

酵素法で製造した L-リジン塩酸塩の光学的純度

誌名	食品総合研究所研究報告 = Report of National Food Research Institute
ISSN	03019780
著者名	田島,真 林,清 早川,清一 吉川,誠次
発行元	農林省食品総合研究所
巻/号	31号
掲載ページ	p. 76-79
発行年月	1976年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



酵素法で製造したL-リジン塩酸塩の光学的純度

田島 真・林 清・早川 清一・吉川 誠次

Optical Purity of L-Lysine Monohydrochloride Produced by New Enzymatic Method

Makoto TAJIMA, Kiyoshi HAYASHI, Sei-ichi HAYAKAWA and Seiji YOSHIKAWA

Contents of D-isomer in L-lysine monohydrochloride produced by new enzymatic method and traditional method of fermentation were estimated quantitatively by gas chromatography and ion-exchange chromatography as their peptides. On gas chromatography, N-PFP-lysine isopropylester was separated to isomers on glass capillary column

coated with N-TFA-L-Phe-L-Leu cyclohexyl ester. None of D-isomers was detected by this method. By ion-exchange chromatography of the peptide as N α , ϵ -di-L-Glu-Lys, 0.14% and 0.09% of D-isomer was detected in L-lysine monohydrochloride produced by new method and traditional method, respectively.

飼料及び食品添加用 L-リジンは現在発酵法により製造されているが、新しく DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムを原料とする酵素法が開発された¹⁾。この方法は L- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムをアミノカプロラクタムラセマーゼにより L- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムに変換し、さらに L- α -アミノ- ϵ -カプロラクタムを加水分解酵素により L-リジンに変換するものである。従ってこの間の反応が不充分であると製品中に D-リジンが混入する。本研究では 2つの方法で L-リジン中の D-リジンの分析を行い、新しい製法の妥当性を検討した。ここで行った多量の L-アミノ酸の中に含まれる微量の D-アミノ酸を定量する方法は他のアミノ酸にも適用できると考えられる。

実験方法

1. 試料

酵素法で製造した L-リジン塩酸塩、(株)東レ試作品(以下酵素法製品と略)及び従来法で製造した L-リジン塩酸塩試薬(株)宝興産 Lot OL 09(以下従来法製品と略)の 2点を試料とした。

2. カラムクロマトグラフィーによるアミノ化合物の分析

略号 t-BOC: 第 3 ブチルオキシカルボニル, OBZI: ベンジルエステル, TFA: トリフロロ酢酸, DCCI: ジシクロヘキシルカルボジイミド, HF: 無水フッ化水素

試料を SP-Sephadex C-25 のカラム(1.0×19cm)を用いて 0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で溶出しクロマトグラフィーを行ない、YEMMI-COOKING の方法²⁾によるニンヒドリン比色及び STEIN らの方法³⁾によるけい光比色によりアミノ化合物の分析を行った。

3. ガスクロマトグラフィーによる D-リジンの分析

試料を N-PFP (Pentafluoropropionyl)-リジン-イソプロピルエステルに導き、キャピラリーカラムガスクロマトグラフィーにより D-体と L-体の分離を行った⁴⁾。

試料 5 滴に 1.25 N 塩酸イソプロパノール溶液 5 ml を加え 100°C, 35 分間加熱しエステル化を行ない、過剰の試薬を窒素気流により除去した後、ジクロロメタン 6 ml 及び PFP 2 ml を加え室温に 1 時間放置してアシル化を行った。反応後試薬は減圧で除去し、クロロホルム 0.5 ml に溶解し、その 1 μ l をガスクロマトグラフに注入した。

カラムはバイレックスガラス管を延伸機(島津 GDM-1 型)を用いて内径 0.48 mm に延伸し、フッ化水素酸で内面にエッチング処理⁵⁾を施した後、N-TFA-L-Phe-L-Leu-cyclohexylester (Miles 製)を 10% エーテル溶液としてダイナミック法でコーティングした。

作成したカラムの 30m を用いて分析を行ったが、N-TFA-L-Val-methylester を用いて理論段数を測定した結果 5900 段であった。

4. $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-Lys の誘導体による D-リジンの分析

光学異性のアミノ酸を構成アミノ酸に含むペプチドはイオン交換クロマトグラフィーにより分離する⁷⁾。そこで試料リジンを $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-Lys のペプチドに誘導し D-リジンの分析を行った。ペプチドへの誘導は以下の固相合成法によった。

