

Notes

UDC 547.466.2-292 : 577.152 : 576.851.1

Yukio Kameda, Etsuko Toyoura, and Katsuhiko Matsui : Studies on
Acylase Activity and Microorganisms. X.** Enzymatic Resolution
of Alloisoleucine by Soil Bacteria, KT 85 (*Pseudomonas* sp.).

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

Alloisoleucine is a diastereoisomer of an essential amino acid, isoleucine, and it has not been isolated from hydrolysate of proteins, but D-alloisoleucine was obtained as a hydrolysis product of an antibiotic, actinomycin C.¹⁾ In this connection, an enzymatic resolution of alloisoleucine was produced by Greenstein, *et al.*²⁾ by means of asymmetric hydrolysis of N-acetyl-DL-alloisoleucine with hog kidney acylase.

In the earlier papers,^{3,4)} it was reported that KT 84 (*Pseudomonas* sp.) asymmetrically hydrolyzed the benzoyl, dichloroacetyl, chloroacetyl, or acetyl derivative of the following 24 amino acids to give the corresponding L-amino acids and acyl-D-amino acids in a good yield: Alanine, aminobutyric acid, valine, leucine, phenylalanine, tyrosine, *p*-methoxyphenylalanine, 3,4-methylenedioxyphenylalanine, *p*-nitrophenylalanine, serine, threonine, allothreonine, aspartic acid, glutamic acid, methionine, cystine, lysine, ornithine, 2,4-diaminobutyric acid, *threo*- and *erythro*- β -phenylserines, *threo*- and *erythro*- β -*p*-nitrophenylserines, and phenylglycine.

In experiments on resolution of alloisoleucine by KT 84, it was found that acetone-dried powder of KT 84 could not attack N-acetyl-DL-alloisoleucine in a measurable rate. This paper shows that KT 85⁵⁾ (*Pseudomonas* sp.) asymmetrically hydrolyzes N-acetyl-DL-alloisoleucine to give L-alloisoleucine, m.p. 280°(decomp.), $[\alpha]_D^{20} +40^\circ$, and N-acetyl-D-alloisoleucine, m.p. 154°, $[\alpha]_D^{20} -21.5^\circ$, in a good yield. Incidentally, it was found that KT 85 has the ability to utilize D-form but not L-form of *threo*- β -phenylserine and its benzoyl derivative as the sole source of carbon.⁵⁾

The authors' thanks are due to Mr. Y. Itatani of Kanazawa University for microanalyses.

Experimental

N-Acetyl-DL-alloisoleucine—A mixture of DL-isoleucine and DL-alloisoleucine was synthesized from malonic ester and *sec*-BuBr.⁶⁾ The products were acetylated with an excess of Ac₂O in glacial AcOH and then successive crystallization of the product from 50% AcOH or acetone separated pure, crystalline N-acetyl-DL-alloisoleucine, m.p. 167~168°.²⁾ *Anal.* Calcd. for C₈H₁₅O₃N : C, 55.47; H, 8.73; N, 8.09. Found : C, 55.56; H, 8.72; N, 8.32.

Asymmetric Hydrolysis of N-Acetyl-DL-alloisoleucine by KT 85 Acetone-Powder—1.73 g. of N-acetyl-DL-alloisoleucine was dissolved in 200 cc. of water and neutralized to about pH 7.2 by addition of 10% NaOH. To this aqueous solution, 0.4 g. of KT 85 acetone-powder was added to insure complete hydrolysis of the L-form of the acetyl-alloisoleucine and the mixture was incubated at 37° with a few drops of toluene for 3 days. The digest was then adjusted to pH 4.5 with AcOH and the resulting precipitate was removed by centrifugation. The supernatant solution was evaporated *in vacuo* to about 10 cc. After cool, it was acidified to pH 1.0 by addition of HCl and extracted with AcOEt. The aqueous layer was evaporated *in vacuo* to dryness, the residue was dissolved in a little water,

* Tsuchitoribanaga-machi, Kanazawa (亀田幸雄, 豊浦悦子, 松井勝彦).

** Part IX : This Bulletin, 6, 395(1958).

- 1) H. Brockmann, N. Grubhofer, W. Kass, H. Kalbe : Chem. Ber., 84, 261(1951).
- 2) J. P. Greenstein, L. Levintow, C. G. Baker, J. White : J. Biol. Chem., 188, 647(1951).
- 3) Y. Kameda, E. Toyoura, H. Yamazoe, Y. Kimura, Y. Yasuda : Nature, 170, 888(1952).
- 4) Y. Kameda, *et al.* : Yakugaku Zasshi, 78, 748(1958).
- 5) Y. Kameda, E. Toyoura, Y. Kimura, Y. Ohsumi : This Bulletin, 6, 321(1958).
- 6) Org. Syntheses, 21, 60(1941).

and neutralized with conc. NH_4OH . The resulting precipitate was collected by suction and recrystallized from water and EtOH to 0.52 g. (79.4%) of L-alloisoleucine as colorless plates, m.p. 280° (decomp), $[\alpha]_D^{19} +40^\circ$ (c=2, 5N HCl). *Anal.* Calcd. for $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$: C, 54.94; H, 9.99; N, 10.68. Found: C, 54.88; H, 10.14; N, 10.45.

