

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	酵素を利用したイオン液体反応場の構築
Title(English)	
著者(和文)	田中孝昌
Author(English)	Takamasa Tanaka
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7632号, 授与年月日:2009年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:北爪 智哉
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7632号, Conferred date:2009/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

酵素を利用したイオン液体反応場の構築

生物プロセス専攻

田中 孝昌

目次

略語表	5
第一章 緒論	
1. はじめに	7
2. 生体触媒反応	8
3. イオン液体	9
4. 酵素を利用したイオン液体反応場の構築	10
5. <i>Geotrichum candidum</i> を用いた不斉反応	13
6. フッ素の性質と天然有機フッ素化合物	17
7. フルオリナーゼ	19
8. 本論文の概要と構成	23
第二章 <i>Geotrichum candidum</i> を用いたラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応	
1. はじめに	25
2. 固定化アセトン乾燥菌体を用いた立体選択的酸化反応	26
3. 固定化休止菌体を用いた立体選択的酸化反応	31
4. 第二章のまとめ	35
5. Experimental for Chapter 2	36
第三章 ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応	
1. はじめに	44

2. ヘキサン溶媒中における検討	44
3. イオン液体反応場での吸水性ポリマーによる固定化の影響	45
4. 水の必要性、イオン液体、好気性条件の検討	46
5. 添加物による反応性変化	47
6. 化学還元剤を用いたデラセミ化反応	49
7. デラセミ化反応の基質特異性	52
8. <i>Lactobacillus kefir</i> (乳酸菌ケフィア) 由来のアルコールデヒドロゲナーゼ を用いたデラセミ化反応	55
9. 第三章のまとめ	57
10. Experimental for Chapter 3	59

第四章 フルオリナーゼのフッ素化反応における反応性向上

1. はじめに	89
2. 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応におけるイオン液体の効果	90
3. 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応における条件の検討	93
4. 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応に適したイオン液体	94
5. 第四章のまとめ	97
6. Experimental for Chapter 4	98

第五章 総括

1. 本研究の総括	103
2. 今後の展望	104

引用文献	105
------	-----

論文目録	109
謝辞	110

略語表

本論文において、以下の略語を使用した。

ADH	alcohol dehydrogenase
Ala	alanine
amim	1-allyl-3-methylimidazolium
APG5	the acetone powder of <i>Geotrichum candidum</i> NBRC 5767
Arg	arginine
Asn	asparagine
Asp	aspartic acid
bmim	1-butyl-3-methylimidazolium
C12	dodecyl
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> lipase B
CPCD	CP-Cyclodextrin-B-2,3,6-M-19
d	day
DEME	<i>N,N</i> -diethyl- <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(2-methoxyethyl)ammonium
DEX	CP-Chirasil-DEX CB
DMF	<i>N,N</i> -dimethyl formamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
ee	enantiomeric excess
emim	1-ethyl-3-methylimidazolium
eq.	equivalent amount
Et	ethyl
FAc	fluoroacetate
5'-FDA	5'-fluoro-5'-deoxyadenosine
4-FT	4-fluorothreonine
hexmim	1-hexyl-3-methylimidazolium
HPLC	high-performance liquid chromatography
GC	Gas chromatography
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

Me	methyl
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
octylmim	3-methyl-1-octylimidazolium
Phe	phenylalanine
PLP	pyridoxal phosphate
PP13	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -propylpiperidinium
rt	room temperature
SAM	<i>S</i> -adenosyl-L-methionine
Ser	serine
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFSA	bis(trifluoromethanesulfonyl)amide
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trp	tryptophan
Tyr	tyrosine
y	yield

第一章 緒論

1.1 はじめに

20 世紀は合成繊維、プラスチック、薬など多くの便利なものが開発され、人々の生活は豊かになった。しかし、大量生産、大量消費された結果、資源の枯渇や環境汚染などの社会問題が発生し、生物の健康や地球環境に多大な影響を及ぼすようになってきている。そうした背景から地球全体で持続可能な社会を形成していこうという機運が盛り上がり、1992 年に国連地球環境会議（リオサミット）が開かれた。¹⁾ また、化学の世界では「グリーンケミストリー」²⁾ や「サステイナブルケミストリー」³⁾ という環境調和型化学の精神が浸透している。これは米国環境保護局（EPA）の P. Anastas らによると、「人間の健康や環境に害のある原料、製品、副生成物、溶媒・試薬などの使用や発生を、低減あるいは停止するために、化学的技術で解決する手法」としている。⁴⁾ さらに、日本では、地球全体が持続可能な社会を形成していくため経済的にも効率的にも優れたものを作っていこうという思想を加えた「グリーン・サステイナブルケミストリー」という用語が使われている。さて、グリーンケミストリーへの具体的な取り組みに向けて次のグリーンケミストリーの 12 か条が知られている。

グリーンケミストリーの 12 か条⁴⁾

1. 廃棄物は“出してから処理”ではなく、出さない
2. 原料をなるべく無駄にしない形の合成をする
3. 人体と環境に害の少ない反応物・生成物にする

4. 機能が同じなら、毒性のなるべく小さい物質をつくる
5. 補助物質（溶媒、分離剤）はなるべく減らし、使うにしても無害なものを
6. 環境と経費への負担を考え、省エネを心がける
7. 原料は、枯渇性資源ではなく、再生可能な資源から得る
8. 途中の修飾反応はできるだけ避ける
9. できるかぎり触媒反応を目指す
10. 使用後に環境中で分解するような製品を目指す
11. プロセス計測を導入する
12. 化学事故につながりにくい物質を使う

1.2 生体触媒反応

生体触媒とは、酵素、微生物、菌体、植物細胞、触媒抗体などの生体で作る触媒のことを意味している。⁵⁾

生体触媒を用いた有機合成がグリーンケミストリーの観点から盛んに研究されており、生体触媒を有機合成に用いる際の利点としては、まず酵素自身が生物によって合成および分解されることや、反応条件が温和であることが挙げられる。また、効率的な触媒能を持ち、高い部位および立体選択性とそれに伴う高純度化が挙げられる。⁶⁾ 発酵法も含めた比較では、1回の発酵操作で複数の反応を進行させる（マルチリアクション）こともできる。このマルチリアクションにより、反応ステップの短縮化が可能となり、最終的にコストの削減につながることを期待できる。⁷⁾ これらの点から生体触媒反応は環境にやさしい触媒として注目されている。

不斉合成法の開発は、天然物や医薬品などの合成において大変重要であり、

この目的にかなう生体触媒として、加水分解酵素、酸化還元酵素、アルドラーゼや脱炭酸酵素を用いた様々な反応が開発されてきている。実際に生体触媒を用いた不斉合成が工業化され多くの化学製品で用いられ、特に安価なパン酵母やリパーゼによる高純度の光学活性体合成プロセスは、医薬品や食品などの分野に大きく貢献している。⁷⁾⁻⁹⁾

最近では、酵素反応に対して添加剤を加える、⁸⁾ 水-有機溶媒の二相系反応にする、^{8),10)} また固定化酵素を用いる⁸⁾ などの様々な工夫がなされた収率や不斉収率の向上した例が数多く報告されてきている。

1.3 イオン液体^{11),12)}

イオン液体とは一般的に次のような性質を持つ融点が 100℃または 150℃以下（確定していない）の塩を総称して呼んでいる。

- ・ 蒸気圧がほとんどゼロ
- ・ 難燃性
- ・ 分解電圧が大きい（電解質溶液として有効）
- ・ イオン性であるが低粘性であり、幅広い温度領域で液体
- ・ 比熱容量が高い（熱伝導媒体として利用可能）

このような性質を持つイオン液体は新しい物質ではなく、1914 年に融点 12℃の $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ が初めて報告されている。¹³⁾ その後、1992 年に空気にさらしても安定で、室温でも溶解している塩が報告された¹⁴⁾ のを契機に、「グリーン・サステイナブルケミストリー」の考え方に基づいて存在が世界中の科学者に急

速に広がっていき、現在では化学、電気、自動車産業などの分野へと急速に用途を拡大している。

イオン液体の主な用途の 1 つに化学反応の媒体（溶剤）として用いることが挙げられる。次に挙げる理由からイオン液体を溶剤に用いた化学反応が盛んに研究されている。^{15), 16)}

- ・ 蒸気圧がほとんどないため、大気中に拡散する心配がなく、容易に回収可能で再利用可能である
- ・ 各種の有機、無機化合物を容易に溶解する
- ・ ジメチルホルムアミド（DMF）やジメチルスルホキシド（DMSO）などの非プロトン性極性溶媒と同等の極性を有している
- ・ 広い温度範囲にわたって熱的に安定であるイオン液体が数多く存在する。
そのために様々な温度での化学反応が行える
- ・ 一部のイオン液体を除けば酸やアルカリに対して安定である

1.4 酵素を利用したイオン液体反応場の構築^{11), 12)}

酵素反応の反応媒体として水が常識だが、最近では有機溶媒中で酵素が活性を示す例が多く報告されるようになってきた。^{8), 17)} リパーゼは、十分に水が存在する環境ではエステルの加水分解反応を触媒するが、疎水性環境では逆反応であるエステル交換反応を触媒する。すなわち、酵素反応といえども反応媒体の選択による反応制御が可能である。

また、生体触媒反応の利点の 1 つとして水溶媒中での反応であるため環境に優しいと考えられている。しかし、反応溶媒である水と生成物である有機化合物の分離や反応処理の過程で出てくる有機溶媒を含んだ廃水の無害化処理に苦

劣する。このため有機溶媒を用いる酵素系が開発され、処理を簡単にする解決法が行われている。

有機溶媒を用いたときの利点を述べたが、欠点もある。有機溶媒を用いることで酵素の活性が低下することが報告されており、¹⁸⁾ さらに、反応に有機溶媒を用いるため、大気汚染や火災といった心配もある。

溶媒にイオン液体を用いることでこれらの問題点を克服できると期待できる。イオン液体は有機溶媒との分離の切れがよく、反応生成物の抽出操作が容易になり、再利用可能や新規な反応場などを構築できると考えられている。さらに、イオン液体を用いることで酵素の活性が有機溶媒と比べて同等もしくは上がったという報告もある。^{19), 20)} 環境面では、イオン液体の蒸気圧がほとんどなく難燃性という性質から環境に優しいといえる。

イオン液体中での生体触媒の例としては、*Rhodococcus* という菌体を利用したニトリルからアミドへの変換反応が試みられた (Fig. 1)。²¹⁾ この反応は、トルエン - 水の二相系で行うと菌がダメージを受けて徐々に失活するが、イオン液体の場合は失活せず反応は進行する。

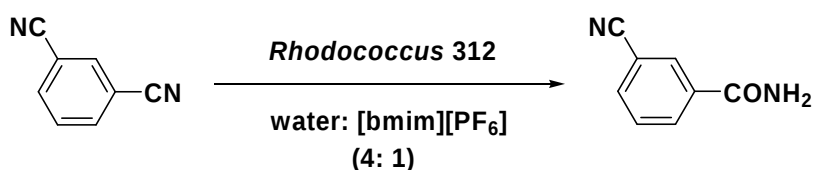


Fig. 1 ニトリルからアミドへの生体触媒による変換

厳密な意味では、上記の反応場はイオン液体だけでなく水 - イオン液体の二相系である。

イオン液体のみを溶媒として用いた初めての生体触媒反応は、リパーゼ (CAL-B) を触媒とするアミド化反応である (Fig. 2)。²⁰⁾ この反応においては基質としてオクタン酸とアンモニアが使われている。さらに、リパーゼ (CAL-B) は過酸化水素が存在するとオクタン酸を酸化し、過オクタン酸が生成することを利用してシクロヘキセンのエポキシ化が進行することも見出されている。

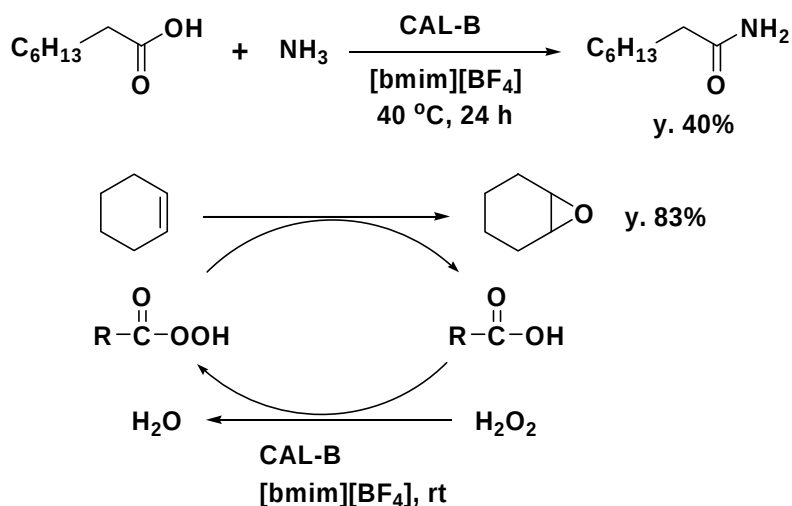


Fig. 2 イオン液体のみを溶媒に用いた酵素反応

また、生体触媒反応の最大の特徴はその高い不斉認識を生かした不斉反応であり、イオン液体を溶媒として用いた光学分割は、これまで数多く知られている。^{16), 22)}

抗体酵素の機能もイオン液体中で発現させることができることが当研究室から報告されている (Fig. 3)。²³⁾ この種の反応場においては、アルドール反応が進行するが、ヒドロキシアセトンのみが基質として有効であり、反応基質であるアルデヒド類にも制約がかかっている。

