同様にして100倍のスケールで培養を行ない、遠心分離して3.6gの湿菌体を得た。得られた菌体をメチル、8-ヘプタデセニル、フェニル<sup>の各基</sup>で各々置換した式[A]で表される化合物20mMを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7)中にそれぞれ10<sup>7</sup>湿菌体/mlとなるように添加し、30℃で18時間振とうして反応を行なった。各々の場合のL-カルニチン生成量を第2表に示した。

第 2 表

置換基 (X)	式 [A] で表される化合物 $\left[ \text{DL}-(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\overset{\text{O}-\text{C}-\text{X}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{HCH}_2\text{COO}^- \right] \text{HCl}$	L-カルニチン生成量 (mM)
メチル		9.4
8-ヘプタデセニル		4.1
フェニル		2.8

## 実施例 3.

シトロバクター インターメディアス (IFO13539) を  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%, ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5%, 原料の DL-アセチルカルニチン塩酸塩 1% (42 mM) からなる液体培地 (pH7) 20 ml に接種し、30℃で2日間、嫌氣的に培養し、菌の増殖と同時に DL-アセチルカルニチン塩酸塩の加水分解反応を行なった。得られた培養液を80℃で5分間加熱処理を行なった後、遠心分離により菌体を取り除き、前述の D. J. ピアソンらの酵素法及び J. S. ヘイズらの HPLC 法により分析した。

酵素法では、17 mM の L-カルニチンが定量され、一方 HPLC 法では、17 mM のカルニチン、21 mM のアセチルカルニチン、及び 2 mM のクロトノベタインが定量された。

## 実施例 4.

エシエリヒア コリ (IFO3301) を、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.7%,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1%,

脂を用いて脱塩後、減圧濃縮し、エタノール-アセトンで L-カルニチンを沈殿させた。

得られた L-カルニチンの収量は、2.9% であり、又このものの比旋光度は  $[\alpha]_D^{25} = -29.5^\circ \pm 0.2^\circ$  (C = 0.967 水) であった。

## (発明の効果)

L-カルニチンを合成するには、原料として、安価なエピクロルヒドリンから得られる DL-カルニチンを用いるのが最も経済的に有利である。しかし従来から行なわれているラセミ体のカルニチンを D 体と L 体に分割して目的物の L 体を得るためには、光学分割剤を加えて塩を生成させ、その塩を溶解度の差を利用して分割し、さらにそれを加水分解して、L-カルニチンを得なければならない。この方法では原料には安価な DL-カルニチンを用いるが、分割に高価な光学分割剤を使用しなければならず、又煩雑な操作を必要とする。又前述したようにエリック・P. ドロブシーらが DL-アシルカルニチンを電気ウナギから得たコ

ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5%, DL-アセチルカルニチン 0.1% からなる液体培地 (pH7) 20 ml に接種し、30℃で1日間好氣的に前培養を行なった。本培養は、こりして得られた前培養液全量を、前培養液と同様の組成の培地 2 ml に接種し、30℃で2日間嫌氣的に行なった。こりして得られた本培養液から遠心分離により、1.9% の湿菌体を得ることができた。1.9% の湿菌体を DL-アセチルカルニチン塩酸塩 3% (126 mM) を含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH7) 500 ml 中に添加し、30℃、96時間、静置することにより反応を行なった。

得られた反応液中には、56 mM の L-カルニチンが含まれていた。

反応液から遠心分離により菌体を取り除いた後、減圧濃縮して 100 ml とし、前述のイオン交換樹脂を用いる方法によって、未反応のアセチルカルニチン画分と L-カルニチン画分に分離した。

得られた L-カルニチン画分を陽イオン交換樹

リンエステラーゼあるいは馬血清中のブチリルエステラーゼを用いて立体特異的に加水分解して L-カルニチンを得る方法を明らかにしている。しかしながら電気ウナギのコリンエステラーゼあるいは馬血清のブチリルコリンエステラーゼを大量にかつ安定的に入手することは非常に困難で又高価である。

本発明の方法においては、公知の微生物を用いて原料の DL-カルニチン誘導体を立体特異的に加水分解して、一段で目的物の L-カルニチンを産生することができ、又微生物の培養も通常の方法によって好氣的あるいは嫌氣的条件下で容易に行なうことができる。

立体特異的な加水分解は、菌体あるいはその処理物を原料の DL-カルニチン誘導体に添加して行なわせても、又菌の培養時に原料を培地に添加して菌の増殖と同時に行なわせてもよい。又反応混合物からの L-カルニチンの分離もイオン交換樹脂法による常法で行なうことができる。

以上述べたように本発明は、従来行なわれていたように高価な光学分割剤や入手し難い酵素を用いたり、あるいは煩雑な操作を行なう必要がなく、簡単な操作で容易に安価なL-カルニチンを工業的規模で実施できる新規な方法を提供するものである。

出願人 製鉄化学工業株式会社

代表者 増田裕治