

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭61-271995

⑬ Int. Cl.⁴
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)12月2日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑮ 発明の名称 L-カルニチンの製造法

⑯ 特 願 昭60-112827

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
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
⑲ 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-カルニチンの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) クロトノベ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ベタインよりL-カルニチンを生成させることを特徴とするL-カルニチンの製造法。

(2) 微生物菌体が、エシエリヒア(Escherichia)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、クレブシエラ(Klebsiella)属、エアロバクター(Aerobacter)属、エルビニア(Erwinia)属、セラチア(Serratia)属、プロテウス(Proteus)属、サルモネラ(Salmonella)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、アхроモバクター(Achromobacter)属、バシラス(Bacillus)属、

アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、アゾトバクター(Azotobacter)属、ミクロコッカス(Micrococcus)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、スタフィロコッカス(Staphylococcus)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、アルスロバクター(Arthrobacter)属、プレビバクテリウム(Brevibacterium)属、セルロモナス(Cellulomonas)属、ハフニア(Hafnia)属、アセトバクター(Acetobacter)属、クロモバクテリウム(Chromobacterium)属、キサントモナス(Xanthomonas)属、ビブリオ(Vibrio)属、エアロモナス(Aeromonas)属、プロタミノバクター(Protaminobacter)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、シトロバクター(Citrobacter)属、バクテリウム(Bacterium)属、クロストリジウム(Clostridium)属、リゾビウム(Rhizobium)属、グルコノバクター(Gluconobacter)属、ストレプトコッカス(Streptococcus)属、ペディオコッカス(Pedio-

coccus) 属, ロイコノストック (Leuconostoc) 属, ラクトバシラス (Lactobacillus) 属, プロピオニバクテリウム (Propionibacterium) 属, エアロコッカス (Aerococcus) 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、クロトノベ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ベタインよりL-カルニチンを生成させる方法、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ベタインを含む溶液に加えることにより、クロトノベタインよりL-カルニチンを生成させる方法に関する。

(産業上の利用分野)

本発明は、クロトノベ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、安価に入手できるクロトノベタインより有利に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法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。

突然、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)

(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) 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)

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、原料となるアープ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)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、クロトノベ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、好気条件下での培養にくらべ菌の生育が悪い場合が多い。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、クロトノベタインを含まない通常の培地で好氣的に培養した菌体を取り出して栄養を制限したクロトノベタインを含む溶液に加えると、クロトノベタインよりL-カルニチンが生成することを見出し、本発明に至った。

本発明の方法においては、培養液からのベタイン化合物の回収を考慮する必要は全くない。しかも反応系において特筆すべきことに、アープチロベ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。

また本発明の方法は、好気性のみならず嫌気条件下で生育するいずれの菌株にも適用でき、嫌気条件下でしか生育しない乳酸菌や絶対

本発明の方法によれば、好氣的培養によって高濃度に培養された菌体を、栄養制限下クロトノベタインと共存させるとL-カルニチンが得られ、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りことも可能となる。

(作用)

従来の方法では培養時にクロトノベタインあるいは、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ベ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ベタインのためにクロトノベタイン、カルニチンを純粋な形で回収することは、かなりの困難を伴った。しかし

嫌気性菌を対象にすることができる。

すなわち、クロトノベタインを含まない培地を用い、嫌気条件下で該当する菌株を生育させて得られる菌体を用いて同様に反応を行なると、L-カルニチンが得られる。

このような嫌気性菌や通性嫌気性菌にも本発明の方法の適用が可能であり、上述のような種々の利点がある。この結果これまで用いられなかった多種の菌体がいられることになった。

次に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、 KH_2PO_4 0.3%, K_2HPO_4 0.7%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5% からなる液体培地 5 ml に、針面培地からシトロバクター インターメヂウス (*Citrobacter intermedius*) IFO 13544 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、5 ml 生理食塩水で洗浄後、反応に供した。この菌

体を無栄養状態で、クロトノベタイン 1.5% (105 mM)を含む 0.01 Mリン酸緩衝液(pH6) 50 ml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、5.5 mMのL-カルニチンを含んでいた。

本発明において用いるクロトノベタインを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、例えばエシエリヒア コリ IFO3301, エンテロバクター クロアカエ IFO3320, クレブシエラ ニューモニアエ IFO3512, エアロバクター クロアカエ IAM1134, エルビニア アロイデアエ IFO12380, セラチア マルセンサス IFO3736, プロテウス ブルガリス IFO3851, サルモネラ チフィムリウム IFO12529,

パス IFO3707, アシネトバクター カルコアセチカス IFO13006, シトロバクター インターメデウス IFO13544, バクテリアム グラシル IFO3231, クロストリジウム プチリカム IFO3858, リゾビウム ジヤポニカム IFO13338, グルコノバクター セリナス IFO3264, ストレプトコッカス ファエカリス IFO3128, ベディオコッカス ベントサシウス IFO3893, ロイコノストック メセンテロイデス IFO3426, ラクトバシラス アシドフィラス IFO3205, プロビオニバクテリアム テクニカム IFO12428, エアロコッカス ビリダンス IFO12317, 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、シュークロース、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