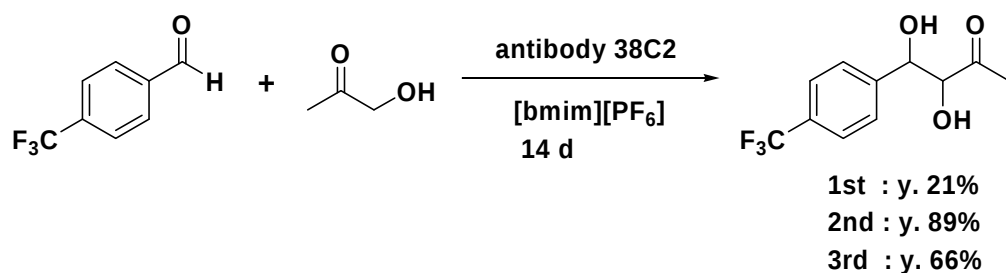


Fig. 3 イオン液体中での抗体触媒反応

1.5 *Geotrichum candidum* を用いた不斉反応^{12), 24)}

キラル化合物は有機合成の有用な合成中間体として用いられている。^{9), 25)} その中で、光学活性二級アルコール類は医薬品、香料、液晶などの有用な合成中間体として知られている (Fig. 4)。たとえば、一番初めのヒドロキシエステルは相当するケトエステルを還元して得られている。真ん中の化合物は、始めの

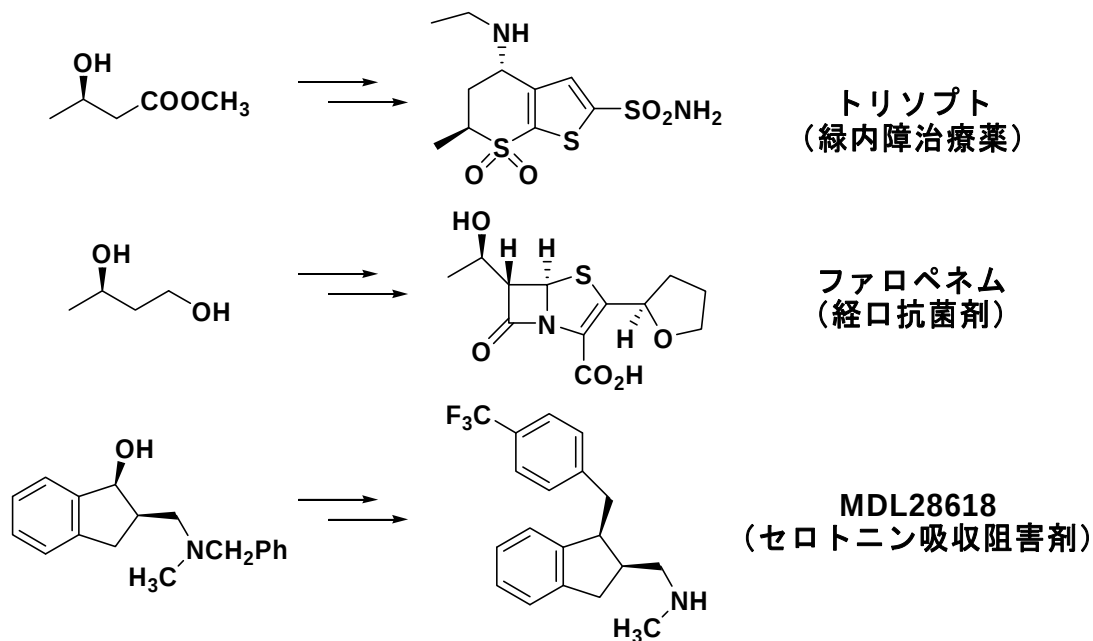


Fig. 4 光学活性二級アルコール類の有用性

ヒドロキシエステルを還元することによって得られている。さらに、三番目の化合物は光学分割をして得られている。このように光学活性二級アルコール類は有用な合成中間体であり、簡便で工業的な合成法の開発は重要な課題である。

また、アルコールの酸化、ケトンやアルデヒドの還元を行う酸化還元酵素は、有機合成化学上非常に有用であるため、酸化還元酵素を用いた合成反応の開発が行われており、その中の一部として *Geotrichum candidum* (チチカビ、ミルク腐敗菌) の NBRC 4597 株や NBRC 5767 株を用いた方法が知られている。

G. candidum は白色の糸状菌で、牛乳や乳製品、製紙、でんぷん工場などの廃水に発生し、これらの *G. candidum* は増殖しやすいため、容易に培養が可能である。また、非天然基質のケトンに対しても還元活性が非常に高いために、有機合成に適しているが、休止菌体中では多くの酵素が働いているため、生成物の不斉収率は低いことが多い。そこで 1 つの酵素だけが活性を示すように立体制御すれば、高い不斉収率で生成物が得られることで、幅広い基質を立体選択的に還元することができることが報告されている。²⁶⁾⁻²⁹⁾ また、条件検討し *G. candidum* に含まれる酵素を活かすことによって、ラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化や、^{26), 27)} デラセミ化なども^{27), 30), 31)} できることが見出されている (Fig. 5)。

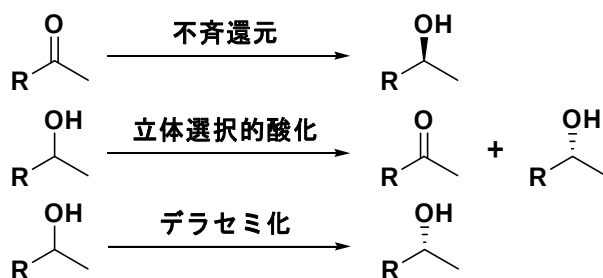


Fig. 5 *G. candidum* を用いた不斉反応

ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応の反応機構は次の通りである (Fig. 6)。 *G. candidum* の休止菌体とラセミ体二級アルコールを水中で混ぜると *S* 体のアルコールのみがケトンに酸化される。生成したケトンは *R* 体および *S* 体の両方のアルコールへと還元されるので、*S* 体のアルコールはケトンを経て *R* 体のアルコールへと変換されるが、*R* 体のアルコールは酸化されないため、結果として *R* 体のみが系中に残ることになる。 *G. candidum* NBRC 4597 を用いた場合には、*R* 体への還元活性が十分ではないため、このようなサイクルはまわらないが、*G. candidum* NBRC 5767 を用いると、*R* 体のアルコールのみが系中に残ることが報告されている。しかし、この反応系では基質に芳香族系や β -ヒドロキシケトンにしか適用できない。脂肪族には適用範囲が限定されている。

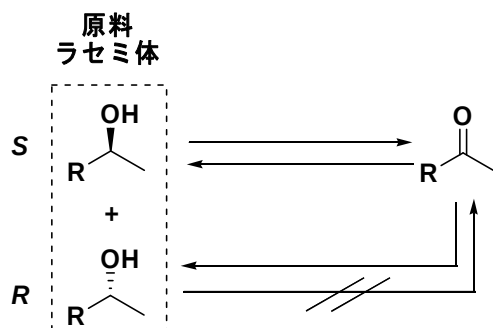


Fig. 6 ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化の反応機構

一般的に菌体による反応では、補酵素を添加する必要がないが、菌体の保存が困難、培養に時間がかかるといったデメリットがある。以上のことを改善するため、菌体をアセトンで脱水する方法が考案されている。この方法により作成された菌体をアセトンパウダーと呼ぶ。また、補酵素の添加が必要であるが、アセトンにより細胞壁が壊され、休止菌体よりも活性が高くなるといわれている。

る。その1つの例として、*G. candidum* NBRC 5767 のアセトン乾燥菌体 (APG5) を用い、補酵素として NAD^+ ，還元剤として 2-プロパノール，溶剤としてイオン液体を用いたカルボニル基の不斉還元反応が報告されている (Fig. 7)。³²⁾

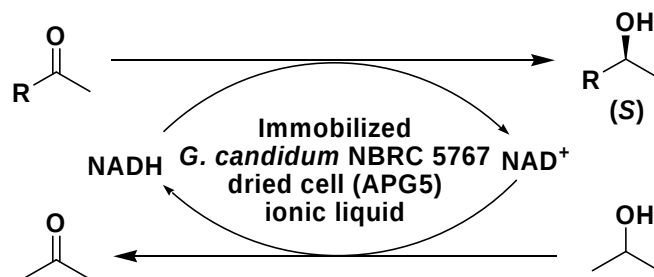


Fig. 7 イオン液体を反応溶媒に用いた *G. candidum* によるケトンの不斉還元

一般的な光学活性二級アルコール類の合成法には (1) プロキラルなケトンからの不斉還元、(2) ラセミ体二級アルコール類の光学分割、(3) ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応の 3 つがある。ラセミ体二級アルコール類から光学活性二級アルコール類を得るとき、光学分割が一般的に用いられるが、理論的に最大 50%の収率までしか望みの光学活性二級アルコール類を得ることができなく、残りは廃棄するか他の用途に使用することになる。資源を有効活用するためにもラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応が使用できれば、理論的に最大 100%の収率で光学活性アルコール類を得ることができる。ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応はこれまでにいくつか報告例はあるが、基質の適用範囲が狭いことが課題であった。幅広い基質に適用できるラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応に適した反応場を、イオン液体を用いることによって構築することを目指した。

1.6 フッ素の性質と天然有機フッ素化合物

有機フッ素化合物は、ガス・溶剤，樹脂，塗料，表面改質剤，光ファイバー，液晶モニター，医薬品，農薬など幅広く利用され、私たちの生活に密着している。³³⁾⁻³⁶⁾ これらのフッ素化合物は、ほとんど人工的に作られたものであり、中には環境に重い負荷をかけている化学合成プロセスを踏んだものも存在している。

その一方で、天然に存在する有機フッ素化合物で我々の生活に役立っているものはほとんどない。フッ素は地殻中で 13 番目（クラーク数では 17 番目）に豊富な元素であるが、有機フッ素化合物になると自然界には 13 種類ほどしか知られていない。³⁷⁾ それらのほとんどは代謝による生成過程も不明であり、主に熱帯植物の毒性成分として報告されている。

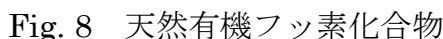
有機フッ素化合物の性質を知るにはフッ素原子の特徴を知ることが重要である。^{38), 39)}

フッ素原子の特徴として、全元素中で最大の電気陰性度を有していることが挙げられる。これにより、多くの場合強い電子吸引性の置換基効果を発揮する。この電気陰性度の大きさが C-F 結合間の様々な性質、さらには有機フッ素化合物の性質に起因する。

次に、その立体的な小ささが挙げられる。フッ素は立体的には水素について小さな原子で van der Waals 半径 (Bondi) は水素の 1.22 倍（塩素は 1.46 倍）、C-F 結合距離は C-H 結合の 1.28 倍（塩素は 1.62 倍）であり、水素部位へのフッ素導入による分子立体的変化は全原子中で最小である。そのため、ある有機分子中の一分子の水素をフッ素で置換しても分子全体の立体的大きさの変化はわずかであり、生体はもとの分子と区別することなく取り込むことがある（ミ

また、C-F 結合の結合エネルギー (485kJ/mol) は C-Cl 結合 (339kJ/mol)、C-H 結合 (414kJ/mol) や C-O 結合 (359kJ/mol) のそれに比べて格段に大きい。これが多くの有機フッ素化合物が非常に反応性の低い要因となっている。

天然には塩素や臭素などフッ素以外のハロゲンを有する有機化合物が約 3500 種も見出されているのに対して、有機フッ素化合物は現在のところ 13 種しかない。このうち 8 つは同種の植物に見出された末端炭素にフッ素を有する一種の長鎖の脂肪酸であるので構造的なバリエーションとしては 6 種となる (Fig. 8)。



18

フルオロアセチル-CoA とオキサロ酢酸の縮合により作られ、多くのフルオロ酢酸を蓄積する植物から報告例がある。 ω -フルオロ脂肪酸は西アフリカの灌木 *Dichapetalum toxicarium* で見られ、FAc から脂肪酸合成によって得られている。フルオロオレイン酸、フルオロパルミチン酸など 8 種類の存在が確認されている。また *Acacia georginae* からはフルオロアセトンの存在が示唆されている。

微生物からは、抗生物質ヌクレオシジンが放線菌 *Streptomyces calvus* から報告されているが、再現性が取れないなどの理由から構造情報も確定性が低く研究が進んでいない。また、同じ放線菌 *Streptomyces cattleya* (*S. cattleya*) からは FAc と 4-フルオロスレオニン (4-FT) が単離されている。⁴⁰⁾ この *S. cattleya* の代謝系の解明は他の生物に比べて進んでおり、特に最近、O' Hagan らはフッ素化酵素 (5'-fluoro-5'-deoxyadenosine synthase) が存在することを発表し、天然有機フッ素化合物の生合成経路の解明や生物学的な手法による有機フッ素化合物の合成などの観点から注目されている。⁴¹⁾ この酵素をフルオリナーゼと呼ぶ。

1.7 フルオリナーゼ⁴²⁾

このフッ素化酵素の存在が確認された *S. cattleya* おけるフッ素化合物の代謝系について詳細を述べていきたい (Fig. 9)。

1986 年に β -ラクタム系抗生物質チエナマイシンを生産することで知られていた放線菌 *S. cattleya* が無機フッ素化合物を細胞内に取り込んで 2 つの有機フッ素化合物モノフルオロアセタート (FAc) とモノフルオロスレオニン (4-FT) を作り出すことが報告された。⁴⁰⁾ 発見当初はこの反応がどのようなプロセス

を經由するか不明で、O'Hagan のグループにより反応の検討が行われ、⁴³⁾ 放射ラベルによる反応機構の解明により FAc, 4-FT は前駆体としてフルオロアセトアルデヒドを經由することが示された。⁴⁴⁾ また、この 2 つの化合物はフルオロアセトアルデヒドより別々の系で生成されることも判明している。^{45), 46)}

