

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭61-293392

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24日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑮ 発明の名称 クロトノベタインの製造方法

⑯ 特 願 昭60-135039

⑰ 出 願 昭60(1985)6月19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
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

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

クロトノベタインの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) D-カルニチンまたはL-カルニチンあるいはγ-ブチロベタインをクロトノベタインに変換せしめる能力を有する微生物の作用によりD-カルニチン、L-カルニチン、γ-ブチロベタインよりなる群より選ばれた少なくとも1種の化合物をクロトノベタインに変換せしめることを特徴とするクロトノベタインの製造方法。

(2) 微生物がエシエリヒア (Escherichia) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、エアロバクター (Aerobacter) 属、エルビニア (Ewinia) 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、フラボバクテリアム (Flavobacterium) 属、アхроモバクテリアム (Achromobacter) 属、バシラス (Bacillus) 属、アグロバ

クテリウム (Agrobacterium) 属、アゾトバクテリウム (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、アルソロバクター (Arthrobacter) 属、ブレヴィバクテリウム (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 (Pediococcus) 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, 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 (Mucor) 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, オオスポラ (Oospora) 属, プルラリア (Pullularia) 属, フサリウム (Fusarium) 属, シベレラ (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, トリコフイトン (Trichophyton) 属, フィトフトラ (Phytophthora) 属, シリンドロカルボン (Cylind-

ula) 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, ترامーテス (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の微生物である特許請求の範囲(1)記載の方法。ただし基質としてL-カルニチンを用いるときはエシェリヒア属, プロテウス属, サルモネラ属は除く。

8. 発明の詳細な説明

(発明の目的)

本発明は、D-カルニチンまたはL-カルニチン^αはア-ブチロベタインよりなる群より選ばれた少なくとも一種の化合物に微生物を作用させることにより、クロトノベタインを酵素反動的に製造する方法に関する。

(産業上の利用分野)

目的とする化合物、クロトノベタインはL-カルニチンの前駆体である。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

rocarpon) 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, ハンセスラ (Hansenula) 属, シバニオマイセス (Schwanniomycetes) 属, デバリオマイセス (Debaryomyces) 属, サッカロマイコデス (Saccharomycodes) 属, ハンセニアスポラ (Hanseniaspora) 属, ナドソニア (Nadsonia) 属, ネマトスポラ (Nematospora) 属, リポマイセス (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, ピティロスポラム (Pityrosporum) 属, プレタノマイセス (Brettanomyces) 属, キャンデイダ (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, クルイベロマイセス (Klayveromyces) 属, プレラ (Baillera) 属, ロドトルラ (Rhodoto-

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、心不全の治療に用いられている。

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ニトリル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48-8248)、が一般的なものである。

(2) 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。D-およびL-ショウノウ酸を分割剤として用いる方法、ホッペ-セイラーズツアイトシユリフト・フィシオロゲム(Hoppe-Seylers Z. Physiol. chem.) Bd. 853, 8. 618-622 (1972)この方法は一般的には用いられない。

(3) 嫌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(特願昭59-187378)。

しかしながら、(1)と(2)は光学分割剤が高価であることや操作が複雑であることを別としても、副産物であるD-カルニチンの再利用が必要となる。現在のところD-カルニチンを脱水してクロトノベタインとし上記(3)の方法でL-カルニチンとす

でL-カルニチンを晶析後のL-カルニチンを含むD-カルニチンをそのまま原料として用い、クロトノベタインを得ることができる。さらに化学合成により得られたDL-カルニチン水溶液も原料とすることが出来、安価なL-カルニチンの製法を提供することが可能である。また微生物反応であるために反応条件が穏やかであり着色等の心配もない。

微生物を用いてクロトノベタインよりL-カルニチンを得るに際し、条件によってはアーブチロベタインを副生する。本発明によればイオン交換樹脂により副生アーブチロベタインを単離後原料であるクロトノベタインに変換することが可能である。

クロトノベタインに水素を添加するとアーブチロベタインが得られる。アーブチロベタインは消化器の機能低下の見られる胃アトニー、慢性胃炎、低胃酸症、慢性便、その他副交感神経の緊張の低下した諸疾患の治療薬である塩化カプロニウム^{4*}の原料としても有用である。

