九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

食品添加剤ε-N-Acetyl-L-lysineの新合成法

稲神, 馨
九州大学農学部食糧化学工学科栄養化学教室

https://doi.org/10.15017/22972

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 22 (3), pp.251-254, 1966-08. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

食品添加剤 ε-N-Acetyl-L-lysine の新合成法

稲　神　　馨

New synthetic method of food additive ε-N-acetyl-L-lysine

Kaoru Inagami

栄養価を高めるためリジンを食品に添加することが試みられているが，食品中の糖などと反応して褐変化をおこし，時には苦味さえ生ずることがあり，これがリジン強化食品の製造を困難にしている．リジンは反応性に富むε-アミノ基を持つため他のアミノ酸より褐変化がおこり易いとされている.[3,5,6,8] そこでε-アミノ基を封じたリジン誘導体をリジンの代わりに食品添加に使うことを考えた．ε-N-acetyl-L-lysine（以下アセチルリジンとする）は既に多くの研究者[2,4,7]により栄養的にリジンに代わり得ることが証明されており，またパン，粉乳などに加えて褐変化の試験を行つたところ着色が少なく優れた成績を示した.[3] この食品添加試験にアセチルリジンを多量に必要としたので，従来良く知られている Sanger の方法[7]によつて合成したが，収量が悪く経済的にみてリジンの代わりに使うことが困難なことを知つた．

そこでこの合成法に検討を加え，銅塩としてα-アミノ基を封じる方法では収量が良くなく，また除銅に手数を要するので，リジンのカルバミノ酸塩を造つてα-アミノ基を封じてからε-アミノ基をアセチル化する方法を用いた．この方法によると収量も前者よりよく，また経済的に合成できるので，以下これについて報告する．

実　験　方　法

アセチルリジンの定量

リジンおよびアセチルリジンの定量は日本電子KK製汎用自動記録式クロマトグラフ装置によつた．カラムには Dowex-50 を用い，溶出には pH 5.28 のクエン酸緩衝液を用いた．α, ε-diacetyl-L-lysine は吸着されずに出て，次にアセチルリジン，リジンが溶出される．以下の実験値は反応液を pH 4.5 に調整してそのままカラムにかけて得たものである．

実　験　結　果

1. Sanger 法[7] の検討

Sanger が報告したアセチルリジンの合成法は次のようで，これに従つて収量を調べた．

L-リジン塩酸塩 18.3 g (0.1 M) に炭酸銅 26 g (0.12 M)，水 500 cc を加えて 80°C 位まで加温して，過剰の炭酸銅を濾別する．残渣を再度熱水で洗つて前の液に加える．室温(15～20°) に冷えてから 2 N NaOH 液 60 cc (0.12M) と無水酢酸 12 g (0.12M) の各等量を交互に攪拌しながら加える．あと同じ温度のもとで 2 時間攪拌して，のち 2N HCl で微酸性にして硫化水素を通じて銅を除き，活性炭で脱色する．反応液を pH 4.5 に調整してから Dowex-50 NH_4^+型カラムに通し，水洗ののち 0.5N アンモニア液でアセチルリジンを溶出する．溶出液を少量の液になるまで減圧濃縮して，これにエチルアルコールを 80 % 溶液になるまで加えて一夜冷蔵すると粗結晶が得られる．再結晶は前と同様にエチルアルコール水溶液から行なう．なお Sanger は濃縮液にアルコールを加えて直ちに結晶化する方法を取つているが未反応のリジンの混入はさけられない．樹脂を用いるとリジンを全く含まないアセチルリジンが得られる．

a) アセチル化の条件とアセチル化率

この方法ではアセチル化の収率が悪いことがわかつた．水酸化リチューム，水酸化カリ，炭酸ナトリウムを用いてみたが収量の向上はみられなかつた．水酸化ナトリウム 0.12 M と無水酢酸を加える場合の反応温度と時間で収量がどの様に変わるかをアセチルリジンの定量から求めたものが Table 1 である．反応液を脱銅してから pH 4.5 に調整して，前記汎用自動式クロマトグラフ装置にかけて，アセチルリジン量を求めたものである．

