

N-16

LED 照明を用いた藍藻 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) によるアセトフェノン誘導体の不斉還元Asymmetric Reduction of Acetophenone Derivatives by Cyanobacterium
(*Synechocystis* sp. PCC 6803) using LED Illumination○柿本剛志¹, 伊藤賢一², 青山忠³, 村上雅彦², 中村薫⁴, 滝戸俊夫³*Tsuyoshi Kakimoto¹, Ken-ichi Itoh², Tadashi Aoyama³, Masahiko Murakami², Kaoru Nakamura⁴, Toshio Takido³

Abstract: Microalgae can work as biocatalysts and have potentials for producing valuable substances. Recently, we have developed the use of microalgae for converting artificial ketones to the corresponding chiral alcohols under fluorescent light illumination. In this work, we used light-emitting diodes (LEDs) as illumination light. Asymmetric reduction of ketones by cyanobacterium (*Synechocystis* sp. PCC 6803) afforded to the (*S*)-alcohols in excellent enantiomeric excess by the aim of illumination of orange and red LED lights.

1. 緒言

我々は、近年の社会情勢等を勘案した環境低負荷型有機反応の開発を目指し、無機固体担持試薬を用いた新規不均一系反応の開発^[1]や生体触媒を用いた生変換反応 (Biotransformation)^[2]の研究を行ってきた。生変換反応とは、酵素や微生物、植物などを直接用いた有機反応であり、水溶媒中で行われることが多く、従来の有機反応と比べ有機溶媒の使用量を減らすことができるだけでなく、室温付近での温和な条件で反応を行う。また、高い選択性で目的物が得られる反応が多いため、近年環境負荷の低い物質生産として期待され、関連する研究が活発に行われている^[3]。先に我々は、藍藻やクロレラを用いた蛍光灯下でのアセトフェノン誘導体の不斉還元を報告した^[4]。今回、この不斉還元に必要な光源としてLED照明を用いて反応を行い、照射光の強度や波長が反応にどのような影響を及ぼすかを検討したので、その詳細について報告する。

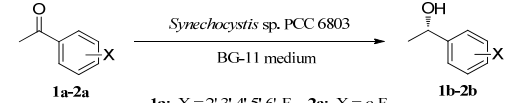
2. 実験

藍藻 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) の継体培養懸濁液から分光光度計を用いて、OD₇₅₀ = 2 の藍藻懸濁液を調整した。この溶液 6 mL にジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた基質 (0.5 mg) を加え、LED 照明下、25 °C、120 rpm の振とう条件で反応を行った。反応終了後、内容物を酢酸エチルで抽出し、生成物の収率 (使用カラム: DB-1) とエナンチオ過剰率 (使用カラム: CP-cyclodextrin-B-2,3,6-M-19 [CPCD]) をガスクロマトグラフィーを用いた内部標準法 (内部標準物質: *n*-ドデカン) により求めた。

3. 結果および考察

赤色LED (660 nm) 照射下、光の強度を 1.0 から 60 W/m² まで変化させて反応を行ったところ次に示すような結果を得た (Table 1)。すべての条件において相当する *S* 体のアルコールが高立体選択的に得られた (>99 % ee)。両基質ともに照射する光の強さを強くすると反応性は向上し、**1a** の場合、22 W/m² の条件下、反応時間 2 日で基質が消失し、75 % の収率で生成物が得られた (Run 5)。**2a** の場合は、12 および 22 W/m² の光を用いたとき、生成物の収率が最も良い結果となった (Runs 11-12)。しかしながら 60 W/m² の条件では、反応開始後 2 日目で藍藻懸濁液が白濁し、それ以上反応が進行しなかった。これより、本反応での反応性 (収率) は光の強弱に影響を受けることが判明した。

Table 1. Asymmetric Reduction of Acetophenone Derivatives using *Synechocystis* sp. PCC 6803 under Red LED Illumination



Run	Substrate	LED (W/m ²)	Time (days)	Yield (%) ^a	
				Ketone	Alcohol
1	1a	1.0	4	7	73
2	1a	5.0	4	-	76
3	1a	7.5	4	-	70
4	1a	12	4	-	73
5	1a	22	2	-	75
6	1a	60	2	13	54
7	1a	60	4	9	56
8	2a	1.0	4	46	27
9	2a	5.0	4	56	31
10	2a	7.5	4	52	35
11	2a	12	4	41	43
12	2a	22	4	40	43
13	2a	60	4	38	38

a) Determined by GC analysis. All products were obtained in >99 % ee

1 : 日大理工・院 (前)・応化 2 : 日大理工・教員・一般 3 : 日大理工・教員・応化 4 : 神大発達科学

次に, **1a**を用いて最も反応が効率良く進行した 22 W/m^2 条件において波長の種類を変化させ反応を行ったところ **Fig. 1** の結果を得た. すべての反応において高立体選択的に相当する *S* 体のアルコール類が得られた ($>99\%$ ee). 各波長下での反応の経時変化より, 最も波長の短い青色 (470 nm) の場合, 反応時間 4 日間で収率 70 %と収率が最も低い結果となった. また, 黄色 (595 nm), 橙色 (612 nm), 赤色 (620 nm) の場合は, 赤色 (660 nm) と同程度の反応性を示した. 緑色 (535 nm) は両者の中間程度の反応性を示した.

