UDC 547.466.6

157. 亀田幸雄, 豊浦悦子, 木村行男, 金谷允清, 吉村欽一: 微生物における

アンラーゼ能の研究 (第 5 報)

酵素によるグルタミン酸及びアスパラギン酸の光学的分割*

Yukio Kameda, Etsuko Toyoura, Yukio Kimura, Yoshikiyo Kanaya, and Kin'ichi

Yoshimura: Studies on the Acylase Activities and Microorganisms. V.

Enzymatic Resolution of Glutamic and Aspartic Acids.

(Laboratory of Antibiotics, Faculty of Pharmacy, Kanazawa University)

The acetone-dried powder of soil bacteria KT 84 effected asymmetric hydrolysis of N-benzoyl-DL-glutamic acid and -DL-aspartic acid to respectively form L-glutamic acid and N-benzoyl-D-glutamic acid (IV), and L-aspartic acid and N-benzoyl-D-aspartic acid, besides benzoic acid. N-Benzoyl derivatives were prepared from these L-glutamic and L-aspartic acids. The acetone-dried powder of KT 83 hydrolyzed (IV) to form D-glutamic and benzoic acids.

(Received January 22, 1958)

著者等は土壌細菌 KT 84 (*Pseudomonas* sp.) 及び土壌細菌 KT 83 (*Pseudomonas* sp.) を用いてフェニルアラニン,^{1,2)} β-フェニルセリン,³⁾ リジン,⁴⁾ ロイシン⁵⁾ 等 10 数種のアミノ酸を酵素的に光学的分割した。今回も KT 84 及び KT 83 のアセトンパウダーを用いてグルタミン酸及びアスパラギン酸を光学的分割することが出来た。即ち N-benzoyl-DL-glutamic acid (I) に KT 84 アセトンパウダーを作用させて L-グルタミン酸 (III) $[\alpha]_D^{20} : +30.8^\circ$, N-benzoyl-D-glutamic acid (IV) mp 133~135°, $[\alpha]_D^{20} : +14.5^\circ$ 及び安息香酸を得た。ここに得られた L-グルタミン酸 (III) を benzoyl 化して N-benzoyl-L-glutamic acid mp 134~136°, $[\alpha]_D^{20} : -14.0^\circ$ を合成した。同様に N-benzoyl-DL-aspartic acid (II) に KT 84 アセトンパウダーを作用させて L-アスパラギン酸 (V) $[\alpha]_D^{20} : +24.5^\circ$, N-benzoyl-D-aspartic acid (VI) mp 175~176°, $[\alpha]_D^{20} : -37.3^\circ$ 及び安息香酸を得た。また L-アスパラギン酸 (V) を benzoyl 化して N-benzoyl-L-aspartic acid mp 176~177°, $[\alpha]_D^{20} : +37.3^\circ$ を合成した。次に KT 83 のアセトンパウダーを (IV) に作用させて D-glutamic acid (VII) $[\alpha]_D^{20} : -31.8^\circ$ と安息香酸が収量よく得られた。

因みに Greenstein 等⁶⁾ はグルタミン酸及びアスパラギン酸の chloroacetyl 誘導体に豚腎 acylase を作用させてこれを光学的に分割している。またグルタミン酸の benzyloxycarbonyl 誘導体についても行っている⁷⁾。

元素分析を担当された当薬学部板谷芳京氏に深謝する。

* 一部は日本薬学会例会発表 (1954 年 11 月)。

1) Y. Kameda, E. Toyoura, H. Yamazoe, Y. Kimura, Y. Yasuda: Nature, **170**, 888(1952).

2) 亀田, 豊浦, 木村, 松井, 堀田: 本誌 **78**, 748(1958).

3) 亀田, 豊浦, 木村, 松井, 川崎: 本誌 **78**, 754(1958).

4) 亀田, 豊浦, 木村, 松井, 斉藤: 本誌 **78**, 759(1958).

5) 亀田, 豊浦, 木村, 金谷, 野田: 本誌 **78**, 763(1958).

6) V. E. Price, J. B. Gilbert, J. P. Greenstein: J. Biol. Chem. **179**, 1169(1949).

7) L. Levintow, J. P. Greenstein, R. B. Kingsley: Arch. Biochem. Biophys. **31**, 77(1951).

実 験 の 部

N-Benzoyl-DL-glutamic acid (I) の合成 diethyl acetamidomalonate に acrylonitrile を縮合させて DL-グルタミン酸を合成⁸⁾。これに benzoyl chloride を作用させた⁹⁾。水より再結晶。板状品、減圧下に 90° で乾燥。mp 155~156°。benzoyl 化の収率 80%。

N-Benzoyl-DL-aspartic acid (II) の合成 フマル酸ジエチルエステルより DL-アスパラギン酸を合成¹⁰⁾。これに benzoyl chloride を作用させた¹¹⁾。水より再結晶。板状品、減圧下に 90° で乾燥。mp 162°。(benzoyl 化の収率 84%)。

KT 84 アセトンパウダー²⁾ による N-benzoyl-DL-glutamic acid (I) の不斉水解 (I) の 5 g に水 400 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調節。これに KT 84 アセトンパウダー 0.8 g 及びトルエン 2 cc を加え 37° に 3 日間放置すれば水解は終る。乳酸で pH 4.5 とし 80° に約 5 分間加熱し蛋白を凝固。3,000 g で 30 分間遠心分離。上澄液に活性炭を加え 1 時間かきまぜて濾過。濾液を乳酸で pH 3.2 に調節して減圧下に濃縮。約 4 倍量の 99% EtOH を加え一夜氷室に放置すれば L-グルタミン酸 (III) の結晶が析出。水より再結晶。菱面体品、mp 195~196°。[α]_D²⁰: +30.8° (c=4, 2N HCl)。得量 1.0 g (収率 68%)。C₅H₉O₄N (L-グルタミン酸) 計算値 N 9.52, 実験値 N 9.45。