The AcOEt layer was evaporated to dryness *in vacuo* and recrystallized from water to 0.67 g. (78%) of N-acetyl-D-alloisoleucine as colorless columns, m.p. 154° , $[\alpha]_D^{19} -21.5^\circ$ (c=2, EtOH). *Anal.* Calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$: C, 55.47; H, 8.73; N, 8.09. Found: C, 55.36; H, 8.91; N, 8.24.

Summary

A strain of soil bacteria, KT 85 (*Pseudomonas* sp.), asymmetrically hydrolyzed N-acetyl-DL-alloisoleucine to give L-alloisoleucine and N-acetyl-D-alloisoleucine in a good yield.

(Received March 15, 1958)

UDC 547.823

Torizo Takahashi und Fumiro Yoneda: Über das 3,5-Dinitro-2-pyridon.

(Pharmazeut. Institut, Mediz. Fakultät, Universität Kyoto*)

Bereits Tschitschibabin und Schapiro¹⁾ hatten festgestellt, dass man durch Nitrierung des 2-Pyridon Natriumsalzes mit rauch. Schwefelsäure und konz. Salpetersäure 3-Nitro-2-pyridon, 5-Nitro-2-pyridon sowie 3,5-Dinitro-2-pyridon vom Zers. Pkt. 286° erhält, sowie dass man durch weitere Nitrierung von 5-Nitro-2-pyridon den oben erwähnten Dinitrokörper gewinnen kann.

Später haben Binz und Maier-Bode²⁾ bei der Nachprüfung des Tschitschibabin'schen Verfahrens gleichfalls ausser dem Hauptprodukt, 3-Nitro-2-pyridon, noch 3,5-Dinitro-2-pyridon vom Zers. Pkt. 280° hergestellt. Schliesslich haben auch Takahashi und Yamamoto³⁾ durch Nitrierung von 5-Nitro-2-pyridon mit rauch. Schwefelsäure und rauch. Salpetersäure bei $70\sim 75^\circ$ eine Substanz vom Zers. Pkt. 289° in fast quantitativer Ausbeute erhalten.

Demgegenüber berichteten Berrie, Newbold und Spring,⁴⁾ dass man 3,5-Dinitro-2-pyridon, das bei 176° schmilzt, bei weiterer Nitrierung von 3-Nitro-2-pyridon sowie 5-Nitro-2-pyridon erhält. Ferner erhielten sie bei der Nachprüfung des Tschitschibabin'schen Verfahrens eine Substanz vom Zers. Pkt. 286° aus 2-Pyridon und vermuteten, dass diese Substanz nicht 3,5-Dinitro-2-pyridon, sondern wahrscheinlich ein Gemisch von 3-Nitro-2-pyridon Natriumsalz und 3,5-Dinitro-2-pyridon Natriumsalz sei.

Auch Plazek⁵⁾ hat gezeigt, dass bei einer Nitrierung des 5-Nitro-2-pyridons, die man bei erhöhter Temperatur in Gegenwart von rauch. Schwefelsäure durchführt, 3,5-Dinitro-2-pyridon vom Schmp. 176° entsteht, wobei sich jedoch keine Substanz vom Zers. Pkt. 286° gewinnen lässt. Auf Grund dieses Befundes nahm er an, dass letztere Substanz ein Dinitropyridon anderer Struktur darstellen müsse.

Wir haben nun die Struktur dieser Substanz untersucht und dabei Folgendes festgestellt: Man kann hellgelbe Nadeln vom Zers. Pkt. 290° (I) dadurch in guter Ausbeute erhalten, dass man 5-Nitro-2-pyridon mit rauch. Schwefelsäure sowie rauch. Salpetersäure erhitzt, die Reaktionsflüssigkeit auf Eis giesst und mit 40-proz. Natronlauge

* Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto (高橋酉藏, 米田文郎).

- 1) A. E. Tschitschibabin, S. A. Schapiro: *Chem. Zentr.*, **1923** [III], 1025.
- 2) A. Binz, H. Maier-Bode: *Angew. Chem.*, **49**, 486(1936).
- 3) T. Takahashi, Y. Yamamoto: *Yakugaku Zasshi*, **69**, 159(1949).
- 4) A. H. Berrie, G. T. Newbold, F. S. Spring: *J. Chem. Soc.*, **1951**, 2590.
- 5) E. Plazek: *Rec. trav. chim.*, **72**, 569(1953).