る方法が一番有効であると考えられる。脱水にはDL-カルニチンに無水酢酸を作用させる方法、*Biochimica et Biophysica Acta*, 187, 98 (1967)が応用できる。しかしながら、この方法はカルニチンに対して大過剰の無水酢酸を用いる必要があり、反応温度も高くタール状物質が生成し、製品の品質低下および着色の原因となる。さらに反応液からクロトノベタインを得るためには未反応の無水酢酸および生じた酢酸を取り除く必要がある。この目的のためにプロパノール等の有機溶媒が大量に必要となる。さらに本反応は非水系の反応であるため、原料として用いるカルニチンは晶析したカルニチンニトリルまたはカルニチンをイオン交換樹脂を用いて分割剤と分離後、カルニチンニトリルは加水分解操作を加えてカルニチン水溶液となし、さらに濃縮乾固により水分を除く必要がある。カルニチンは吸湿性物質であるため乾燥が困難である。

本発明においては、たとえばL-ショウノウ酸

以上の状況に鑑み、本発明者等はエピクロロヒドリンより安価に製造できるDL-カルニチンに着目し、クロトノベタインの新規製造方法の開発を目的として鋭意検討を行なった結果、多岐の菌種の菌体においてD-カルニチン、DL-カルニチン、アーブチロベタインよりクロトノベタインが生じることを見出し本発明に至った。本発明の反応はこれまで報告されていない新規な反応である。

(従来の技術)

クロトノベタインの製法としては、例えば下記の方法が知られている。

(1) DL-カルニチンに無水酢酸を作用させる方法

(2) L-カルニチンにエシエリヒア・コリ、プロテウス・ブルガリス、サルモネラ・チフィウムを作用させる方法。

アルフ. ミクロビオール (*Arch Microbiol*) 132, 91-95 (1982), フェムス. ミクロビオロジイレターズ (*FEMS Microbiology Letters*) 13, 201-

205 (1982), ツァイトシュリフト, ヒュア, アルゲアイネ ミクロビオール (Z. f. Allg. Mikrobiol) 19, 752-758 (1979)

しかしながら, (1)はD L-カルニチンに対して大過剰の無水酢酸を用いる必要がある, 反応温度も高く, タール状物質が生成してくる。さらに反応液からクロトノベタインを得るためには未反応の無水酢酸および生じた酢酸を取り除く必要がある。この目的のためにエタノール等の有機溶媒が大量に必要となる。

(2)はエシエリヒア属, プロテウス属, サルモネラ属の8つの属が知られているのみであり, 基質としてはL-カルニチンのみであった。

そこで本発明者等は, エピクロルヒドリンより安価に製造できるD L-カルニチンに着目し, クロトノベタインの新規製造方法の開発を目的として鋭意検討を行った結果, 多数の菌種の菌体においてD-カルニチン, L-カルニチンよりクロトノベタインが生成することを見出した。さらにγ-ブチロベタインが酸化されてクロトノベタイ

ンが酸化されてクロトノベタインが生成することを見出し本発明に至った。D-カルニチン, γ-ブチロベタインよりクロトノベタインの生成は新規反応である

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20 mlに, 斜面培地からセラチア マルセンサス (IFO3736)の菌種を1白金耳懸接種し, 30°Cで2日間, 嫌氣的に培養した。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。得られた菌体は5 ml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L-カルニチン1% (62 mM)を含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6) 5 ml中に添加した後, 30°Cで2日間振盪することにより行なった。得られた反応液は遠心分離により菌体を取り除いた後, 30°Cで5分間加熱処理を行ない処理液の一部を高速液体クロマトグラフィー (LC)で分析すると80 mMのクロ

トノベタインが生成していた。

本発明において用いる微生物としては, 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 チフィウム IFO12529, アルカリゲネス ファエカリス ATCC8750, フラボバクテリウム エステロアロマティカム IFO3751, アクロモバクター バルブラス IFO13181, バシラス スファエリカム IFO3526, アグロバクテリウム 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, コリネバクテリウム 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, プレバクテリウ

ム リネンス IFO12141, セルロモナス フラビゲナ IFO3748, ハフニア アルペイ IFO3781, アセトバクター オルレアネンス IFO3259, クロモバクテリウム 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 パラハエモリティカス IFO12711, エアロモナス ハイドロフィラ IFO12978, プロタミノバクター アルボフラバス IFO3707, アシネトバクター カルコアセティカス IFO13006, シトロバクター ~~フロインディ~~ ³⁹ IFO13544, バクテリウム グラシル IFO3281, クロストリジウム プチリカム IFO3858, リゾビウム ジャボニカム 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, ペディオコッカス ペントサシウス 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, プロピオニバクテリウム テクニカム IFO12428, エアロコッカス ビリダンス