そして、2002 年にこの反応系の最初のコッ素化を受ける基質が *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) であることが分り、5'位の炭素にコッ素を導入する反応を触媒する酵素 (フルオリナーゼ) により 5'-フルオロ-5'-デオキシアデノシン (5'-FDA) が生成されることが解明された。⁴¹⁾

その後、2003 年にフルオリナーゼの単離精製、⁴⁷⁾ 2004 年にはフルオリナーゼ遺伝子のクローニングとタンパク質の結晶化がなされ、X 線結晶構造解析による三次元構造と反応機構が報告された。⁴⁸⁾ さらに反応系の解明は進められ、この 5'-FDA から 5-フルオロ-5-デオキシ-D-リボース-1-リン酸への代謝後、⁴⁹⁾ 5-フルオロ-5-デオキシ-D-リブローース-1-リン酸を經由して、⁵⁰⁾ フルオロアセトアルデヒドが作られ、⁴⁴⁾ FAc や ⁴⁵⁾ 4-FT が生成されるものと考えられている。⁴⁶⁾

このように *S. cattleya* 内でのコッ素化反応はほとんど解明されつつあるといえる。これら一連の反応過程は、有機コッ素化合物の代謝という観念から非常に興味深いものであるが、特に注目に値するのは最初のコッ化物イオンを炭素に導入するコッ素化反応である。このようなコッ素化酵素の報告例はこれまでにないため、これを物質生産プロセスのための新しい生体触媒として用いることができれば、有機コッ素化合物の生合成を行うことができるのではないかと期待できる。

最初に結合してしまうとフッ化物イオンは入り込めなくなるため、反応は進行しないと考えられている。

このフルオリナーゼ反応機構は、5'位の炭素に対してフッ化物イオンが求核的に作用し、メチオニンが脱離する S_N2 反応であることが結晶構造解析および放射ラベルによる研究により明らかにされた。⁵¹⁾

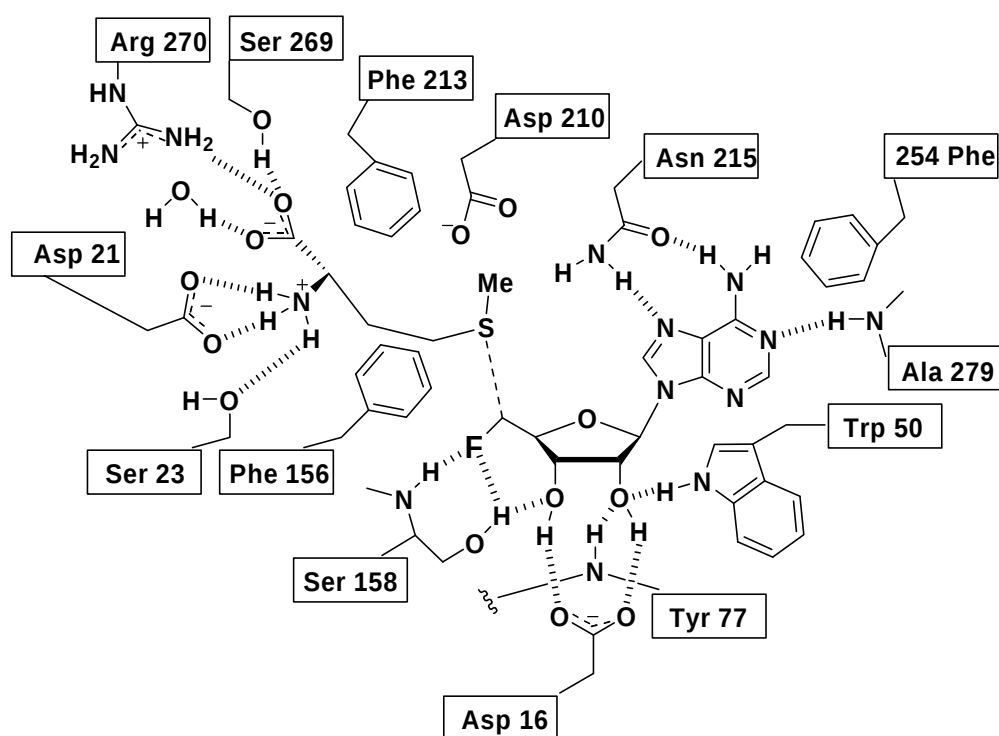


Fig. 10 フルオリナーゼの基質結合部位

これまで工業的な有機フッ素化合物生産におけるフッ素導入は化学合成により行われてきたが、その工程でフッ素化合物が持つ毒性や高温・高圧などの危険な条件を要するといった問題点を抱えている。化学合成法に替わる有機フッ素化合物生産法として、生物の機能を利用できれば、問題点を解決できるはずである。さらに酵素の特徴の 1 つである基質特異性により光学活性含フッ素化

化合物の調製など酵素ならではの長所を活かしたもののづくりが期待できる。

そのような目的から、*S. cattleya* 由来のフッ素化酵素（フルオリナーゼ）を用いてフッ素化合物の合成法の構築を試みることにした。フルオリナーゼの欠点として、SAM から 5'-FDA への変換効率が低く安定性に欠けることが挙げられることから、イオン液体を用いて変換効率の向上を試みた。

1.8 本論文の概要と構成

イオン液体と酵素との組み合わせで構築できる反応場について研究を行った。本論文は五章から成り立っており、以下にその概略を述べる。

第一章では、研究の背景とその意義・目的について述べた。

第二章では、簡便で基質の適用範囲が広いラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応を開発する目的で、*G. candidum* NBRC 5767 を用いたラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応を試みた。デラセミ化反応を進行させるためには、還元反応と立体選択的酸化反応が同時に進む必要がある。そのため、ラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応が進行するか確かめた。吸水性ポリマーに固定化した *G. candidum* NBRC 5767 の乾燥菌体 (APG5) を用いた方法と、固定化した休止菌体を用いた方法について述べている。

第三章ではラセミ体二級アルコール類の *R* 体アルコールへのデラセミ化反応の検討について述べた。まず、*G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体に含まれる酵素を条件検討によってコントロールすることでデラセミ化を進行させることを試みた。次に、ケトンからラセミ体アルコールへの還元を起こすため化学還元剤を加えた検討を行った。最後にケトンから *R* 体アルコールへの還元を進める酵素を加えた手法について述べている。

第四章ではフッ素化酵素フルオリナーゼの反応性向上におけるイオン液体の有用性について叙述している。固定化した酵素を用い、様々なイオン液体で検討した。

第五章では、研究の総括と今後の展望について述べた。

第二章 *Geotrichum candidum* を用いたラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応

2.1 はじめに

イオン液体反応場における有機反応の研究は盛んに行われ、多くの報告がなされており、イオン液体反応場における生体触媒反応も、生体触媒の有するエナンチオ選択性、位置選択性、官能基選択性などの厳密な選択性といった特徴が注目され最近盛んに行われ始めた。^{11), 12), 16), 22)}

キラルな化合物は有機合成の有用な合成中間体として用いられ、化学試薬または生体触媒を用いた方法で製造されている。²⁵⁾ その中で、光学活性二級アルコール類は医薬品、香料、液晶などの有用な合成中間体として使用され、一般的な光学活性二級アルコール類の合成法には (1) プロキラルなケトンからの不斉還元、(2) ラセミ体二級アルコール類の光学分割、(3) ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応の 3 つがある (Fig. 11)。^{27), 52)-56)} プロキラルなケトンを原料とする場合、不斉還元を用いれば理論的には 100%の収率で光学活性二級アルコール類を得られる。しかし、ラセミ体二級アルコール類から光学活性二級アルコール類を得るとき、光学分割が一般的に用いられることが多い。この場合、理論的に最大 50%の収率までしか望みの光学活性二級アルコール類を得ることができなく、残りは廃棄するか他の用途に使用することになる。資源を有効活用するためにもラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応が使用できれば、理論的に最大 100%の収率で光学活性アルコール類を得ることができる。ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応はこれまでにいくつか報告さ

れている。^{30), 31), 57)- 65)} しかし、限られた基質にしか適用できていなかった。

最近 *S* 体の光学活性二級アルコール類を得るための幅広い基質に適用できるラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応の手法が報告されている。⁶⁶⁾

当研究では *R* 体の光学活性アルコールを得るための幅広い基質に適用できるラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応に適した簡便な反応系の構築に取り組んだ。

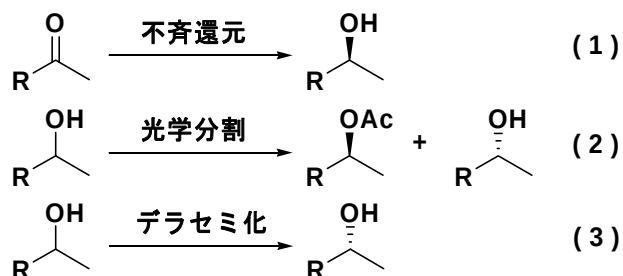


Fig. 11 光学活性二級アルコール類の合成法

2.2 固定化アセトン乾燥菌体を用いた立体選択的酸化反応

簡便で基質の適用範囲が広いデラセミ化反応を開発する目的で、最初はイオン液体中での立体選択的酸化反応を試みた。立体選択的酸化が起これば酸化と還元を繰り返すことでデラセミ化が可能になる。^{30), 31)}

イオン液体中で *G. candidum* NBRC 5767 のアセトン乾燥菌体（以後 APG5 と略す）を用いたケトンの不斉還元において吸水性ポリマー（BL-100）で固定化することで酵素が安定化し、生成物である *S* 体のアルコールの収率が向上することが報告されている。³²⁾ そこで、報告された文献の逆反応であるラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応について検討を行った (Fig. 12)。文献に従い *G. candidum* NBRC 5767 の乾燥菌体を用い、ポリマーで固定化し、

イオン液体中で反応を試みた。固定化乾燥菌体は APG5 (39 mg) と補酵素 NAD^+ (6.5 mg) を水 (1.3 mL) に溶かし、酸化剤シクロヘキサノン (65 μL) と吸水性ポリマー BL-100 (195 mg) を加えスパチュラでかき混ぜて作成した。次に、固定化乾燥菌体 (1.0 g) を試験管に入れ、溶媒として $[\text{emim}][\text{BF}_4]$ (2 mL) を加えた後、基質(±)-1-フェニルエタノール (0.041 mmol) を加え、 30°C で 24 時間攪拌した。生成物をエーテル (5 mL x 4) で抽出した後、内部標準としてドデカン (20 μL , 7.93×10^{-5} mol) を用いて、GC で検出した結果、*R* 体の 1-フェニルエタノールを収率 47% (90% ee)、酸化体のアセトフェノンを 50% で得られた (Fig. 13)。この結果、*G. candidum* NBRC 4597 の固定化休止菌体をヘキサン中で用いて行った報告例と同様に *S* 体のみが酸化されて *R* 体のアルコールが得られることが分かった。^{26), 27)} なお、光学活性体の保持時間は標準サンプルと比較して確認した。

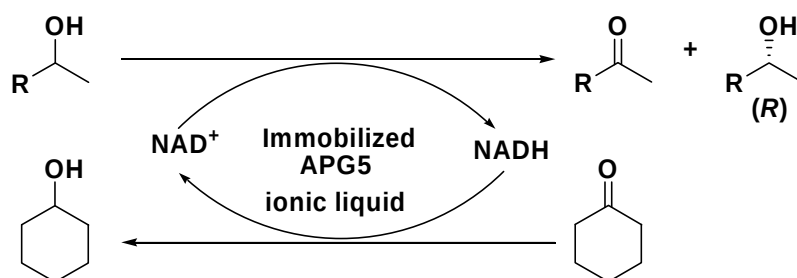


Fig. 12 イオン液体反応場で固定化乾燥菌体を用いた立体選択的酸化反応

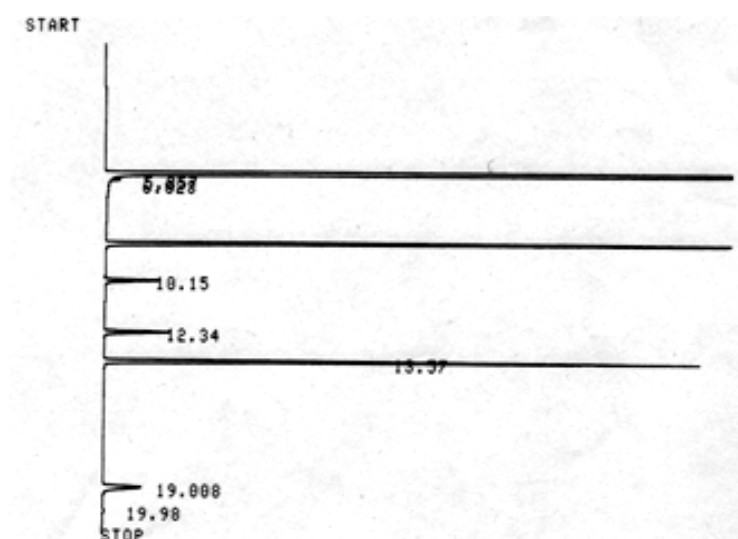
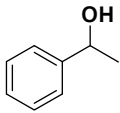


Fig. 13 上記の反応における GC の検出結果(保持時間: *R* 体アルコール 19.008 分, *S* 体アルコール 19.98 分, ドデカン 13.57 分)

次にイオン液体の検討を行った (Table 1)。残念ながら最高でも 90% という光学純度であった。アニオン部位が BF_4^- の場合に高い光学純度が得られ、その中で最も高い光学純度のアルコールが得られた $[\text{emim}][\text{BF}_4]$ を溶媒として検討することにした。また時間変化における光学純度の変化について調べたところ、48 時間反応させると 97% ee まで光学純度が向上した。

Table 1. 固定化乾燥菌体を用いた(±)-1-フェニルアルコールの立体選択的酸化反応におけるイオン液体の検討と時間変化

Substrate ^a	Ionic liquid	Reaction time (h)	Yield of ketone ^b (%)	Yield of alcohol ^b (%)	%ee of substrate (<i>R</i>)-alcohol ^{b, c}
	$[\text{emim}][\text{BF}_4]$	16	44	50	85
		24	47	50	90
		48	50	47	97
	$[\text{bmim}][\text{PF}_6]$	24	32	69	48
	$[\text{bmim}][\text{TFSA}]$	24	21	61	38
	$[\text{emim}][\text{OTf}]$	24	3	97	3
	$[\text{DEME}][\text{BF}_4]$	24	47	54	83
	$[\text{DEME}][\text{TFSA}]$	24	33	53	67

Reaction conditions: 30 °C; racemic alcohol: 0.041 mmol, ionic liquid: 2 mL, immobilized cell: 1.0 g (immobilized cell was prepared from dried cell: 39 mg, NAD^+ : 6.5 mg, H_2O : 1.3 mL, cyclohexanone: 65 μL and water-absorbing polymer: 195 mg).