本反応の収率は光の強弱により影響を受けることが判明しているため, 波長の違いによる反応性への影響は弱光下でより明確になると考え, 反応を検討した. 1.0 W/m^2 条件下での結果を**Fig. 2**に示す. 青色 (470 nm) の場合, 反応時間 4 日での収率は 29 % と反応性が最も低い結果となった. また, 緑色 (535 nm), 黄色 (595 nm) と波長を長くするにつれて反応性は向上し, 橙色 (612 nm), 赤色 (620 nm), 赤色 (660 nm) のとき最も収率良く目的物を得ることが出来た. 次に, **2a**を用いて同様の反応を行ったところ, **1a**と比較して反応性が低下する結果となった (**Fig. 3**). この基質においても青色 (470 nm) の場合, 反応時間 4 日間で収率は 19 % と最も反応性が低く, 照射する波長を長くするにつれて反応性が向上し, 赤色 (660 nm) では 27 %の収率で目的物を得ることが出来た. またすべての反応において高立体選択的に相当する *S* 体のアルコール類が得られた ($>99\%$ ee).

以上の結果により本不斉還元は光の強度だけでなく波長の影響も受けることが示唆され, 赤色付近の波長の光が有効であることが判明した.

4. 参考文献

- [1] T. Aoyama, *et al.*: "A novel efficient method for the synthesis of substituted olefins; cross coupling of two different alcohols using $\text{NaHSO}_4/\text{SiO}_2$.", *Chem. Commun.*, 49, pp6605-6607, 2013.
- [2] K. Nakamura, *et al.*: "In Enzyme Catalysis in Organic Synthesis A Comprehensive Handbook", Wiley-VCH:Weinheim, pp991-1047, 2002.
- [3] (a) T. Matsuda, *et al.*: "Recent progress in biocatalysis for asymmetric oxidation and reduction.", *Tetrahedron Asymmetry*, 20, pp513-557, 2009. (b) K. Ishihara, *et al.*: "Biotransformation using plant cultured cells.", *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 23, pp145-170, 2003.
- [4] (a) K. Nakamura, *et al.*: "Cyanobacterium-catalyzed asymmetric reduction of ketones.", *Tetrahedron Lett.*, 41, pp6799-6802, 2000. (b) K. Itoh, *et al.*: "Photobiocatalyzed asymmetric reduction of ketones using *Chlorella* sp. MK201.", *Biotechnol. Lett.*, 34, pp2083-2086, 2012.

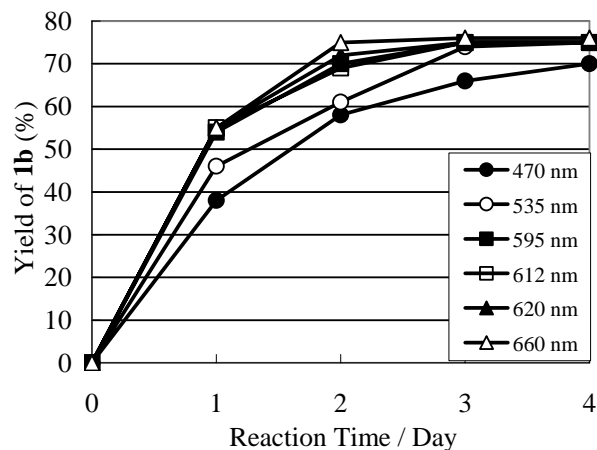


Fig. 1. Asymmetric Reduction of **1a** using *Synechocystis* sp. PCC 6803 under 22 W/m^2 of LED Illumination

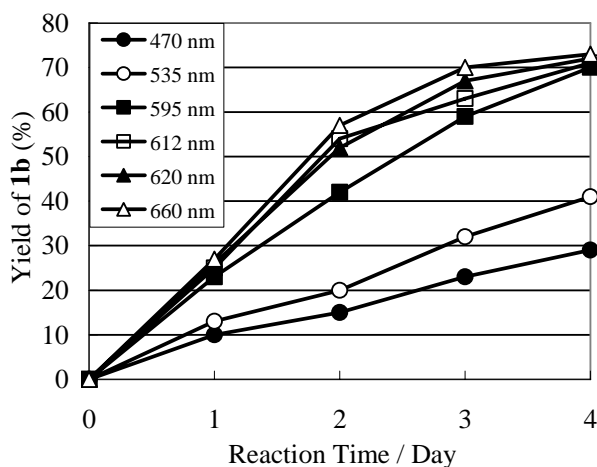


Fig. 2. Asymmetric Reduction of **1a** using *Synechocystis* sp. PCC 6803 under 1.0 W/m^2 of LED Illumination

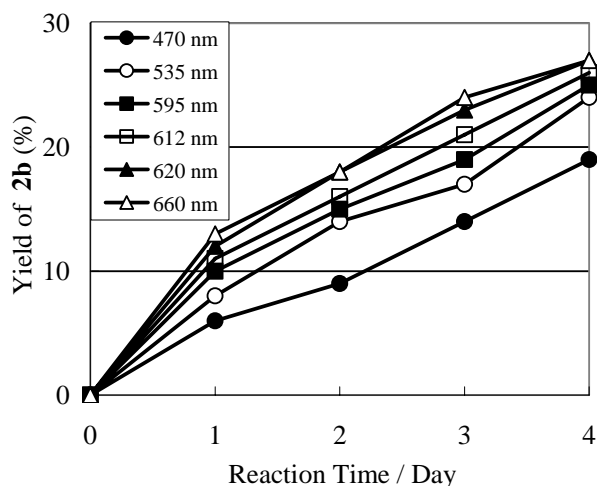


Fig. 3. Asymmetric Reduction of **2a** using *Synechocystis* sp. PCC 6803 under 1.0 W/m^2 of LED Illumination