IFO12317, マイコバクテリウム アビウム
 IFO3082, 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 IFO4581,
 リゾプス オリザエ IFO4705, アブシディ
 ア コエルレア IFO4011, フィコマイセス
 ニテンス IFO5695, エレモテシウム アシビ
 イ IFO0557, アスペルギルス ニガー IFO
 4416, ペニシリウム オキサリカム IFO5748,
 モナスカス アンカ IFO5965, ノイロスボ
 ラ クラッサ IFO6660, オオスポラ ビスコ
 サ IFO4604, プルラリア ベルネッキ IFO
 6407, フサリウム ソラニ IFO5232, シベ
 レラ フジクロイ IFO6604, ウスティラゴ
 ゼアエ IFO6907, ケラチノマイセス アジエ
 ロイ IFO7865, スポロトリクス シエンキイ
 IFO5988, トリコデルマ ビリデ IFO4847,
 フェルティシリウム アルポーアトラム IFO
 5922, イサリア コガネ IFO5299, グリオ
 クラジウム デリクエセンズ IFO6617, トリ

イセス アノマラス IFO0642, キャンディダ
 ルゴーサ IFO0591, クロエッケラ ジャバ
 ニカ IFO1094, トリゴノプシス バリアビリ
 ス IFO0671, ウイカーハミア フルオレセン
 ス IFO1116, クルイペロマイセス ポリスボ
 ラス IFO0996, プレラ アルバ IFO1192,
 ロドトルラ ミスタ IFO0887, トリコスボ
 ロン キャピテイタム IFO0748, グレオフィ
 ラム トラベウム IFO6429, シゾフィラム
 コムネ IFO4928, トラメーテス サンギネア
 IFO6490 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
 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

コフィットン メンタグロフィテス IFO5466, フ
 イトフトラ インフェスタンス IFO4872, シ
 リンドロカルボン デストラクタンス IFO6796,
 サッカロマイセス セレビシアエ IFO0259,
 エレマスカス フェルティリス IFO0691, エ
 ンドマイセス レシ IFO1112, エンドマイコ
 プシス カプスラリス IFO0672, シゾサッカ
 ロマイセス ポンベ IFO0846, ピチア ポリ
 モルファ IFO0195, ハンセヌラ アノマラ
 IFO0149, シバニオマイセス オクシデンタリ
 ス IFO0371, デバリオマイセス ハンセニ
 IFO0023, サッカロマイコデス ルドビギイ
 IFO1048, ハンセニアスポラ パルビエンシ
 ス IFO0116, ナドソニア エロンゲータ
 IFO0665, ネマトスポラ コリーリ IFO0658,
 リポマイセス リポファー IFO0678, スポ
 ロボロマイセス ホルサティカス IFO1034,
 クリプトコッカス アルビダス IFO0378, ト
 ルロプシス キャンディダ IFO0768, ピチ
 ロスポラム オバーレ IFO0656, プレタノマ

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、肉エキス、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。

この培地に兩株を接種し、好氣的または嫌氣的
 に培養する。培養に適した温度は、通常は15～
 60℃であるが、更に好ましくは25～40℃で
 ある。培地の初発pHは、通常は8～9、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、D-カルニチン、L-
 カルニチン、γ-アミノ酪氨酸よりなる群より
 選ばれた少なくとも一種の化合物を含む溶液と接
 触せしめることによって、クロトノベタインを生
 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、好ましくは
 25～40℃である。最初に添加する基質濃度は
 通常0.1～10%であるが、好ましくは1～5%

である。基質を分割添加するとよい結果を与えることもある。また、反応時にグルコース、シュークロース、マルトース、グリセロール、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が多い。

反応の酵素源としては、菌体のほかに菌体より公知の処理方法により得られた酵素活性成分も利用できる。例えば、公知の方法で得た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また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が利用できる。また acetone powder や dry cell に処理した菌体を用いたり、界面活性剤を添加する方法がよい結果を

与える場合もある。変異処理をほどこした菌体であっても、カルニチンヒドロリアーゼ活性を有する限り本発明に含まれる。

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

KH₂PO₄ 0.3%, K₂HPO₄ 0.7%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, ペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.5%, からなる液体培地 20 ml に、斜面培地から第 1 表に示す菌株の 1 白金耳量を接種し、30℃で2日間嫌氣的に培養した。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、D-カルニチン 1% (62mM)、L-カルニチン 1% (62mM)、またはγ-アミノロバチン 1% (69mM) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8) 5 ml 中に添加した後、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、30℃で5分間加熱処理を行ない LC で分析した。