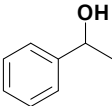
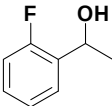
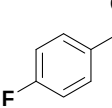
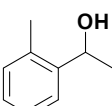
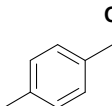
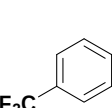
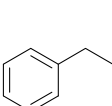
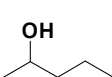
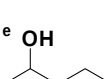
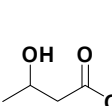
^a Racemic mixture

^b Determined by GC analyses.

^c The absolute configuration was determined to *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of authentic samples prepared in the literature methods.⁶⁷⁾

そして、基質特異性について検討を行ったが、いずれの基質でも期待する光学純度のアルコールを得ることができなかった (Table 2)。芳香族化合物の場合、ベンゼン核上に置換基があると、得られるアルコールの光学純度が低くなった。ベンゼン環から少し離れているアルコールである(±)-4-フェニル-2-ブタノールや、脂肪族の(±)-2-ウンデカノールでは(±)-1-フェニルエタノールと比べてほぼ同じ光学純度のアルコールが得られたが、不飽和化合物の(±)-スルカトール (6-メチル-5-ヘプテン-2-オール)、また β -ヒドロキシエステルの(±)-3-ヒドロキシブタン酸 *t*-ブチルでは反応性が低かった。

Table 2. イオン液体反応場における固定化乾燥菌体を用いたラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応の基質特異性

Substrate ^a	Reaction Time (h)	Yield of ketone ^b (%)	Yield of alcohol ^b (%)	%ee of substrate (<i>R</i>)-alcohol ^{b, c}
	24	47	50	90
	24	17	80	23
	24	24	88	27
	24	10	87	11
	24	41	57	69
	24	18	85	22
	24	53	46	87
	24	41	48	84 ^d
^e 	24	41	57	62
	24	9	83	13

Reaction conditions: 30 °C; racemic alcohol: 0.041 mmol, ionic liquid: 2 mL, immobilized cell: 1.0 g (immobilized cell was prepared from dried cell: 39 mg, NAD⁺: 6.5 mg, H₂O: 1.3 mL, cyclohexanone: 65 μL and water-absorbing polymer: 195 mg).

^a Racemic mixture

^b Determined by GC analyses.

^c The absolute configuration was determined to *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of authentic samples prepared in the literature methods.^{28), 67)}

^d Determined by GC analyses after acetylation of remaining alcohol.

^e Cycloheptanone was used instead of cyclohexanone.

2.3 固定化休止菌体を用いた立体選択的酸化反応

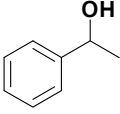
前項の結果から固定化乾燥菌体を用いたラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応は反応性の低さに課題が見出された。その理由は、乾燥菌体に含まれるアセトンによる影響や、細胞壁を壊したことでイオン液体の影響を強く受けたためと考えた。また、工業化した場合、乾燥菌体を作るためのアセトンによる環境への影響は無視できない。さらに、高価な試薬である補酵素 NAD^+ を加える必要もあるので実用的とはいえない。そこで、グリーンケミストリーの観点から菌体を培養し集菌した直後の休止菌体を用いることにした。休止菌体を用いることでアセトンによる様々な影響やイオン液体による酵素への影響を取り除くことができ、さらに培養し集菌した直後なので酵素活性が良い状態で反応が進行すると考えられる。また、休止菌体の中に補酵素が含まれているため NAD^+ を加える必要がない。

培養方法は、3% (wt/mol) グリセロール (15 g) と 1% (wt/mol) 酵母エキス (5 g) と 0.5% (wt/mol) ポリペプトン (2.5 g) を水 (500 mL) に溶かし、11.2% (wt/mol) KH_2PO_4 (5.59 g) と 3.1% (wt/vol) K_2HPO_4 (1.56 g) を加えて培地を作成し、滅菌した後、最初に試験管で少量培養を行い、次に坂口フラスコで大量培養し集菌した。その後、集菌した休止菌体 (0.25 g) を水 (1.5 mL) で懸濁し、シクロヘキサノン (25 μL) とポリマー (0.25 g) を加え固定化し、固定化菌体 (1.5 g) を試験管に入れ、[emim][BF_4] (3 mL) と基質 (0.041 mmol) を加え攪拌して反応を行った。実行可能性を確かめるため(±)-1-フェニルエタノールで 30°C, 24 時間攪拌したところ、*R* 体の 1-フェニルエタノールを収率 49% (97% ee)、酸化体のアセトフェノンを 52% で得られた (Table 3)。

また、イオン液体を変えて反応を行っていても、ほぼ目的どおりの収率で期

待する光学純度のアルコールを得ることができた。 $[\text{emim}][\text{BF}_4]$ 、 $[\text{bmim}][\text{PF}_6]$ 、 $[\text{DEME}][\text{BF}_4]$ 、 $[\text{DEME}][\text{TFSA}]$ で高い反応性が見られ、非常に高い光学純度で *R* 体のアルコールを得られた。その中で、高い収率でアルコールを得られ粘性が小さく扱いやすかった $[\text{emim}][\text{BF}_4]$ を用いて検討を進めることにした。また、これまでのイオン液体中での酵素反応でも見られた傾向として、 $[\text{emim}][\text{OTf}]$ はアニオン部位がスルホン酸系であるため酵素を阻害すると示唆され、そのため反応が進行しないと考えられる。³²⁾

Table 3. 固定化休止菌体を用いた(±)-1-フェニルアルコールの立体選択的酸化反応におけるイオン液体の検討

Substrate ^a	Ionic liquid	Reaction Time (h)	Yield of ketone ^b (%)	Yield of alcohol ^b (%)	%ee of substrate (<i>R</i>)-alcohol ^{b, c}
	$[\text{emim}][\text{BF}_4]$	24	52	49	97
	$[\text{bmim}][\text{PF}_6]$	24	43	52	97
	$[\text{emim}][\text{OTf}]$	24	8	91	7
	$[\text{DEME}][\text{BF}_4]$	24	49	49	94
	$[\text{DEME}][\text{TFSA}]$	24	32	42	98

Reaction conditions: 30°C; racemic alcohol: 0.041 mmol, ionic liquid: 3 mL, immobilized cell: 1.5 g (immobilized cell was prepared from wet cell: 0.25 g, H₂O: 1.5 mL, cyclohexanone: 25 μ L and water-absorbing polymer: 0.25 g).

^a Racemic mixture.

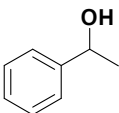
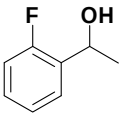
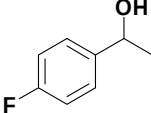
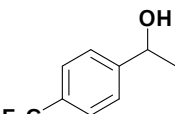
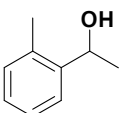
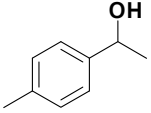
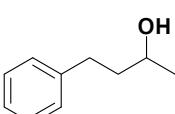
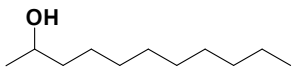
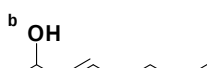
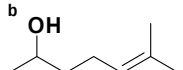
^b Determined by GC analyses.

^c The absolute configuration was determined to *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of authentic samples prepared in the literature methods.⁶⁷⁾

そして、基質特異性について検討をした (Table 4)。ほとんどの基質で反応性良く立体選択的酸化反応が進行した。しかし、芳香族化合物ではオルト位に置換基を有する場合や、電子吸引基を有する場合は望む光学純度のアルコールが得られないことが分かった。例外的にパラ位にフッ素基を有する化合物に限っては、反応時間を延ばすことによって、期待する光学純度に近いアルコールを得ることができた。また、ベンゼン環から少し離れている化合物として(±)-4-フェニル-2-ブタノールを試みたところ高い光学純度で(*R*)-4-フェニル-2-ブタノ

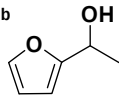
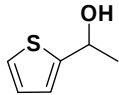
ールが得られた。また、脂肪族化合物として(±)-ウンデカノールを反応させても非常に高い光学純度で(*R*)-ウンデカノールを得ることができた。さらに、脂肪

Table 4. 固定化休止菌体を用いた基質特異性

Substrate ^a	Reaction time (h)	Yield of ketone ^c (%)	Yield of alcohol ^c (%)	%ee of substrate (<i>R</i>)-alcohol ^{c, d}
	24	52	49	97
	24 48	32 40	60 62	56 64
	24 192	38 46	60 49	65 89
	24	26	72	37
	24 48	35 40	64 64	48 62
	24	52	48	94
	24	51	42	95
	24	43	39	97 ^e
^b 	24	41	48	97
^b 	24	30	67	41

族の不飽和化合物として(±)-(E)-3-オクテン-2-オールと(±)-スルカトールを試みた。(±)-(E)-3-オクテン-2-オールは反応性が非常に良く、非常に高い光学純度で(R)-(E)-3-オクテン-2-オールを得られたが、(±)-スルカトールは反応性が低かった。複素環化合物は反応性が高かった。したがって、この手法は幅広い基質に対し適用できる光学活性二級アルコール類を得るための有用な光学分割法であるといえる。これまで報告されている *G. candidum* を用いたラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応²⁶⁾ は *G. candidum* NBRC 4597 を用いているため、今回用いた *G. candidum* NBRC 5767 には *G. candidum* NBRC 4597 では適用できない基質（脂肪族化合物）にも適用できる酵素が含まれていると考えられる。

Table 4. 固定化休止菌体を用いた基質特異性（続き）

Substrate ^a	Reaction time (h)	Yield of ketone ^c (%)	Yield of alcohol ^c (%)	%ee of substrate (R)-alcohol ^{c, d}
	24	42	55	81
	24	39	46	>99

Reaction conditions: 30°C; racemic alcohol: 0.041 mmol, ionic liquid: 3 mL, immobilized cell: 1.5 g (immobilized cell was prepared from wet cell: 0.25 g, H₂O: 1.5 mL, cyclohexanone: 0.025 mL and water-absorbing polymer: 250 mg).

^a Racemic mixture.

^b Cycloheptanone was used instead of cyclohexanone.

^c Determined by GC analyses.

^d The absolute configuration was determined to R for all samples examined by comparing the GC retention times with those of authentic samples prepared in the literature methods.^{28), 67)- 69)}

^e Determined by GC analyses after acetylation of remaining alcohol.

2.4 第二章のまとめ

簡便で適用範囲の広いラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応を開発する目的で、まずはラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応を試みた。ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応を進行させるには、酸化と還元が系中で同時に起こる必要がある。イオン液体中で、吸水性ポリマー (BL-100) で固定化した *G. candidum* NBRC 5767 のアセトン乾燥菌体がケトンの *S* 体アルコールへの還元を進行することが報告されているため、その文献を参考に逆反応である立体選択的酸化反応を検討した。始めに、固定化乾燥菌体を用いて検討したが、期待する光学純度のアルコールを得ることはできなかった。そこで固定化した休止菌体を用いて立体選択的酸化反応を試みた結果、期待する光学純度のアルコールが得られ、幅広い基質に適用できることを明らかにした。

2.5 Experimental for Chapter 2

Instruments. Gas chromatographic analyses were performed using a Shimadzu GC-12A or GC-12B gas chromatograph with a Shimadzu C-R6A or C-R8A Chromatopac equipped with chiral GC-columns (CP-Chirasil-DEX CB; 50 m (DEX), CP-Cyclodextrin-B-2,3,6-M-19; 25 m (CPCD)). ^1H -NMR spectra were recorded with Varian Mercury (500 MHz) in CDCl_3 and the chemical shifts are expressed in δ (ppm) values with tetramethylsilane as an internal standard. Abbreviations of ^1H -NMR signal patterns are as follows: s, singlet; d, doublet; dd, double doublet; dt, double triplet.

Chemicals. Organic reagents were purchased from Nacalai Tesque, Inc., Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kanto Chemical Co., Inc., Aldrich Chemical Company, Inc., Across Organics, Merck Ltd., Japan or Tokyo Kasei Kogyo Company, Ltd. unless noted otherwise. BL-100 (water-absorbing polymer), *Geotrichum candidum* NBRC 5767 and the Acetone Powder of *G. candidum* NBRC 5767 (APG5) were kindly supplied by Prof. Matsuda at Tokyo Institute of Technology.