アルカリゲネス ファエカリス ATCC8750, フラボバクテリアム エステロアロマティカム IFO3751, アクロモバクター バルプラス IFO13181, バシラス スファエリカム IFO3526, アグロバクテリアム ラジオバクター IFO12664, アゾトバクター ビネランディ IFO12018, ミクロコッカス ロゼウス IFO3768, コリネバクテリアム ラサユ IFO12161, スタフィロコッカス オーレウス IFO3060, シュードモナス マルギナリス IFO3925, アルスロバクター シンプレックス IFO12069, プレピバクテリアム リネンス IFO12141, セルロモナス フラビダ IFO3748, ハフニア アルベイ IFO3731, アセトバクター オルレアネンス IFO3259, クロモバクテリアム イオディナム IFO3558, キサントモナス キャンベストリス IFO13303, ビブリオ パラハエモリチカス IFO12711, エアロモナス ハイドロフィラ IFO12978, プロタミノバクター アルボフラ

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、好氣的あるいは嫌氣的に培養する。培養に適した温度は、通常は15~60℃であるが、さらに好ましくは25~40℃である。培地の初発pHは、通常は3~9, 好ましくは5~8の範囲である。通常8時間~10日間の培養で菌を生育させる。

このようにして得られた培養液から通常の方法により取り出した菌体は、クロトノベ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pH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

特開昭61-271995(5)

しくは25~40℃である。最初に添加するクロトノベタイン量は、通常0.1~10%であるが、好ましくは1~6%である。クロトノベ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、反応時に例えば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。反応は嫌気条件下など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 0.5%, 酵母エキス 0.5%からなる液体培地を用い、種菌として第1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1表の結果を得た。

第 1 表

菌 名	生成L-カルニチン(mM)
エシエリヒア コリ IFO3301	50
エンテロバクター クロアカエ IFO3320	43
クレブシエラ ニューモニアエ IFO3512	36
エアロバクター クロアカエ IAM1134	39
エルビニア アロイデアエ IFO12380	44
セラチア マルセンサス IFO3736	52
プロテウス ブルガリス IFO3851	54
サルモネラ チフィリウス IFO12529	45

KH₂PO₄ 0.3%, K₂HPO₄ 0.7%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, クエン酸ナトリウム 0.2% からなる pH7 の合成培地 5 ml に斜面培地から、エシエリヒア コリ IFO3301 の1白金耳量を接種し、30℃で2日間好氣的に培養した。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5 ml の生理食塩水で洗浄後、クロトノベタイン 1.5% (105 mM) を含む 0.01 M のリン酸緩衝液 (pH 6) 50 ml 中に添加し、窒素置換した後、密栓下 30℃で2日間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、酵素法で分析すると、49 mM の L-カルニチンが生成していた。

実施例2

培養に KH₂PO₄ 0.3%, K₂HPO₄ 0.7%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%,

菌 名	生成L-カルニチン(mM)
アルカリゲネス ファエカリス ATCC8750	21
フラボバクテリウム エスチロアロマチカム IFO3751	53
アクロモバクター バルプラス IFO13181	44
バシラス スファエリカム IFO3526	31
アグロバクテリウム ラジオブクター IFO12664	32
アゾトバクター ビネランヂイ IFO12018	10
マイクロコッカス ロゼウス IFO3768	14
コリネバクテリウム ラサユ IFO12161	17
スタフィロコッカス オーレウス IFO3060	13
シュードモナス マルギナリス IFO3925	25
アルスロバクター シンプレックス IFO12069	25

菌名	生成L-カルニチン(mM)
プレバクテリウム リネンス IFO12141	12
セルロモナス フラビダ IFO3748	38
ハフニア アルペイ IFO3731	47
アセトバクター オルレアネンス IFO3259	23
クロモバクテリウム イオディナム IFO3558	16
キサントモナス キャンベストリス IFO13303	13
ビブリオ バラハエモリアカス IFO12711	21
エアロモナス ハイドロフィラ IFO12978	38
プロトアミノバクター アルゴフラバス IFO3707	27
アシネトバクター カルコアセチカス IFO13006	26

第 2 表

菌名	生成L-カルニチン(mM)
クロストリジウム プテリカム IFO3858	16
ストレプトコッカス ファエカリス IFO3128	10
ベディオコッカス ペントサシウス IFO3893	13
ロイコノストック メセンテロイデス IFO3426	37
ラクトバシラス アシドフィラス IFO3205	23
プロピオニバクテリウム テクニカム IFO12428	35
エアロコッカス ビリダンス IFO12317	12
セラチア マルセンサス IFO3736	52

菌名	生成L-カルニチン(mM)
シトロバクター インターメデウス IFO13539	55
バクテリウム グラシル IFO3231	40
リゾビウム ジャポニカム IFO13338	27
グルコノバクター セリナス IFO3264	15

実施例 3

培養にグルコース 1%, CH_3COONa 1%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, CaCO_3 1% 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て、嫌気条件下で培養した以外は実施例 1 と同様に行ない、第 2 表の結果を得た。

実施例 4

培養スケール、反応スケールを共に 10 倍とし、シトロバクター、インターメデウス IFO13544 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 80 cm、内径 5 cm 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、4.0g (24.8 mmol) 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ベタインより光学活性 L-カルニチンを生成することができ、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-ブチロベ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 1:185)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:01)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:22)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:18)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:425)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:37)		6760-4B
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:42)		6760-4B
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:05)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:20)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:025)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:07)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:065)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:265)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:15)		6760-4B
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:44)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:38)		

④Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:06)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:13)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:02)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:64)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:63)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:145)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:46)		
(C 12 P 13/00		
C 12 R 1:225)		