クロトノベタインの生成量を第 1 表に示した。

第 1 表

菌名	基質による生成量		
	D-カルニチン	L-カルニチン	γ-アミノロバチン
モネリシア コリ IFO8801	26 ^{mM}	22 ^{mM}	51 ^{mM}
エンテロバクター クロアエ IFO8820	26	26	61
クレブシエラ ニューモニアエ IFO8812	21	28	42
エアロバクター クロアエ IAM1184	16	19	12
エルビニア アロイデアエ IFO12880	18	29	27
セラチア マルセンシス IFO8786	81	80	68
プロテウス プルガリス IFO8851	26	28	61
サルモネラ チフィリウム IFO12529	29	80	44
アルカリゲネス フェニカリス ATCC8750	17	12	29
フラジリチウム エステロアロマチカム IFO8751	28	17	47
アクロモバクター バルブラス IFO18181	14	15	49
バシラス スファエリカム IFO8526	18	19	87
アグロバクター ラジオバクター IFO12664	22	21	59
アゾバクター ビネランディ IFO12018	11	16	28
ミクロコッカス ロセウス IFO8768	24	88	82

コリネバクテリウム ラウニ IFO12161	19	82	45
スタフィロコッカス オーレウス IFO3080	29	26	20
シェードモナス マルギナリス IFO8826	24	28	18
アルスロバクター シンプレックス IFO12069	27	85	48
プレジバクテリウム リネンシ IFO12141	21	17	88
セルロモナス フラビグナ IFO8748	10	18	44
ハフニア アルベイ IFO8781	28	28	51
アセトバクター オルレアネンシ IFO8259	26	26	58
クロモバクテリウム イオディナム IFO8558	11	11	85
キサントモナス キャンベストリス IFO18808	16	25	88
ビブリオ パラハエモリチカス IFO12711	18	18	80
エアロモナス ハイドロフィラ IFO12978	11	16	45
プロタミノバクター アルボフラバシ IFO8707	14	26	51
アセトバクター カルデアセチカス IFO18006	19	20	48
シトロバクター フロイレンティイ インターメディアリス IFO18589	29	82	60
バクテリウム グラシル IFO8281	18	17	15
クロストリジウム プチリカム IFO8858	26	27	55
リノビウム ジャポニカム IFO18888	21	80	57
グルコバクテラー セリナス IFO8264	10	15	40

ストレプトコッカス ファエカリス IFO8128	18	14	50
ペディオコッカス ベントサシウス IFO8898	12	17	81
ロイノストック メセンチロイデス IFO8426	22	26	26
ラクトモナス アシドフィラス IFO8205	15	20	45
プロピオニバクテリウム テクニカム IFO12428	11	14	29
エアロコッカス ビリダニス IFO12817	11	17	84
マイコバクテリウム アビウム IFO8082	15	18	46
ノカルディア アステロイデス IFO8428	18	10	58
ストレプトマイセス アルプス IFO18014	16	18	59

ハフニア アルベイ IFO8781	22	26	85
アシネトバクター カルコアセチカス IFO18006	80	26	89
ノカルディア アステロイデス IFO8428	10	17	59

実施例 3

麦芽エキス 5%、酵母エキス 0.8%よりなる pH 6 の液体培地を用い、必要に応じて経過により集菌した以外は実施例 2 と同様に行ない、第 3 表の結果を得た。

第 3 表

菌 名	基質による生成量		
	D-カルニ チン	L-カルニ チン	γ-アミノ ベタイン
ムコール ラセモサス IFO4581	16 ^{mM}	18 ^{mM}	44 ^{mM}
リゾプス オリザエ IFO4706	16	24	18
アブシディア コエルレア IFO4011	16	19	29
フィコマイセス ニチニス IFO5695	21	21	88
エレモチシウム アシビイ IFO6557	12	11	88
アスペルギルス ニガー IFO4416	17	18	48
ペニシリウム オキサリカム IFO5748	15	16	85

実施例 2

実施例 1 に示した液体培地 5 ml を用い、第 2 表に示す菌株を用いて好氣的に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。