(1) *t*-BOC-リジンの合成

試料を NAGASAWA らの方法⁸⁾に従い *t*-Butyl-S-4, 6-dimethylpyrimidine-2-yl-thiocarbonate を用いて *t*-BOC化した。生成 *t*-BOC-リジンは DCHA (di-cyclohexylammonium) 塩として融点を測定し、合成の確認をした。

(2) *t*-BOC-リジンの樹脂への結合

Merifield のクロロメチル化樹脂 3.0 g に、合成した、*t*-BOC-リジンの全量を加え、トリエチルアミン存在下、エタノール-クロロホルム混合溶媒中で48時間加熱還流した。反応終了後エタノール、ジメチルホルムアミド、酢酸、メタノールで洗浄し、真空デシケーター中で乾燥した。

(3) 樹脂に結合した *t*-BOC-リジンの定量

樹脂に結合した *t*-BOC-リジン量は 6 規定塩酸 (ジオキサン溶液) 中で20時間加熱還流し、遊離したリジンをアミノ酸分析計により定量した。

(4) 固相合成法による $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-リジンの合成
ペプチド合成機 (島津 APS-800型) を用いて樹脂に結合したリジンの α 及び ϵ のアミノ基にグルタミン酸を結合した。結合するグルタミン酸の γ -COOH 基はあらかじめ Bzl で保護した。合成のプログラムは STEWART の方法⁹⁾ を一部改良し、Table 1 に示した。すなわち、

Table 1. Schedule for Coupling in Solid Phase Synthesis.

Step	Reagent	Volume	Time	Repeat
1	CH_2Cl_2	10 ml	2 min	4
2	TFA/ CH_2Cl_2 (50%)	15	30	1
3	CH_2Cl_2	10	2	3
4	CHCl_3	10	2	4
5	$\text{Et}_3\text{N}/\text{CHCl}_3$ (10%)*		10	1
6	CHCl_3	10	2	3
7	CH_2Cl_2	10	2	4
8	<i>t</i> -BOC-Amino acid**/ CH_2Cl_2	10		1
9	DCCI**/ CH_2Cl_3	120		1
10	CH_2Cl_2	10	2	3

* Et_3N was used at twenty times molar of amino group of Lys.

** *t*-BOC Amino acid and DCCI was used at three times molar of amino group of Lys.

t-BOC-Lys 樹脂の *t*-BOC 基を TFA で除去し、トリエチルアミン処理した後、*t*-BOC-グルタミン酸 (OBzl) を DCCI の存在下で結合した。

(5) 合成ペプチドの樹脂よりの脱離

合成ペプチドの樹脂よりの脱離は HF 法によった。合成及び洗浄の終了した樹脂全量にアニソール 0.5 ml 及び HF 20 ml を加え室温で1時間反応した。反応終了後、HF とアニソールを減圧で除去した後、遊離したペプチドを 1% 酢酸で抽出し、凍結乾燥した。

(6) アミノ酸分析計による $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-L-Lys と $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-D-Lys の分離定量

合成ペプチドはアミノ酸自動分析計 (日立 KLA-3B 型) のカラム (0.9 cm \times 50 cm) を用いて $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-L-Lys と $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-D-Lys の分離を行った。溶出には 0.2 N クエン酸緩衝液 (pH 4.25) を用いた。得られたクロマトグラムより吸光度法により両画分の定量を行った。

実験結果

1. 試料中に含まれるアミノ化合物

光学的純度の分析に先立ち、その測定妨害物質となる他のアミノ化合物が存在するかどうかの分析を行った。

試料リジン塩酸塩の SP-Sephadex C-25 を用いたカラムクロマトグラムを Fig 1 及び Fig 2 に示した。Fig 1

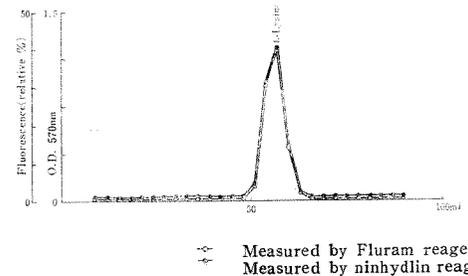


Fig. 1 Elution Pattern of L-Lysine (New Process) on SP-Sephadex C-25 Column.