高温で反応時間が長くなると α-アミノ基のアセチ

Carbaminate Method

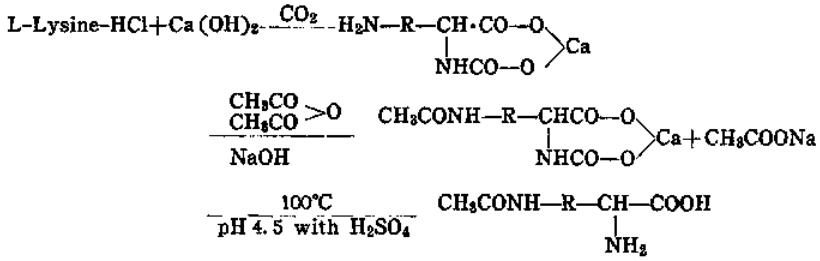

Table 1. Acetylating rate of lysine by Sanger method.

Reaction Temp. \ Time	1 hr	2	4	6
10°C	42%	50%	55%	55%
20	48	55	58	58
30	50	56	58	52
40	50	50	45	40

ル化がみられ収量は低下した．いずれにしてもアセチル化率は良くない．

b) 結晶収量

数回の実験で最も良い時で42～45%位であつた．なお Benoiton[1] は Sanger 法によると20～35%の収量しか得られなかつたと報告している．

2. カルバミノ酸法

1965年 Benoiton は Sanger 法では収量が悪いためこれを改良して，銅で α-アミノ基を封じるのは前と同じであるが，アセチル化を P-nitrophenyl acetate で行なう方法を提出した．この方法は Sanger 法より収量は良いが（Benoiton によると65～75%収量），P-nitrophenyl acetate は無水酢酸より高価であり，また前と同様に硫化水素を脱銅に用いるので経済的方法とはいえない．

そこで銅を使わないでしかも完全に α-アミノ基を封じる方法を考究して，次のようなカルバミノ酸法が良いことを知つた．

a) 操　作

L-リジン塩酸塩 18.3 g (0.1M) または $Ca(OH)_2$ を 16.3 g (0.22M)，水 500 cc を加えて，70°位まで加温してのち 20°位に冷してから，同温度で攪拌しながら2時間炭酸ガスを吹きこんでリジンのカルバミノ酸塩をつくる．のち，2N 水酸化ナトリウム液 60 cc と無水酢酸 12 g (0.12 M) の各等量を交互に加えて，20°C前後で2～4時間攪拌してのち稀硫酸で pH 4.5 位まで中和して，100°で20分間熱しカルバミノ酸塩を完全に分解する．更に稀硫酸で pH 2 以下まで酸性にしてバリウムまたはカルシウム塩を除き，濾液を再び pH 4.5 に戻して Dowex—50NH_4 型樹脂 2l に流入する．樹脂を水 1l で洗つたのち，0.5N アンモニア液 4～5l で溶出する．未反応リジンは 1N アンモニア液でないと溶出しないのでよく両者は分離する．

溶出液を減圧濃縮して前述したアルコールを用いる方法で結晶化させる．

b) アセチル化の条件吟味

カルバミノ酸法でのアセチル化の条件を調べた．その結果は Table 2 のとおりで，アセチル化率は前と同様にして求めた．

反応温度が高くなるとカルバミノ酸塩が分解して α 位のアセチル化がおこるためか，ε-N-アセチルリジンは減少している．20°位で3時間位反応させるのが良いようである．

Table 2. Acetylating rate of lysine by carbaminate method.