Cultivation of *Geotrichum candidum*. 3% (wt/vol) glycerol (15 g), 1% (wt/vol) yeast extract (5 g), and 0.5% (wt/vol) polypeptone (2.5 g) were mixed with water (500 mL). The medium, adjusted to pH 6.2 with 11.2% (wt/vol) KH_2PO_4 (5.59 g) and 3.1% (wt/vol) K_2HPO_4 (1.56 g), was placed in two 100 mL test tubes (30 mL x 2) and two Sakaguchi flasks (220 mL x 2), sterilized (121 °C,

20 min). Each medium in the two test tubes was inoculated with the stored microbe of *G. candidum* NBRC 5767. Precultivation was carried out for 24 h at 30 °C with shaking at 130 rpm. Each resulting mixture in the two test tubes was poured into the separate Sakaguchi flasks. The cultivation was carried out for 24 h at 30 °C with shaking at 130 rpm. The resulting mixture was filtered to obtain the cells (about 5 g wet weight (wet wt)).

General procedure for the enantioselective oxidation of racemic secondary alcohols with immobilized APG5 (immobilized APG5 condition). BL-100 (195 mg) was added to a suspension of APG5 (39 mg), NAD^+ (6.5 mg), cyclohexanone (65 μL) in water (1.3 mL), stirred with a spatula. A racemic secondary alcohol (0.041 mmol) and the resulting powder (1.0 g) were added in [emim][BF₄] (2 mL). The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract.

Reaction time. Under the immobilized APG5 condition, 16 h, 24 h and 48 h as reaction time was examined. The results are shown in Table 1.

Ioninc liquids. Under the immobilized APG5 condition, each of [bmim][PF₆], [bmim][TFSA], [emim][OTf], [DEME][BF₄] and [DEME][TFSA] was used as ionic liquid instead of [emim][BF₄]. The results are shown in Table 1.

Substrate specificity of immobilized APG5 condition.

(*R*)-1-Phenylethanol: racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-1-Phenylethanol; yield 50% (90%ee), acetophenone; yield 47% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 130 °C).

(*R*)-1-*o*-Fluorophenylethanol: racemic 1-*o*-fluorophenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-1-*o*-Fluorophenylethanol; yield 80% (23%ee), 1-(2-fluorophenyl)ethanone; yield 17% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 110 °C).

(*R*)-1-*p*-Fluorophenylethanol: racemic 1-*p*-fluorophenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-1-*p*-Fluorophenylethanol; yield 88% (27%ee), 1-(4-fluorophenyl)ethanone; yield 24% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 120 °C).

(*R*)-1-*o*-Methylphenylethanol: racemic 1-*o*-methylphenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-1-*o*-Methylphenylethanol; yield 87% (27%ee), 1-(2-methylphenyl)ethanone; yield 10% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 140 °C).

(*R*)-1-*p*-Methylphenylethanol: racemic 1-*p*-methylphenylethanol (0.041

mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-1-*p*-Methylphenylethanol; yield 57% (69%ee), 1-(4-methylphenyl)ethanone; yield 41% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 120 °C).

(*R*)-1-*p*-Trifluoromethylphenylethanol: racemic 1-*p*-trifluoromethylphenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-1-*p*-Trifluoromethylphenylethanol; yield 85% (22%ee), 1-(4-trifluoromethylphenyl)ethanone; yield 18% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 120 °C).

(*R*)-4-Phenyl-2-butanol: racemic 4-phenyl-2-butanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-4-Phenyl-2-butanol; yield 46% (87%ee), 4-phenyl-2-butanone; yield 53% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 150 °C (yield); DEX, 130 °C (ee)).

(*R*)-2-Undecanol: racemic 2-undecanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-2-Undecanol; yield 48% (84%ee), 2-undecanone; yield 41% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 155 °C (yield); CPCD 130 °C (ee) after the product alcohol was acetylated to determine ee by GC analysis).

(*R*)-Sulcatol: racemic sulcatol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. Cycloheptanone was used instead of cyclohexanone.

(*R*)-Sulcatol; yield 57% (62%ee), 6-methyl-5-hepten-2-one; yield 41% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 100 °C (25 min)→10 °C /min→150 °C).

(*R*)-*t*-Butyl 3-hydroxybutanoate: racemic *t*-butyl 3-hydroxybutanoate (0.041 mmol) was subjected to the immobilized APG5 condition. (*R*)-*t*-Butyl 3-hydroxybutanoate; yield 83% (13%ee), *t*-butyl 3-oxobutanoate; yield 9% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 110 °C).

General procedure for the enantioselective oxidation of racemic secondary alcohols with immobilized cell (immobilized cell condition). BL-100 (0.25 g) was added to a suspension of wet cell (0.25 g) and cyclohexanone (25 μ L) in water (1.5 mL), stirred with a spatula. A racemic secondary alcohol (0.041mmol) and the resulting powder (1.5 g) were added in [emim][BF₄] (3 mL). The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract.

Ionic liquids. Under the immobilized cell condition, each of [bmim][PF₆], [emim][OTf], [DEME][BF₄] and [DEMD][TFSA] was used as ionic liquid instead of [emim][BF₄]. The results are shown in Table 3.

Preparation of a racemic secondary alcohol.

Racemic 1-(2-thiophenyl)ethanol:⁷⁰⁾ NaBH₄ (1.949 g, 0.515 mol) was added to 1-(2-thiophenyl)ethanone (4.994 g, 0.0396 mol) in MeOH (130 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred at room temperature for 21 h, quenched with saturated NH₄Cl at 0 °C. The mixture was extracted with diethyl ether, dichloromethane and brine. The organic extracts were washed with brine, dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated. The crude product was purified by distillation (63 °C/3 mmHg), giving a colorless oil (3.048 g, 60%).: TLC R_f=0.30 (Hexane/AcOEt = 4/1); ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.24 (dd, *J*= 4.9, 1.2 Hz, thiophene H-5,1H), 7.01-6.91 (m, thiophene H-3, 4, 2H), 5.14 (dt, *J*= 12.7, 6.4 Hz, -CHCH₃, 1H), 1.97 (d, *J* = 4.6 Hz, OH, 1H), 1.61 (d, *J* = 6.3 Hz, -CHCH₃, 2H), 1.60 (s, -CHCH₃, 1H).

Substrate specificity of immobilized cell condition.

(*R*)-1-Phenylethanol: racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4.

(*R*)-1-*o*-Fluorophenylethanol: racemic 1-*o*-fluorophenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4.

(*R*)-1-*p*-Fluorophenylethanol: racemic 1-*p*-fluorophenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4.

(*R*)-1-*p*-Trifluoromethylphenylethanol: racemic 1-*p*-trifluoromethylphenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4.

(*R*)-1-*o*-Methylphenylethanol: racemic 1-*o*-methylphenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4.

(*R*)-1-*p*-Methylphenylethanol: racemic 1-*p*-Methylphenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4.

(*R*)-4-Phenyl-2-butanol: racemic 4-Phenyl-2-butanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4.

(*R*)-2-Undecanol: racemic 2-undecanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. The results are shown in Table 4. The product alcohol was acetylated to determine ee by GC analysis.

(*R*)-(*E*)-3-Octen-2-ol: racemic (*E*)-3-octen-2-ol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. Cycloheptanone was used instead of cyclohexanone. (*R*)-(*E*)-3-Octen-2-ol; yield 48% (97%ee), (*E*)-3-octen-2-one; yield 41% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 90 °C (36 min)

→10 °C/min→150 °C)).

(*R*)-Sulcatol: racemic sulcatol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. Cycloheptanone was used instead of cyclohexanone. The results are shown in Table 4.

(*R*)-1-(2-Furanyl)ethanol: racemic 1-(2-furanyl)ethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. Cycloheptanone was used instead of cyclohexanone. (*R*)-1-(2-Furanyl)ethanol; yield 55% (81%ee), 1-(2-furanyl)ethanone; yield 18% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 80 °C (24 min)→10 °C/min→150 °C)).

(*R*)-1-(2-Thiophenyl)ethanol: racemic 1-(2-thiophenyl)ethanol (0.041 mmol) was subjected to the immobilized cell condition. (*R*)-1-(2-Thiophenyl)ethanol; yield 46% (>99%ee), 1-(2-thiophenyl)ethanone; yield 39% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 120 °C).

第三章 ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応

3.1 はじめに

これまでの研究成果からイオン液体中で *G. candidum* NBRC 5767 を用いると *S* 体アルコールのみが酸化することが分かった。ところで、*G. candidum* NBRC 5767 には酸化体であるケトンから *S* 体アルコールだけでなく *R* 体アルコールに生成する酵素も含まれていることが知られている。⁷¹⁾ そのため、*S* 体アルコールの酸化とケトンからアルコールへの還元が繰り返されれば、*R* 体アルコールのみが系中に残る (Fig. 6)。^{30), 31)} そこで、ケトンから *R* 体アルコールへ還元する酵素を条件検討により活かすことでデラセミ化反応を達成しようと考えた。そのための方法として、次の 3 つの方法 (1) ケトンの *S* 体アルコールへの還元を阻害、(2) ケトンの *R* 体アルコールへの還元の活性化、(3) *S* 体アルコールのケトンへの酸化の活性化、が知られている。

3.2 ヘキサン溶媒中における検討

まず、菌体による反応性が最も高くなる条件を見つけるために、溶媒や固定化など様々な条件を検討した (Table 5)。基質は(±)-1-フェニルエタノールを用いた。まず文献に従い、³⁰⁾ 試験管に入れた *G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体 (0.50 g) を水 (3 mL) に懸濁させ、基質(±)-1-フェニルエタノール (0.080 mmol) を加え 30℃で 24 時間、130rpm で振盪したところ、アセトフェノンを収率 10%、(*R*)-1-フェニルエタノールを収率 81% (85%ee) で得られ、デラセミ化が進行した (Entry 1)。また、*G. candidum* NBRC 4597 ではヘキサン溶

媒中でも酸化還元反応を進行することが報告されている。^{26), 27)} そこで、ヘキサン溶媒中での条件検討を行い、反応性の違いを調べてみた。休止菌体 (0.25 g) を水 (1.5 mL) で懸濁させ、ヘキサン (3 mL) と基質 (0.041 mmol) を加えて反応させたところ、アセトフェノンを収率 39%、(*R*)-1-フェニルエタノールを収率 56% (85%ee) で得られたが、デラセミ化は進行しなかった (Entry 2)。さらに、休止菌体を吸水性ポリマー (BL-100) で固定化することによって反応性の向上を試みたが、ほとんど変化は見られなかった (Entry 3)。また、全く水を加えずにヘキサン溶媒に休止菌体を加えて反応させたときも変化がなかった (Entry 4)。おそらく酵素を安定化させるのに、ヘキサンに自然に混入した水で十分であるのだと思われる。これらの検討から、ヘキサン溶媒中やヘキサンと水の二相系溶媒中では反応性の向上やデラセミ化の進行があまり期待できないことが判明した。

Table 5. ヘキサン溶媒中における検討

Entry	Immobilized ^a	Solvent	Yield (%) ketone	alcohol	%ee of (<i>R</i>)-alcohol ^b
1 ^c	—	H ₂ O	10	81	85
2	—	hexane ^d	39	56	77
3	+	hexane	42	58	73
4	—	hexane	36	46	77

Reaction conditions: 30 °C at 130 rpm for 24 h in H₂O (3 mL) or hexane (3 mL). Wet cell: 0.25 g, (±)-1-phenylethanol: 0.041 mmol. ^a Immobilized cell: 1.5 g (immobilized cell was prepared from wet cell: 0.50 g, H₂O: 3.0 mL and water-absorbing polymer: 0.50 g). ^b Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the reference.⁶⁷⁾

^c Wet cell: 0.5 g, (±)-1-phenylethanol: 0.080 mmol. ^d with H₂O (1.5mL).

3.3 イオン液体反応場での吸水性ポリマーによる固定化の影響

次に、イオン液体反応場での反応性の検討を行った。まず、吸水性ポリマーによる固定化の影響を調査した (Table 6)。休止菌体 (0.25 g) を水 (1.5 mL)

で懸濁し、吸水性ポリマー (0.25 g) で固定化する場合としない場合で、それぞれイオン液体[emim][BF₄] (3 mL) と基質(±)-1-フェニルエタノール (0.041 mmol) を加えて反応を行ったときの、反応性を調べた。その結果、吸水性ポリマーで固定化しないほうが、反応性が高いことが分かった。このことから、前章で行ったラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応でも固定化しないことで、より反応性が向上すると思われる。

Table 6. イオン液体中における吸水性ポリマーによる固定化の影響

Entry	Immobilized ^a	Yield (%)		% ee of (<i>R</i>)-alcohol ^b
		ketone	alcohol	
1	—	38	57	64
2	+	28	69	40

Reaction conditions: stirred at 30 °C for 24 h in [emim][BF₄] (3 mL) with H₂O (1.5 mL). (±)-1-Phenylethanol: 0.041 mmol. ^a Immobilized cell: 1.5 g (immobilized cell was prepared from wet cell: 0.25 g, H₂O: 1.5 mL and water-absorbing polymer: 0.25 g). ^b Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the reference.⁶⁷⁾

3.4 水の必要性、イオン液体、好気性条件の検討

水の必要性を検討するため、水を加えずに反応を試みたところ、全く反応は進行しなかった (Table 7, Entry 1)。この結果から、イオン液体を反応溶媒に用いるときは水が必要であるといえる。次に、好気性条件下にすることで反応性の向上を検討した。³¹⁾ まず、振盪速度による検討を行ったところ、それほど違いは見られなかった (Entry 2, 3)。また、好気性条件下にするために反応容器による反応性の変化を調べた (Entry 3, 4)。50 mL 三角フラスコに反応溶液を薄くなるように入れて反応を行うことで、酸素に良く触れるようにしたところ、反応性が上がった。次に、イオン液体の検討として、水と混ざり合うイオン液体[emim][BF₄]、水と混ざらないイオン液体[bmim][PF₆]を用いて反応性

を比較した (Entry 4, 5)。^{21), 32)} [bmim][PF₆]を用いたときのほうが、反応性が高く 97%ee という非常に高い光学純度のアルコールを得ることができた。また、50 mL 三角フラスコ, 130 rpm, [bmim][PF₆]で試みても、98%ee という同等の光学純度のアルコールを得ることができた (Entry 6)。さらに、[emim][BF₄]を用いて酸素雰囲気下で反応を行ったところ、Entry 4 と比べ反応性が向上し、98%ee という高い光学純度のアルコールを得ることができた (Entry 7)。しかし、どの条件においてもデラセミ化は進行しなかった。

Table 7. 水、反応容器、振盪速度、イオン液体の検討

Entry	Reaction vessel	Shaked	Solvent (3mL)	Yield (%)		% ee of (R)-alcohol ^a
				ketone	alcohol	
1	test tube	130 rpm	[emim][BF ₄]	1	97	1
2	test tube	130 rpm	[emim][BF ₄] ^b	40	53	75
3	test tube	280 rpm	[emim][BF ₄] ^b	39	54	68
4	Erlenmeyer flask	280 rpm	[emim][BF ₄] ^b	40	52	81
5	Erlenmeyer flask	280 rpm	[bmim][PF ₆] ^b	39	44	97
6	Erlenmeyer flask	130 rpm	[bmim][PF ₆] ^b	38	42	98
7 ^c	Erlenmeyer flask	130 rpm	[emim][BF ₄] ^b	39	42	98

Reaction conditions: 24 h at 30 °C. Wet cell: 0.25 g, (±)-1-phenylethanol: 0.041 mmol. ^a Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the reference.⁶⁷⁾ ^b with H₂O (1.5 mL). ^c under O₂ atmosphere.