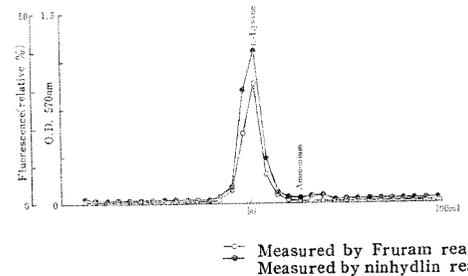


Fig. 2 Elution Pattern of L-Lysine (Traditional process) on SP-Sephadex C-25 Column.

は酵素法製品, Fig 2 は従来法製品である. 酵素法製品はクロマトグラム上に L- リジン以外のピークは見られず, 他のアミノ化合物は存在しなかった. 従来法ではアンモニアのピークがニンヒドリン比色で検出された. けい光比色ではアンモニアは三級アミンであるので発色しない. 存在量は試料中の濃度で0.01%であった. これらのことから両試料にはリジン以外の二級アミンは存在しないことが判明し, 以下の分析においてリジン以外の存在を考慮する必要がないと考えられた.

2. ガスクロマトグラフィーによる試料中の D- リジンの存在量

Fig 3 に標品の DL- リジンの N-PFP-, イソプロピ

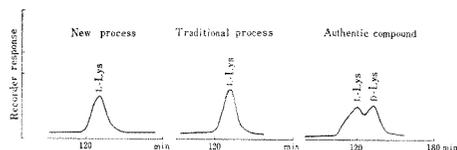


Fig. 3 Gas Chromatogram of N-PFP-Lys-isopropylester by Glass Capillary Column (0.48mm×30m) Coated with N-TFA-L-LHE-L-Leu-Cyclohexylester

ルエステルクロマトグラムを示した. D- リジンの誘導体は Rt, 120 min に, L- リジンの誘導体は Rt, 133 min に溶出し分離することができた.

試料リジン誘導体のクロマトグラムも Fig 3 に示したが, 酵素法製品, 従来法製品とも一つのピークしか与えずこのクロマトグラムからは D- リジンは存在しないと考えられた.

3. $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-リジンのクロマトグラフィーにより分離した試料中の D- リジンの存在量

Table 2. Analytical Data at Each Step of Peptide Synthesis.

	Lysine by new process	Lysine by Authentic traditional DL-lysine process	
Mp. of t-BOC-lysine dicyclohexyl ammonium salt	131-136°C	131-134°C	132-136°C
The quantity of lysine attached to the resin	0.0891	0.1194	0.0943

ペプチド合成の途中段階の分析結果を Table. 2 に示した. HF 法により樹脂より脱離し凍結乾燥したペプチドは粉末状であり, その純度はアミノ酸分析法により調べた. Fig. 4 に酵素法で製造したリジンのペプチド誘導体のクロマトグラムを示した. 合成最終目的物である $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-Lys の他に末反応の Lys 及び L-Glu が一つだけ結合した $N\alpha$ -L-Glu-Lys 及び $N\epsilon$ -L-Glu-

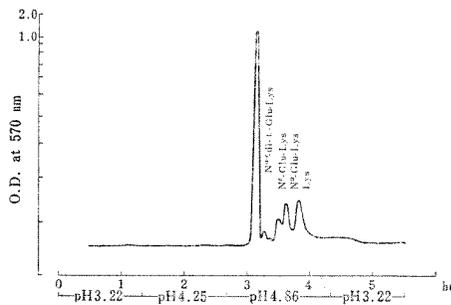


Fig. 4 Chromatogram of Synthesized Peptide by Amino Acid Analyzer

Lys が存在するが, 主生成物は目的物であった. クロマトグラムのピーク面積より合成反応の収率を求めると, 出発時の Lys に対し 70.3% であった.