Reaction Temp. \ Time	1 hr	2	4	6
10°C	50%	75%	75%	75%
20	75	80	82	82
30	72	77	72	60
40	65	65	55	48

c) カルバミノ酸塩の分解

カルバミノ酸塩の分解は発生する炭酸ガスの状態および前記定量法によつて調べたところでは，pH 4.5 で 100°，20 分間加熱すると完全なことがわかつた．60°位から分解がおこるようである．

d) 陽イオン交換性樹脂によるアセチルリジンの単離

本法によるときは多くの塩類が生成し，なお少量の未反応リジン，ジアセチルリジンが混在するので純化は陽イオン交換性樹脂によつた．このさい H^+型では加水分解を受けるので NH_4^+型を用いた．沈澱性の塩

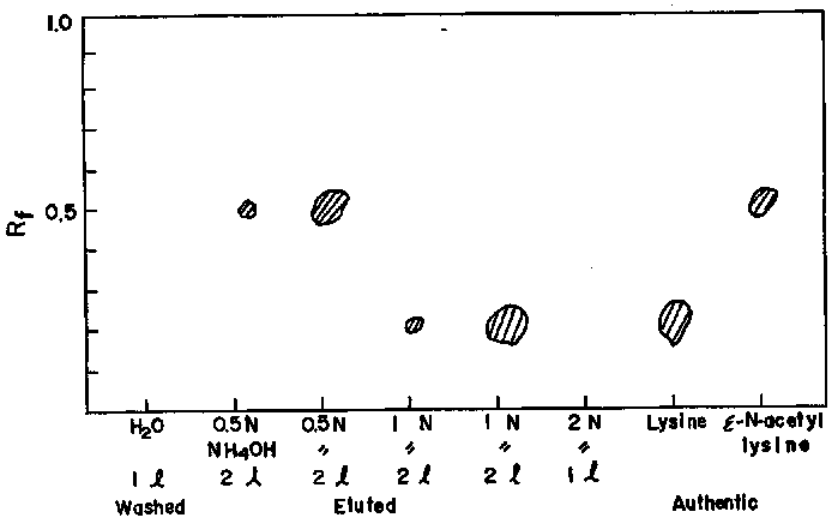

Fig. 1. Separation of ε-N-acetyl-L-lysine and L-lysine from mixture on Dowex-50 NH_4^+ form column.
Resin: 2l, Paper chromatography: Toyo No. 50 paper, Solvent: Benzen 1: Butanol 1: Metanol 2: Water 1, Treated with Ninhydrin.

Table 3. Economical comparison of three synthetic methods.

Synthetic method	Sanger's	Benoiton's	Carbaminate
Yield (%)	42～45	65～75	72～75
Material	$CuCO_3$ H_2S acetic anhydride	$CuCO_3$ H_2S p-Nitrophenyl acetate	$Ca(OH)_2$ or $Ba(OH)_2$ CO_2 acetic anhydride
Procedure	not so easy	not so easy	easy

を濾別したあと濾液をpH4.5位にして樹脂カラムに流入し，よく水洗のあとアンモニヤ水で溶出した．その結果は Fig. 1 のとおりでアセチルリジンは 0.5 N アンモニア溶出部に含まれており，リジンはそのあとに出て両者は良く分離していた．普通，カルシウムは 0.5 N アンモニヤ水では溶出されない．

e) カルシウム，バリウムによる結晶化の阻害

バリウム法だと結晶化が容易であつたが，カルシウム法では水飴状となり，種々結晶化を試みたが成功しなかつた．そこで試料の分析を行なつたところ微量の石灰が結晶化を阻害していることがわかつた．カルシウムがアセチルリジンのダイマーを造るため結晶化が阻害されるものと考えた．あとで，反応液を硫酸で中和するとき微酸性まででなく，pH 2.0 以下まで硫酸を加えてカルシウムを$CaSO_4$として除くとこの障害は生じないことがわかつた．除塩された液になお多量のカルシウムを含むと，樹脂に対しオーバーチャージとなりアセチルリジン部にカルシウムが混入するばかりでなく，樹脂の吸着容量をも低下させるのでなるべくカルシウムを除いておくことが大切である．なおバリウム法では硫酸でバリウムが十分に除去され結晶化阻害はみられなかつた．

f) 結晶収量

リジン塩酸塩 18.3 g から 13.2 g～14.0 g (72～75 %)

g) 分析値

m.p. 246～253°C

$[\alpha]_D^{16}$ +20.6 (1 in 5 NHCl)