3.5 添加物による反応性変化

促進剤として NAD⁺、NADH、シクロヘキサノン、2-プロパノールを様々な条件で加えることで反応性の向上を試みた (Table 8)。試験管で 30°C、24 時間攪拌を行った。前章の条件はシクロヘキサノンを加え固定化した場合であるが、固定化しない場合も同等の反応性を示すことが分かった (Entry 1)。また、NAD⁺や NADH を加えても反応性は上がらなかった (Entry 2, 7)。2-プロパノールを加えることで還元反応性を上げようと考えたが、デラセミ化は進行しなかつ

た (Entry 3- 6, 8)。

Table 8. 促進剤による反応性変化

Entry	Immobilized	NAD ⁺ ^a	NADH ^a	Cyclo-hexanone ^b	2-Propanol ^c	Yield (%)		% ee of (R)-alcohol ^d
						ketone	alcohol	
1	—	—	—	+	—	48	46	98
2	+	+	—	+	—	49	48	97
3	—	+	—	—	+	11	83	12
4	+	+	—	—	+	16	72	20
5	+	—	—	+	+	29	71	38
6	+	+	—	+	+	28	69	40
7	+	—	+	+	—	48	48	96
8	+	—	+	+	+	28	72	39

Reaction conditions: 24 h at 30 °C in [emim][BF₄] (3 mL) with H₂O (1.5 mL). (±)-1-Phenylethanol: 0.041 mmol. ^a 5 mg. ^b 25 µL. ^c 50 µL. ^d Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the reference.⁶⁷⁾

次に、阻害剤を添加することでケトンから *S* 体アルコールへの還元反応を行う酵素の働きを阻害し、*R* 体アルコールを得ようと考えた (Table 9)。^{30), 31)} 阻害剤としてアリルアルコールとメチルビニルケトンを用いて検討したが、デラセミ化は起こらず、反応性も低くなってしまった。なお、Entry 2 では固定化して阻害剤を用いた場合を、Entry 3 では 50 mL 三角フラスコで 280 rpm で振盪して反応性を高めて阻害剤を用いた場合を検討している。

Table 9. 阻害剤による反応性変化

Entry	Inhibitor ^a	Immobilized	Yield (%)		% ee of (R)-alcohol ^b
			ketone	alcohol	
1	allyl alcohol	—	23	65	35
2	allyl alcohol	+ ^c	12	80	14
3	allyl alcohol ^d	—	21	68	29
4	methyl vinyl ketone	—	31	56	54

Reaction conditions: stirred at 30 °C for 24 h in [emim][BF₄] (3 mL) with H₂O (1.5 mL). (±)-1-Phenylethanol: 0.041 mmol. ^a 0.5 mmol. ^b Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the reference.⁶⁷⁾ ^c Immobilized cell: 1.5 g (immobilized cell was prepared from wet cell: 0.5 g, H₂O: 3 mL, allyl alcohol: 1.0 mmol and water-absorbing polymer: 0.5 g). ^d shaken at 280 rpm.

3.6 化学還元剤を用いたデラセミ化反応

これまでの検討から、イオン液体中ではラセミ体二級アルコール類から生成したケトンが還元されないことが分かった。デラセミ化反応を達成するためには、(1) 生成したケトンを経元のラセミ体アルコールに変換するか、あるいは (2) 生成したケトンを生成した光学活性アルコールと同じ絶対配置を有するアルコールへと変換する、2つの方法が考えられる (Fig. 14)。そこで、両方面から検討を行った。まずは、生成したケトンを経元のラセミ体アルコールに変換する方法についての検討について述べたいと思う。近年、化学還元剤を酵素と一緒に用いることによってアミンやアミノ酸のデラセミ化反応を達成したことを **Turner** らのグループが報告している。⁷²⁾⁻⁷⁵⁾ そこで、化学還元剤と一緒に用いることを試みた。

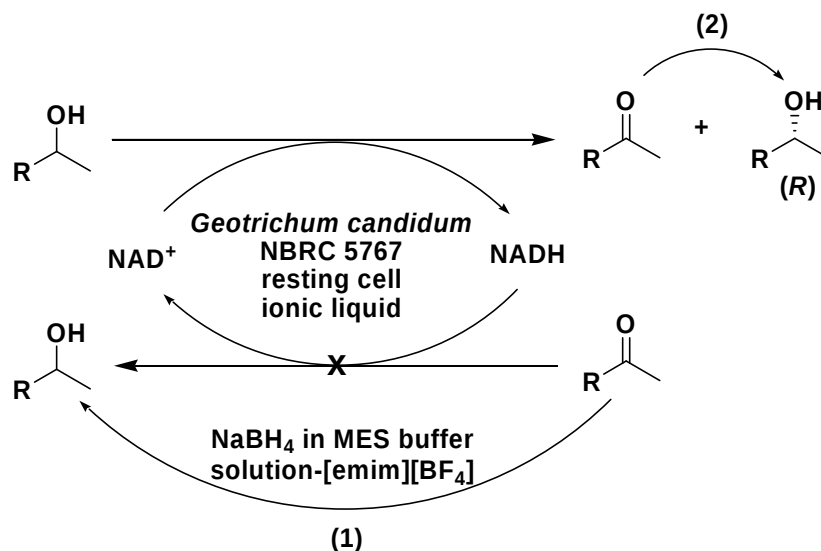


Fig.14 ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応へのアプローチ

実行可能性を確かめるため、基質に(±)-1-フェニルエタノールを用いた (Table 10)。 *G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体 (0.25 g) を蒸留水 (1.5 mL) で懸

濁し、イオン液体[emim][BF₄] (3 mL) を加え、基質(±)-1-フェニルエタノール (0.041 mmol)、還元剤 NaBH₄ (約 3 当量) を加えたところ、若干であるがデラセミ化が進行した (Entry 1)。還元剤を加えることによって pH などの環境変化が起こり、酵素が失活してしまうと考えられる。そこで、*G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体に含まれる酵素を安定化させるために、水の代わりに緩衝液 MES バッファー (0.1 M, pH 7) を用いることで環境変化を抑えようとした結果、デラセミ化がより進行した (Entry 2)。また、吸水性ポリマーで固定化した場合は反応性が低下してしまった (Entry 3)。吸水性ポリマーと NaBH₄ が反応してしまい、それによって酵素周辺の環境が大きく変わり酵素が失活してしまうのだと思われる。また、イオン液体に[bmim][PF₆]を用いて行くとデラセミ化はほとんど進行しなかった (Entry 4, 5)。**[bmim][PF₆]**は水と混ざりにくいため、還元剤が即座に水に触れ失活してしまうためだと考えられる。一方、[emim][BF₄]は水と混ざり合うため、水がイオン液体に分散して穏やかに還元剤と接触するので、還元剤が失活する速度を遅くできるのだと思う。さらに、別の還元剤 NaBH₃CN を用いて検討を行ったが、デラセミ化は進行しなかったので還元剤は NaBH₄ が適していると判断した (Entry 6, 7)。次に、緩衝液や休止菌体の量を増やしたところ、デラセミ化のさらなる進行が見られた (Entry 8-10)。そして、還元剤の量や時間など最適な条件を検討した結果 (Entry 11-14)、(*R*)-1-フェニルエタノールを収率 96%かつ光学純度 99%ee で得ることができた (Entry 13)。この結果から、ある程度の NaBH₄ が必要で、MES バッファーと[emim][BF₄]の量が 1:1 の関係であるときに最も良い条件であることが分かった。この反応系は 99%ee という期待通りの光学純度で得られ、ほぼ定量的にデラセミ化が進行する理想的な光学純度のアルコールが得られる反応系であると考えられる。また、Entry 13 の条件で休止菌体を固定化して反応を試みたが、Entry

3と同様に反応性が低下した (Entry 15, 16)。補酵素 NAD^+ を加えることで少量の休止菌体でデラセミ化反応を進行させようとしたが、 NAD^+ と還元剤が即座に反応してしまい、その環境変化で酵素反応も進行しなかった (Entry 17)。また、イオン液体を用いなくても緩衝液中でもデラセミ化反応は進行したが、生成物の抽出が困難で低収率になった (Entry 18- 20)。この点から、イオン液体を用いると生成物の抽出が容易になるので、イオン液体を用いる利点があるといえる。

Table 10. 化学還元剤を用いたデラセミ化反応^a

Entry	Substrate ^b	Ionic liquid (3 mL)	NaBH_4 or NaBH_3CN	Reaction time (h)	Wet cell (g)	MES buffer (mL)	Yield (%)		%ee of (<i>R</i>)-alcohol
							ketone	alcohol	
1	1-Phenylethanol	[emim][BF_4]	NaBH_4 (3.2 eq.)	24	0.25	(1.5, H_2O)	4	89	19
2		[emim][BF_4]	NaBH_4 (3.1 eq.)	24	0.25	1.5	6	88	31
3		[emim][BF_4] ^{c,d}	NaBH_4 (3.0 eq.)	24	0.25	1.5	10	81	12
4		[bmim][PF_6]	NaBH_4 (3.2 eq.)	24	0.25	1.5	28	59	34
5		[bmim][PF_6] ^{c,d}	NaBH_4 (3.0 eq.)	24	0.25	1.5	17	72	29
6		[emim][BF_4]	NaBH_3CN (3.7 eq.)	24	0.25	1.5	31	60	51
7		[bmim][PF_6]	NaBH_3CN (3.1 eq.)	24	0.25	1.5	43	46	98
8		[emim][BF_4]	NaBH_4 (3.2 eq.)	24	0.50	1.5	10	81	39
9		[emim][BF_4]	NaBH_4 (3.5 eq.)	24	0.25	3.0	8	86	55
10		[emim][BF_4]	NaBH_4 (3.0 eq.)	24	0.50	3.0	20	65	98
11		[emim][BF_4]	NaBH_4 (3.1 eq.)	48	0.50	3.0	31	60	92
12		[emim][BF_4]	NaBH_4 (6.4 eq.)	48	0.50	3.0	0	95	99
13		[emim][BF_4]	NaBH_4 (9.0 eq.)	24	0.50	3.0	1	96	99
14		[emim][BF_4]	NaBH_4 (15 eq.)	24	0.50	3.0	10	86	92
15		[emim][BF_4] ^{c,d}	NaBH_4 (9.0 eq.)	24	0.50	3.0	5	87	6
16		[emim][BF_4] ^{c,e}	NaBH_4 (9.0 eq.)	24	1.0	3.0	39	62	57
17 ^f		[emim][BF_4]	NaBH_4 (3.1 eq.)	24	0.25	1.5	1	90	8
18	2-Octanol ^g	None	NaBH_4 (9.1 eq.)	24	0.50	6.0	2	84	>99
19		None	NaBH_4 (9.0 eq.)	24	0.50	6.0	5	36	74
20	Sulcatol	None	NaBH_4 (9.0 eq.)	24	0.50	6.0	22	10	86

^a Reaction conditions: 24 h at 30°C; racemic alcohol: 0.041 mmol. Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the reference.⁶⁷⁾

^b Racemic mixture. ^c Immobilized cell prepared from wet cell, MES buffer solution and water-absorbing polymer was used. ^d Immobilized cell: 1.5 g. ^e Immobilized cell: 3.0 g. ^f with NAD^+ (5 mg). ^g Determined by GC analyses after acetylation of remaining alcohol.