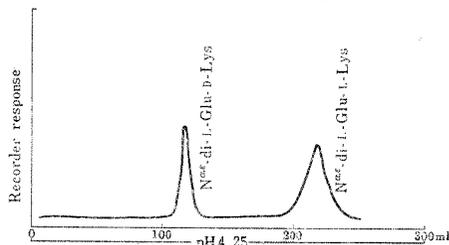


Fig. 5 Chromatogram of $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-D, L-Lysine (Authentic) by Amino Acid Analyzer

Fig. 5 に, 標品の DL- リジンより合成した $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu 誘導体の, アミノ酸分析計のカラムを利用したクロマトグラフィーによる $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-L-Lys と $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-D-Lys の分離結果を示した. $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-D-Lys は Retention volume, 120 ml 付近に. $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-L-Lys は Retention volume, 220ml 付近に溶出した.

酵素法及び従来法で製造したリジンより合成した $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-Lys のクロマトグラムは Fig. 6 に示した. 両試料とも微量の D-Lys の存在が認められた. クロマ

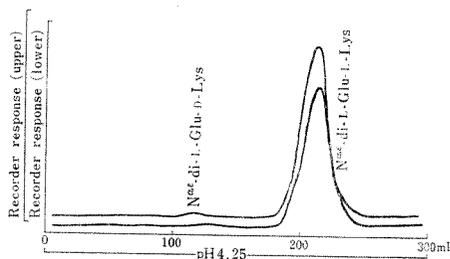


Fig. 6 Chromatogram of $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-Lysine by Amino Acid Analyzer

upper; new process
lower; traditional process

トグラムより両画分の面積を吸光度法により定量した結果を Table 3 に示した。D-リジンの含量は酵素法製品

Table. 3 Estimation of D- and L-Lysine by Ion-exchange Chromatography as their $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-Lysine.

	Lysine by new process	Lysine by traditional process
Total absorption of $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-D-Lys	0.016	0.008
Total absorption of $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-L-Lys	11.353	9.230
% of L-Lys	99.86	99.91

で0.14%、従来法製品で0.09%となるが、ペプチド合成時に若干ラセミ化を生ずることも考慮し、今、従来法製品を100% L-体と仮定すれば、 $0.14 - 0.09\% = 0.05\%$ が酵素法製品の D-体含量となる。しかし、従来法製品の L-体含量を確定することはできないので酵素法製品の D-体含量は0.05%以下と考えられる。

要 約

新しく開発された酵素法及び従来の発酵法で製造した L-リジン塩酸塩の光学的純度をガスクロマトグラフィー及びペプチド誘導体のクロマトグラフィーにより測定した。ガスクロマトグラフィーのための誘導体としては N-PFP-isopropylester を選び、カラムは N-TFA-L-phe-L-Leu-cyclohexylester をコーティングしたガラスキャピラリーカラムを用いた。その結果、両試料からは D-体は検出されなかった。

試料を $N\alpha, \epsilon$ -di-L-Glu-Lys のペプチドとし、アミノ酸分析計のカラムを用いて分離した結果、酵素法製品からは0.14%、従来法製品からは0.09%の D-体が検出された。

本研究は昭和49年度農林省受託研究「酵素法で製造した L-リジン塩酸塩の純度試験」の一部である。

文 献

- 1) 石油と石油化学, 18, 33 (1974).
- 2) 福村 隆; 油化学, 23, 456 (1974).
- 3) E. W. YEMM, and E. C. COCKING; *Analyst*, 80, 209 (1955).
- 4) S. STEIN, P. BÖHLEN, J. STONE, W. DAIRMAN, and S. UDENFRIEND; *Arch. Biochem. Biophys.*, 155, 203 (1973).
- 5) W. PARR, J. PLETREBSKI, C. YANG, and E. BAYER; *J. Chromatog. Sci.*, 9, 141 (1971).
- 6) 広田邦男・高田芳矩・有川喜次郎・吉原桃八・秋森伯美・鷹野重成; 分析化学, 23, 1194 (1974).
- 7) J. M. MANNING, and S. MOORE; *J. Biol. Chem.*, 243, 5591 (1968).
- 8) T. NAGASAWA, K. KUROIWA, K. NARITA, and Y. ISOWA; *Bull. Chem. Soc. Japan*, 46, 1269 (1973).
- 9) J. M. STEWART; "Solid Phase Peptide Synthesis", W. H. Freeman and Co. (1969).