第 2 表

菌 名	基質による生成量		
	D-カルニ チン	L-カルニ チン	γ-アミノ ベタイン
エンテロバクター クロアカエ IFO8820	21 ^{mM}	27 ^{mM}	45 ^{mM}
セラチア マルセンサス IFO8786	27	29	54

モナスカス アンカ IFO5965	15	24	80
ノイロスポラ クラッサ IFO6660	15	16	86
オオスポラ ビスコサ IFO4604	20	28	25
ブルラリア ベルネッキ IFO6407	12	19	15
フサリウム ソラニ IFO5282	18	24	22
ジベレラ フジクロイ IFO6604	11	15	14
ウスティラゴ ゼアエ IFO6907	18	21	85
セラチノマイセス アジュロイ IFO7865	19	17	89
スポロトリクス シエンキイ IFO5988	16	20	42
トリコデルマ ビリデ IFO4847	17	15	20
フェルティシリウム アルポーアトラム IFO5922	14	14	10
イサリア コガネ IFO5299	14	16	21
グリオクラジウム デリクエセンズ IFO6617	18	21	47
トリコフィトン メンタグロフィテス IFO5466	12	16	11
フィトフトラ インフェスタニス IFO4872	15	18	48
シリンドロカルボン デストラクタンズ IFO6796	17	15	46
サッカロマイセス セレピンシアエ IFO0259	10	17	20
エレマスカス フェルティリス IFO0691	16	19	44
エンドマイセス レシ IFO1112	16	14	87

エンドマイコプセス カプスラリス IFO6672	16	15	28
シノサッカロマイセス ボンベ IFO6846	12	15	42
ピチア ポリモルファ IFO0195	15	22	51
ハンセセラ アノマラ IFO0149	20	16	22
シニコマイセス オクシゲンタリス IFO0371	11	20	20
チバリオマイセス ハンセニイ IFO0028	11	16	20
サッカロマイコデス ルドビギイ IFO1048	16	16	22
ハンセニアスポラ バルビエンシス IFO0115	14	15	19
ナドノニア エロンゲータ IFO0665	28	20	85
ネマトスポラ コリーリ IFO0658	14	18	42
リボマイセス リボファー IFO0678	22	18	21
スポロポロマイセス ホルサチカス IFO1084	11	12	88
クリプトコッカス アルビダス IFO0878	15	17	24
トルロプシス キャンディダ IFO0768	16	16	48
ピチイロスボラム オバーレ IFO0656	19	21	20
プレタノマイセス アノマラス IFO0642	15	22	48
キャンディダ ルギーサ IFO0591	12	15	81
クローケラ ジャバニカ IFO1094	17	18	89
トリゴノプシス バリアピリス IFO0671	12	11	20

ウイカーハミア フルオレセンス IFO1116	15	15	87
クワイペロマイセス ポリスポラス IFO0996	10	12	19
ブレラ アルバ IFO1192	12	11	25
ロドトルラ ミスタ IFO0887	12	14	80
トリコスボロン キャピテイナム IFO0748	18	19	46
クレオフィラム トラベウム IFO6429	15	18	19
レノフィラム コムネ IFO4928	19	20	86
トラメーナス サンギネア IFO6490	10	18	17

実施例 4

培養スケール、反応スケールを共に100倍とし、セラチアマルセンサス IFO 3736 を用い、基質を D L-カルニチンとした以外は、実施例 1 と同様に行なった。この反応スケールでは、加えた D L-カルニチンは 5 g (8.1 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、クロトノベタイン画分を得た。得られたクロトノベタインは 2.8 g (1.6 mmol) であった。

〔発明の効果〕

- 1) エピクロルヒドリンより安価に製造できる D, L-カルニチンに微生物菌体を作用させて容易かつ安価に L-カルニチンの前駆体であるクロトノベタインを製造することが可能となる。
- 2) 上記反応時に副生する γ-ブチロベタインを分離後、再び原料であるクロトノベタインに戻すことが可能である。
- 3) 前記特願昭 59-187878 における嫌氣的培養法で実施されているクロトノベタインから L-カルニチンを製造する際に生ずる微生物菌体(廃菌)を本発明に利用することが可能である。

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

④Int. 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 1:22)		
(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)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:42)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:05)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:01)		
(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 1:15)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:44)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:38)		
(C 12 P 13/00		
(C 12 R 1:06)		

⑥Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
(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)	
(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)	

⑥Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
(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	1:65)	
(C 12 P	13/00	
C 12 R	1:72)	