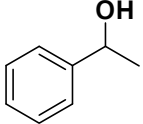
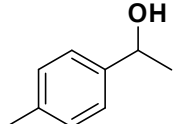
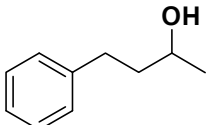
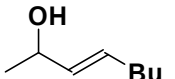
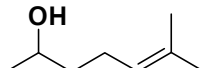
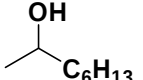
3.7 デラセミ化反応の基質特異性

前項で明らかにした MES バッファー - [emim][BF₄] (1:1) 混合溶媒中で *G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体と還元剤 NaBH₄を用いた系によるラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応の基質特異性について調査した (Table 11)。

まず、ベンゼン核上に置換基を有する化合物として(±)-1-*p*-メチルフェニルエタノールを基質に用いたところ、(*R*)-1-*p*-メチルフェニルエタノールを収率 87%, 光学純度 95%ee で得られた (Entry 2)。ベンゼン環から少し離れている系として(±)-4-フェニルブタン-2-オールを基質に用いたところ、(*R*)-4-フェニルブタン-2-オールを収率 79%, 光学純度 96%で得ることができた (Entry 3)。また、脂肪族の不飽和化合物として(±)-(*E*)-3-オクテン-2-オール (Entry 4, 5) と(±)-スルカトール (Entry 6) を基質に用いた。(*R*)-(*E*)-3-オクテン-2-オールと(*R*)-スルカトールを中程度の収率かつ非常に高い光学純度で得られた。また、(±)-(*E*)-3-オクテン-2-オールを反応させたときは、副生成物として(±)-(*E*)-3-オクテン-2-オールの酸化体が NaBH₄によって、1,4 還元され生成した 2-オクタノン (収率 2%, Entry 4、収率 7%, Entry 5) とその還元体の 2-オクタノール (収率 13%, Entry 4、収率 13%, Entry 5) を得た。さらに、脂肪族の飽和化合物として(±)-2-オクタノールを基質に使用した(Entry 7- 9)。休止菌体 (0.50 g), MES バッファー (3 mL) , [emim][BF₄] (3 mL) のとき、高い光学純度で(*R*)-2-オクタノールを得ることができなかった(Entry 7)。高い光学純度が得られないのは酸化反応の速度が遅いためだと思い、休止菌体の量を増やしたところ非常に高い光学純度で(*R*)-2-オクタノールを得ることができた(Entry 8, 9)。次に、複雑な構造を有する芳香族化合物である(±)-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフタレン (Entry 10)と(±)-1-(1-ヒドロキシエチル)ナフタレン (Entry 11, 12) を用いた。(±)-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフタレンは中程度の収率で非常に高い光学純度

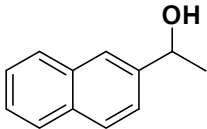
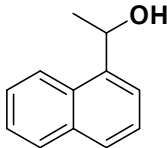
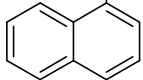
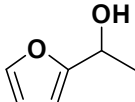
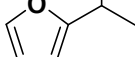
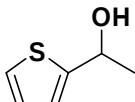
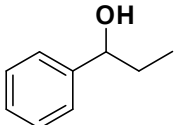
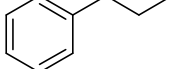
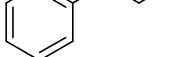
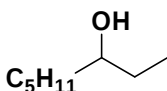
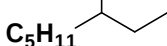
で(*R*)-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフタレンを得られた。また、(±)-1-(1-ヒドロキシエチル)ナフタレンは休止菌体による酸化反応の速度が遅いが、休止菌体の量を増やすことで 72%ee まで光学純度を向上できた。第二章で 1-フェニルエタノールのオルト位に置換基を有する場合は望む光学純度のアルコールが得られなかったことから、ナフタレン環が水酸基に近い空間を占めるため反応性が低いと考えられる。さらに、複素環化合物として(±)-1-(2-フラニル)エタノール (Entry 13, 14) と(±)-1-(2-チオフェニル)エタノール (Entry 15) を用いたところ、中程度の収率、非常に高い光学純度で(*R*)-1-(2-フラニル)エタノールと(*R*)-1-(2-チオフェニル)エタノールを得た。さらには、プロパノール誘導体とし

Table 11. デラセミ化反応における基質特異性

Entry	Substrate ^a	NaBH ₄ (eq.)	Wet cell (g)	Yield (%)		% ee of (<i>R</i>)-alcohol ^b
				ketone	alcohol	
1		9.0	0.50	1	96	99
2		9.0	0.50	5	87	95
3		9.0	0.50	15	79	96
4		9.0	0.50	0	54	>99
5		9.0 ^c	0.75	0	58	>99
6		9.1	0.50	8	68	97
7		9.0 ^d	0.50	10	67	89
8		9.0 ^{c,d}	0.75	10	74	99
9		9.0 ^{d,e}	1.00	14	85	98

て(±)-1-フェニル-1-プロパノール (Entry 16- 18) と(±)-3-オクタノール (Entry 19, 20) を基質として用いたとき、*G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体による酸化反応が非常に遅かったが、休止菌体の量を増やし、反応時間を延ばしたところ高い光学純度の(*R*)-1-フェニル-1-プロパノールと(*R*)-3-オクタノールを得ることができた。水中でのデラセミ化反応^{30), 31)} と比べ、幅広い基質に適用で

Table 11. デラセミ化反応における基質特異性 (続き)

Entry	Substrate ^a	NaBH ₄ (eq.)	Wet cell (g)	Yield (%)		% ee of (<i>R</i>)-alcohol ^b
				ketone	alcohol	
10		9.0 ^c	0.75	21	56	>99
11		9.0	0.50	5	77	21
12		9.0 ^f	6.00	35	42	72
13		9.0	0.50	18	60	97
14		9.1	0.50	16	66	>99
15		8.9	0.50	12	73	>99
16		9.0	0.50	4	96	19
17		9.0 ^g	6.00	17	33	66
18		9.0 ^h	6.00	32	49	>99
19		9.0 ^d	0.50	3	90	16
20		9.0 ^{d,i}	3.00	9	41	97

Reaction conditions: 24 h at 30 °C in the mixture of MES buffer solution (3 mL) and [emim][BF₄] (3 mL), racemic alcohol: 0.041 mmol. ^a Racemic mixture. ^b Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB or CP-Cyclodextrin-B-2,3,6-M-19). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the references.^{28), 67- 69), 81), 82)} ^c MES buffer solution (4.5 mL), [emim][BF₄] (4.5 mL). ^d Determined by GC analyses after acetylation of remaining alcohol. ^e MES buffer solution (6.0 mL), [emim][BF₄] (6.0 mL). ^f MES buffer solution (18.0 mL), [emim][BF₄] (18.0 mL), 48 h. ^g MES buffer solution (36.0 mL), [emim][BF₄] (36.0 mL). ^h MES buffer solution (18.0 mL), [emim][BF₄] (18.0 mL), 51 h. ⁱ MES buffer solution (18.0 mL), [emim][BF₄] (18.0 mL), 24 h.

きた。*G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体に含まれている酵素については分かっていないが、*R* 体アルコールが関係する酵素と *S* 体アルコールが関係する酵素がいくつか存在していると思われる。水中でのデラセミ化反応では 2 つの性質の酵素が働くことによって進行すると考えられている。すなわち、*R* 体アルコールに関係する酵素の基質適用範囲が水中でのデラセミ化反応の基質適用範囲であるといえる。*S* 体アルコールが関係する酵素の基質の適用範囲は *R* 体のアルコールの関係する酵素の基質の適用範囲より広いため、より幅広い基質に適用できる反応系が構築できたと考えられる。

3.8 *Lactobacillus kefir* (乳酸菌ケフィア) 由来のアルコールデヒドロゲナーゼを用いたデラセミ化反応

次に、生成したケトンを生じた光学活性アルコールと同じ絶対配置を有するアルコールへと変換する方法によるデラセミ化反応について述べたい。

ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応において化学還元剤は酸化体であるケトンを再び基質であるラセミ体二級アルコールに還元する働きをする。そして、系中で生成したラセミ体二級アルコールが菌体によって立体選択的に酸化され、ケトンが還元されるということが繰り返される。菌体で酸化されて生成したケトンをも *R* 体アルコールに不斉還元できれば、より効率的にデラセミ化を進行させることができるはずである。また、還元剤 NaBH_4 は実験室レベルではそれほど危険性は少なく廃棄物も出ないが、工業的に用いた場合、水と反応し事故を引き起こす可能性が考えられ、また触媒でないため廃棄物が多く出てしまう。これらの理由から、ケトンをも *R* 体アルコールに還元する生体触媒を用いることを考えた。ほとんどのアルコールデヒドロゲナーゼはケトンをも *S* 体アルコールに還元することで知られている。⁷⁶⁾ しかし、*R* 体アルコールに還

元する菌体や酵素もいくつか報告されている。⁷⁷⁾⁻⁸⁰⁾ その中で市販されている *Lactobacillus kefir* 由来の ADH (E.C. 1.1.1.2) を用いることにした。

G. candidum NBRC 5767 の休止菌体と *L. kefir* 由来 ADH を MES バッファー (0.1 M, pH 7) で懸濁させ、イオン液体、基質を加え振盪した。基質は(±)-1-フェニルエタノールを用いた (Table 12)。まず、還元剤 NaBH₄ を用いたデラセミ化反応の条件で NaBH₄ の代わりに *L. kefir* 由来 ADH (5 mg) 使用して反応を試みたところ、デラセミ化は進行しなかった (Entry 1)。緩衝液 MES バッファーの量を半分にしたところ、デラセミ化の進行が若干見られた (Entry 2)。イオン液体に [bmim][PF₆] を用いたところ、デラセミ化の進行が低下した (Entry 3)。 *L. kefir* 由来 ADH の量を 10 mg に増やすとデラセミ化がある程度進んだ (Entry 4)。吸水性ポリマー (BL-100) で *G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体と *L. kefir* 由来 ADH を固定化した場合、デラセミ化は進行しなかった (Entry 5)。また、反応時間を 48 時間に延ばしても、24 時間のとくと変わらなかった (Entry 6)。 *G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体と [emim][BF₄] と MES バッファーの量を倍にしたときも、向上しなかった (Entry 7)。以上の結果から、デラセミ化反応はある程度進行したが、光学純度は 90% を超えなかった。 *L. kefir* 由来 ADH の量を増やしたことで更なる進行が見られたが誤差範囲で、さらに反応時間を延ばしてもほとんど違いが見られなかったことから、 *L. kefir* 由来 ADH の量をより多くすればデラセミ化がさらに進行するとは期待できない。この酵素は NADPH を補酵素に用いることが知られている。NADPH が無くなったため反応が進行しないということが考えられるため、NADP⁺ から NADPH に戻すプロセスを組み込む必要があると思われる。NADPH を加える方法も考えられるが、高価な試薬なので実用的ではないと考えられる。

Table 12. *L. kefir* 由来 ADH を用いたデラセミ化反応^a

Entry	Ionic liquid (3ml)	ADH from <i>L. kefir</i> (mg)	Reaction time (h)	Wet cell (g)	MES buffer (mL)	Yield (%)		%ee of (<i>R</i>)-alcohol
1 ^b	[emim][BF ₄]	4.9	24	0.50	3.0	41	51	97
2	[emim][BF ₄]	5.0	24	0.50	1.5	24	64	83
3	[bmim][PF ₆]	4.9	24	0.50	1.5	42	57	>99
4	[emim][BF ₄]	10	24	0.50	1.5	18	78	84
5	[emim][BF ₄] ^c	4.9	24	0.50	1.5	29	59	30
6	[emim][BF ₄]	4.9	48	0.50	1.5	22	69	88
7	[emim][BF ₄] ^d	5.1	24	1.00	3.0	28	69	88

^a Reaction conditions: 30°C at 280 rpm. (±)-1-Phenylethanol: 0.041 mmol. Determined by GC analysis with chiral column (Chirasil-DEX CB). The absolute configuration was determined to be *R* for all samples examined by comparing the GC retention times with those of the authentic samples in the reference.⁶⁷⁾ ^b 250 rpm. ^c Immobilized cell prepared from wet cell, ADH from *L. kefir*, MES buffer solution and water-absorbing polymer was used. ^d [emim][BF₄] (6.0 mL).

3.9 第三章のまとめ

前章で見出したラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応を進展させ、デラセミ化反応の開発を行った。MES バッファー (0.1 M, pH 7) - [emim][BF₄] の混合溶媒中で *G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体と化学還元剤 NaBH₄ を用いた系を用いることによって、ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応を達成した。MES バッファーと [emim][BF₄] の混合溶媒を用いることで、酵素を安定化させ、還元剤 NaBH₄ によるケトンのラセミ体アルコールへの還元を促進させることができた。また、MES バッファーとイオン液体 [emim][BF₄] の量の割合、さらに加える休止菌体の量が、デラセミ化の進行と高い光学純度で生成物を得るための重要な要素であると思われる。MES バッファーとイオン液体 [emim][BF₄] の量の割合は 1:1 のとき、最も良い結果が得られ、さらに休止菌体を加えるほど良い結果が得られた。*G. candidum* NBRC 5767 は [emim][BF₄] 溶媒中でケトンから *S* 体アルコールへの還元を行うことが報告されているが、菌体がケトンを *S* 体アルコールに還元するより NaBH₄ がラセミ体アルコールに変換するほうが速いことが分かった。また、この手法は非常に幅広いタイプの

二級アルコールに適用できる、光学活性二級アルコール類を高い光学純度で得るための有用な手法であると考えられる。

工業化した場合の NaBH_4 の危険性を除くことと、より効率的な手法を開発するため、 NaBH_4 の代わりに *L. kefir* 由来 ADH を用いたラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応に取り組み、道を切り開くことができた。

3.10 Experimental for Chapter 3

Instruments. Gas chromatographic analyses were performed using a Shimadzu GC-12A or GC-12B gas chromatograph with a Shimadzu C-R6A or C-R8A Chromatopac equipped with chiral GC-columns (CP-Chirasil-DEX CB; 50 m (DEX), CP-Cyclodextrin-B-2,3,6-M-19; 25 m (CPCD)).

Chemicals. Organic reagents were purchased from Nacalai Tesque, Inc., Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kanto Chemical Co., Inc., Aldrich Chemical Company, Inc., Across Organics, Merck Ltd., Japan or Tokyo Kasei Kogyo Company, Ltd. unless noted otherwise. BL-100 (water-absorbing polymer), *Geotrichum candidum* NBRC 5767 were kindly supplied by Prof. Matsuda at Tokyo Institute of Technology.

Cultivation of *Geotrichum candidum*. How to cultivate of *G. candidum* was shown at section 2.5.