(III) を分離した EtOH 溶液は減圧下に留去。少量の水を加え HCl で pH 1 とする。これを AcOEt で数回抽出。溶媒を留去。樹脂状の残留物は容易に結晶しない。石油エーテルで数回温浸して安息香酸を抽出後、残留物は出来るだけ少量の Me₂CO に溶かしベンゼンを加えて氷室に放置。放射状に析出した針状品の塊を濾取。Me₂CO・ベンゼンより再結晶。針状品、mp 133~135°。[α]_D²⁰: +14.5° (c=4, H₂O)。得量 1.8 g (収率 72%)。C₁₂H₁₃O₅N (N-benzoyl-D-glutamic acid) 計算値 N 5.58, 実験値 N 5.67。石油エーテルで抽出した安息香酸は少量の石油エーテルで精製。薄板状品、mp 118~120°。得量 0.88 g (収率 72%)。

N-Benzoyl-L-glutamic acid (III) の 1.5 g に当量の benzoyl chloride を作用させて合成。 Me₂CO・ベンゼンより再結晶。針状品、mp 134~136°。[α]_D²⁰: -14.0° (c=4, H₂O)。得量 1.9 g (収率 76%)。C₁₂H₁₃O₅N (N-benzoyl-L-glutamic acid) 計算値 N 5.58, 実験値 N 5.68。

KT 84 アセトンパウダーによる N-benzoyl-DL-aspartic acid (II) の不斉水解 (II) の 4.8 g に水 400 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調節。これに KT 84 アセトンパウダー 0.8 g 及びトルエン 2 cc を加え 37° に 5 日間放置。乳酸で pH 4.5 に調節し 80° に約 5 分間加熱して蛋白を凝固。3,000 g で 30 分間遠心分離。上澄液に活性炭を加え 1 時間かきまぜて濾過。濾液は減圧下に濃縮 HCl で pH 1 とし AcOEt で抽出。水層と AcOEt 層に分離。水層は減圧下に乾固して 20% HCl 含有 99% EtOH でエステル化度不溶性の NaCl を濾去。濾液を減圧下に乾固。樹脂様残留物を 10% HCl で水解後、減圧下に乾固、更に水を加えて減圧下に乾固して過剰の HCl を除く。残留物を少量の水に溶解。conc NH₄OH で pH 3.2 に調節して濃縮後冷却すると L-アスパラギン酸 (V) が析出。氷室に放置後濾取。水より再結晶。板状品、mp 268~270°(decomp)。[α]_D²⁰: +24.5° (c=2, 5N HCl)。得量 0.7 g (収率 53%)。C₄H₇O₄N (L-アスパラギン酸) 計算値 N 10.52, 実験値 N 10.63。

AcOEt 層は溶媒を留去。油状の残留物に石油エーテルを加えると結晶化。これをソクスレー抽出器に入れ安息香酸を抽出。安息香酸を除去した N-benzoyl-D-aspartic acid (VI) は水より再結晶。細長い板状品、mp 175~176°。[α]_D²⁰: -37.3° (c=2, 2N KOH)。得量 1.4 g (収率 58%)。C₁₁H₁₁O₅N (N-benzoyl-D-aspartic acid) 計算値 N 5.91, 実験値 N 5.87。石油エーテルで抽出した安息香酸は少量の石油エーテルで精製。mp 118~120°。得量 0.8 g (収率 65%)。

N-Benzoyl-L-aspartic acid (V) の 1.3 g に当量の benzoyl chloride を作用させ合成。 水より再結晶。細長い板状品、mp 176~178°。[α]_D²⁰: +37.3° (c=2, 2N KOH)。得量 1.7 g (収率 72%)。C₁₁H₁₁O₅N (N-benzoyl-L-aspartic acid) 計算値 N 5.91, 実験値 N 6.03。

KT 83 アセトンパウダー²⁾ による N-benzoyl-D-glutamic acid (IV) の酵素的水解 (IV) の 2.5 g に水 400 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調節。これに KT 83 アセトンパウダー 0.8 g 及びトルエン 2 cc を加え 37° に 4 日間放置。乳酸で pH 4.5 に調節し 80° に約 5 分間加熱し蛋白を凝固。3,000 g で 30 分間遠心分離。上澄液に活性炭を加えて 1 時間かきまぜて濾過。濾液を乳酸で pH 3.2 に調節して減圧下に濃縮。約 4 倍量の 99% EtOH を加え 1 夜氷室に放置すれば D-グルタミン酸 (VII) の結晶が析出。水より再結晶。菱面体品、mp 198~200°。[α]_D²⁰: -31.8° (c=4, 2N HCl)。得量 1.1 g (収率 75%)。C₅H₉O₄N (D-グルタミン酸) 計算値 N 9.52, 実験値 N 9.68。(VII) を分離した EtOH 溶液より (I) と同様に処理して安息香酸を得。mp 118~120°。得量 1.0 g (収率 82%)。なお KT 83 の加熱したアセトンパウダーで (IV) は水解されず回収するにとどまつた。

金沢大学薬学部

8) N.F. Albertson, S. Archer: J. Am. Chem. Soc. **67**, 2043(1945).

9) E. Fisher: Ber. **32**, 2464(1899).

10) M.S. Dunn, S.W. Fox: J. Biol. Chem. **101**, 493(1933).

11) E. Fisher: Ber. **32**, 2460(1899).