元素分析	C	H	N
実測値	50.5 %	8.4 %	14.6 %
計算値	51.0	8.5	14.9

3. 3つの方法の比較

Sanger 法，Benoiton 法および本法の 3 法を経済的にアセチルリジンを造るという観点から簡単に比較すると Table 3 のようになる．

第 3 表から本法は従来の方法より経済的に優れていることがわかる．しかし収量の点では未だ問題を残し

ているが，大量に造るときは未反応のリジンを再び原料に戻して使えるので，未反応物が全て損失とはならない．

要　　約

食品にリジンの代わりに着色を少なくする目的で ε-N-acetyl-L-lysine を加えることを考えて，これの経済的合成法を検討した．そして従来の銅塩法より収量，資材および操作の点で優れているカルバミノ酸法を知つた．

リジンに水酸化バリウムまたは水酸化カルシウムを加えてから炭酸ガスを吹込み，カルバミノ酸塩を生成させ α-アミノ基を封じてから ε-アミノ基を無水酢酸と水酸化ナトリウムでアセチル化する．反応後に微酸性で加熱してカルバミノ酸塩を分解して生成した塩類を除き，陽イオン交換性樹脂にかけて未反応のリジンと分離する．溶出液を濃縮しエチルアルコールを加え冷蔵して結晶を得る．収量72～75%，m.p.246°～253°C．

本研究を行なうに当り種々御指導いただいた和田正太教授ならびに実験に協力された古賀民穂氏に対し深く感謝いたします．

文　　献

1) Benoiton, L. and Leclerc, J. (1965), Canadian J. Chem., **43**, 991.
2) Block, K. and Rittenberg, D. (1947) J. Biol. Chem. **169**, 467.
3) 稲神馨，古賀民穂，(1966)，九大農学芸誌，印刷中
4) 小林忠之，渡辺　厚，荒時義和，古野厚次，(1958)，栄養と食糧，**14**，167.
5) Mitchell, H. H., and Block, R. J. (1946) J. Biol. Chem., **163**, 598.
6) 永山文男，(1960) 日本水産学会誌，**26**，1107.
7) Neuberger, A. and Sanger, F. (1943) J. Biol. Chem., **37**, 515.
8) Willits, C. O., Underwood, J. C., Lento, H. G. and Ricciuti, C. (1958) Food Research, **23**, 61.

Summary

The use of ε-N-acetyl-L-lysine instead of L-lysine as food additive has been recommended previously in order to minimize the browning of foods, that encounters when lysine is enriched to the foods.

Sanger synthesized ε-N-acetyl-L-lysine by acetylation of the lysine-Cu complex with acetic anhydride. An improved method for synthesizing this lysine derivative was presented by Benoiton, in which lysine-Cu complex was acetylated with p-nitrophenyl acetate. These methods, however, did not satisfactory with respects to the yield or economical standpoints.

A new and more economical method for synthesizing ε-N-acetyl-L-lysine has been presented. The method consisted of two steps, ie., conversion of lysine to its carbaminate and consequent acetylation of the carbaminate was made by adding 69.5 g $Ba(OH)_2 \cdot 9H_2O$ (or 16.3 g $Ca(OH)_2$) to 500 ml of 3.66 % lysine-HCl solution and bubbling carbon dioxide gas. The carbaminate thus formed was acetylated by alternate dropwise addition of 60 ml of 2N-NaOH and 12 g of acetic anhydride with stiring. After completion of acetylation, the acetyl-lysine-carbaminate was decomposed to acetyl-lysine by boiling of the mixture. The filtrate was loaded on a Dowex-50 NH_4^+ column and acetyl-lysine was eluted with 0.5N NH_4OH solution. This fraction was evaporated to dryness *in vacuo*, then ε-N-acetyl-L-lysine was crysterized in 80 % ethanol. Yield, 72-75 %. M.P., 246-253°C.

Laboratory of Nutrtion, Faculty of Agriculture
Kyushu University, Fukuoka, Japan