Studies for the deracemization of racemic secondary alcohols in hexane (Table 5).³⁰⁾

Entry 1: to a suspension of wet cell of *G. candidum* NBRC 5767 (0.501 g) in water (3.0 mL) in a test tube, racemic 1-phenylethanol (0.080 mmol) was added. The mixture was shaken at 130 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with diethyl ether (5 mL x 5) by centrifugation (10 min, 8000 rpm). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was

added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 5.

Entry 2: to a suspension of wet cell (0.249 g) in water (1.5 mL) in a test tube, hexane (3.0 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) were added. The mixture was shaken at 130 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 5.

Entry 3: to a suspension of wet cell (0.501 g) in water (3.0 mL), BL-100 (0.500 g) was added and the mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.501 g) and hexane (3 mL) were added in a test tube. The mixture was shaken at 130 rpm for 24 h at 30 °C and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 5.

Entry 4: to a suspension of wet cell (0.2506 g) in hexane (3.0 mL) in a 50 mL

Erlenmeyer flask, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) was added. The mixture was shaken at 130 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 5.

Effect of immobilization in [emim][BF₄] (Table 6).

Without immobilization (Entry 1): to a suspension of wet cell of *G. candidum* NBRC 5767 (0.250 g) in water (1.5 mL) in a test tube, [emim][BF₄] (3.0 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) were added. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h, extracted with diethyl ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 6.

With immobilization (Entry 2): to a suspension of wet cell (0.251 g) in water (1.5 mL), BL-100 (0.2505 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.500 g) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to

ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 6.

Reaction vessels, shaking speeds and solvents (Table 7).

Entry 1: wet cell (0.249 g), [emim][BF₄] (3.0 ml) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 7.

Entry 2: to a suspension of wet cell (0.250 g) in water (1.5 mL) in a test tube, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added. The mixture was shaken at 130 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 7.

Entry 3: to a suspension of wet cell (0.250 g) in water (1.5 mL) in a test tube, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added.

The mixture was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 7.

Entry 4: to a suspension of wet cell (0.249 g) in water (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added. The mixture was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 7.

Entry 5: to a suspension of wet cell (0.251 g) in water (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [bmim][PF₆] (3.0 mL) were added. The mixture was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 7.

Entry 6: to a suspension of wet cell (0.251 g) in water (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [bmim][PF₆] (3.0 mL) were added. The mixture was shaken at 130 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 7.

Entry 7: to a suspension of wet cell (0.2497 g) in water (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added. The mixture was shaken at 130 rpm for 24 h at 30 °C under O₂ atmosphere, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 7.

Accelerators (Table 8).

Entry 1: to a suspension of wet cell (0.251 g) and cyclohexanone (25 μ L) in water (1.5 mL) in a test tube, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal

standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Entry 2: to a suspension of wet cell (0.499 g), NAD^+ (10.1 mg) and cyclohexanone (50 μL) in water (3.0 mL), BL-100 (0.499 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.499 g) and [emim][BF_4] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Entry 3: to a suspension of wet cell (0.251 g), NAD^+ (5.0 mg) and 2-propanol (50 μL) in water (1.5 mL) in a test tube, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF_4] (3.0 mL) were added. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Entry 4: to a suspension of wet cell (0.501 g), NAD^+ (10.0 mg) and 2-propanol (100 μL) in water (3.0 mL), BL-100 (0.499 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.499 g) and [emim][BF_4] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 $^\circ\text{C}$ for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Entry 5: to a suspension of wet cell (0.252 g), cyclohexanone (25 μL) and 2-propanol (50 μL) in water (1.5 mL), BL-100 (0.2501 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.500 g) and [emim][BF_4] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 $^\circ\text{C}$ for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Entry 6: to a suspension of wet cell (0.499 g), NAD^+ (10.1 mg), cyclohexanone (50 μL) and 2-propanol (100 μL) in water (3.0 mL), BL-100 (0.499 g) was

added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.501 g) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Entry 7: to a suspension of wet cell (0.499 g), NADH (10.1 mg), and cyclohexanone (50 μ L) in water (3.0 mL), BL-100 (0.500 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.499 g) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Entry 8: to a suspension of wet cell (0.501 g), NADH (10.1 mg), cyclohexanone (50 μ L) and 2-propanol (100 μ L) in water (3.0 mL), BL-100 (0.499 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.501 g) and

[emim][BF₄] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 8.

Inhibitors (Table 9).

Entry 1: to a suspension of wet cell (0.249 g) and allyl alcohol (34.2 μL, 0.5 mmol) in water (1.5 mL) in a test tube, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 9.

Entry 2: to a suspension of wet cell (0.500 g) and allyl alcohol (68.4 μL, 1.0 mmol) in water (3.0 mL), BL-100 (0.5004 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. Racemic 1-phenylethanol (0.041mmol), the resulting powder (1.500 g) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through

Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 9.

Entry 3: to a suspension of wet cell (0.2512 g) and allyl alcohol (34.2 μ L, 0.5 mmol) in water (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, [emim][BF₄] (3.0 mL) was added. After the mixture was shaken at 280 rpm for 30 min at 30 °C, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) was added, shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 9.

Entry 4: to a suspension of wet cell (0.249 g) and methyl vinyl ketone (40.8 μ L, 0.5 mmol) in water (1.5 mL) in a test tube, racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and [emim][BF₄] (3.0 mL) were added. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 9.

Deracemization of racemic secondary alcohols with a chemical reducing agent (Table 10).

Entry 1: the wet cell (0.250 g) was suspended in water (1.5 mL) in a test tube, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0050 g, 0.13 mmol). The whole was stirred at 30 °C for 24 h, extracted with ether (5 mL x 4). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 2: the wet cell (0.2502 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0049 g, 0.13 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 3: to a suspension of wet cell (0.5001 g) in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL), BL-100 (0.5007 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. The resulting powder (1.5001 g), [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041mmol) and NaBH₄ (0.0047 g, 0.12 mmol) were added in a 50 mL Erlenmeyer flask. The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at

30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 4: the wet cell (0.250 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [bmim][PF₆] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0050 g, 0.13 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 5: to a suspension of wet cell (0.5001 g) in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL), BL-100 (0.5007 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. The resulting powder (1.5031 g), [bmim][PF₆] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041mmol) and NaBH₄ (0.0047 g, 0.12 mmol) were added in a 50 mL Erlenmeyer flask. The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether.

Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 6: the wet cell (0.2497 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₃CN (0.0096 g, 0.15 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 7: the wet cell (0.250 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [bmim][PF₆] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₃CN (0.0081 g, 0.13 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 8: the wet cell (0.5001 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M,

pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0050 g, 0.13 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 9: the wet cell (0.2499 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0055 g, 0.15 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 10: the wet cell (0.4999 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0047 g, 0.12 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal

standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 11: the wet cell (0.4998 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0048 g, 0.13 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 48 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 12: the wet cell (0.5006 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0100 g, 0.26 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 48 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 13: the wet cell (0.5009 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0141 g, 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 14: the wet cell (0.5009 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0234 g, 0.62 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 15: to a suspension of wet cell (0.4999 g) in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL), BL-100 (0.2490 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. The resulting powder (1.4991 g), [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic

1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0140 g, 0.37 mmol) were added in a 50 mL Erlenmeyer flask. The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 16: to a suspension of wet cell (0.9991 g) in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL), BL-100 (0.4997 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. The resulting powder (3.0004 g), [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0142 g, 0.38 mmol) were added in a 50 mL Erlenmeyer flask. The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 17: the wet cell (0.2505 g), NAD⁺ (0.0050 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3.0 mL), racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0048 g, 0.13 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an

internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 18: the wet cell (0.5000 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol), NaBH₄ (0.0141 g, 0.37 mmol) and MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (10 mL, 5 mL x 3) by centrifugation (10 min, 8000 rpm). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

Entry 19: the wet cell (0.5001 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (6.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of racemic 2-octanol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0139 g, 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (10 mL, 5 mL x 3) by centrifugation (10 min, 8000 rpm). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield was determined by GC analyses of the ether extract. Ee of

2-octanol was determined by GC analyses after acetylation of remaining alcohol. The results are shown in Table 10.

Entry 20: the wet cell (0.5002 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (6.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of racemic sulcatol (0.041 mmol) and NaBH₄ (0.0140 g, 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 10.

General procedure for the deracemization of racemic secondary alcohols with the *G. candidum* NaBH₄ system. The wet cell of *G. candidum* NBRC 5767 (0.50 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3 mL), a racemic secondary alcohol (0.041 mmol), and NaBH₄ (9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract.

Preparation of a racemic secondary alcohol.

Racemic 1-(2-thiophenyl)ethanol:⁷⁰⁾ how to prepare this alcohol was shown at section 2.5.

Substrate specificity of the *G. candidum* NaBH₄ system (Table 11).

(*R*)-1-Phenylethanol: racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum* NaBH₄ system. (*R*)-1-Phenylethanol; yield 96% (99%ee), acetophenone; yield 1% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 130 °C).

(*R*)-1-*p*-Methylphenylethanol: racemic 1-*p*-methylphenylethanol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum* NaBH₄ system. (*R*)-1-*p*-Methylphenylethanol; yield 87% (95%ee), 1-(4-methylphenyl)ethanone; yield 5% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 120 °C).

(*R*)-4-Phenyl-2-butanol: racemic 4-phenyl-2-butanol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum* NaBH₄ system. (*R*)-4-Phenyl-2-butanol; yield 79% (96%ee), 4-phenyl-2-butanone; yield 15% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 150 °C (yield); DEX, 130 °C (ee)).

(*R*)-(*E*)-3-Octen-2-ol: (Entry 4) racemic (*E*)-3-octen-2-ol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum* NaBH₄ system. (*R*)-(*E*)-3-Octen-2-ol; yield 54% (>99%ee), 2-octanol; yield 13%, 2-octanone; yield 2% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 90 °C (36 min)→10 °C/min→150 °C)).

(Entry 5) The wet cell (0.7494 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (4.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (4.5 mL), racemic (*E*)-3-octen-2-ol (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0140 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-(*E*)-3-Octen-2-ol; yield 58% (>99%ee), 2-octanol; yield 13%, 2-octanone; yield 7% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 90 °C (36 min) → 10 °C/min → 150 °C)).

(*R*)-Sulcatol: racemic sulcatol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum*-NaBH₄ system. (*R*)-Sulcatol; yield 68% (97%ee), 6-methyl-5-hepten-2-one; yield 8% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 100 °C (25 min) → 10 °C/min → 150 °C).

(*R*)-2-Octanol: (Entry 7) racemic 2-octanol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum*-NaBH₄ system. (*R*)-2-Octanol; yield 10% (89%ee), 2-octanone; yield 10% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 100 °C (yield); CPCD 100 °C (ee) after the product alcohol was acetylated to determine ee by GC analysis).

(Entry 8) The wet cell (0.7500 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (4.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of

[emim][BF₄] (4.5 mL), racemic 2-octanol (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0139 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-2-Octanol; yield 74% (99%ee), 2-octanone; yield 10% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 100 °C (yield); CPCD 100 °C (ee) after the product alcohol was acetylated to determine ee by GC analysis).

(Entry 9) The wet cell (0.9998 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (6 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (6 mL), racemic 2-octanol (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0140 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-2-Octanol; yield 85% (98%ee), 2-octanone; yield 14% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 100 °C (yield); CPCD 100 °C (ee) after the product alcohol was acetylated to determine ee by GC analysis).

(*R*)-2-(1-Hydroxyethyl)naphthalene: the wet cell (0.7505 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (4.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (4.5 mL), racemic

2-(1-hydroxyethyl)naphthalene (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0140 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-2-(1-Hydroxyethyl)naphthalene; yield 56% (>99%ee), 2'-acetoneaphthone; yield 21% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 150 °C).

(*R*)-1-(1-Hydroxyethyl)naphthalene: (Entry 11) racemic 1-(1-hydroxyethyl)naphthalene (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum*-NaBH₄ system. (*R*)-1-(1-Hydroxyethyl)naphthalene; yield 77% (21%ee), 1'-acetoneaphthone; yield 5% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 160 °C).

(Entry 12) The wet cell (6.0000 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (18 mL) in a 200 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (18 mL), racemic 1-(1-hydroxyethyl)naphthalene (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0140 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 48 h at 30 °C, extracted with ether (10 mL, 8 mL, 3 mL x 6) by centrifugation (1 min, 8000 rpm). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-1-(1-Hydroxyethyl)naphthalene; yield 42% (72%ee), 1'-acetoneaphthone;

yield 35% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 160 °C).

(*R*)-1-(2-Furanyl)ethanol: racemic 1-(2-furanyl)ethanol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum*-NaBH₄ system. (*R*)-1-(2-Furanyl)ethanol; yield 60% (81%ee) (Entry 13), 66% (>99%ee) (Entry 14), 1-(2-furanyl)ethanone; yield 18% (Entry 13), 16% (Entry 14) (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 80 °C (24 min)→10 °C/min→150 °C)).

(*R*)-1-(2-Thiophenyl)ethanol: racemic 1-(2-thiophenyl)ethanol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum*-NaBH₄ system. (*R*)-1-(2-Thiophenyl)ethanol; yield 73% (>99%ee), 1-(2-thiophenyl)ethanone; yield 12% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 120 °C).

(*R*)-1-Phenyl-1-propanol: (Entry 16) racemic 1-phenyl-1-propanol (0.041 mmol) was subjected to the *G. candidum*-NaBH₄ system. (*R*)-1-Phenyl-1-propanol; yield 96% (19%ee), 1-phenyl-1-propanol; yield 4% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 115 °C).

(Entry 17) The wet cell (5.9989 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (36 mL) in a 500 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (36 mL), racemic 1-phenyl-1-propanol (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0139 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (9 mL, 3 mL x 5). Dodecane (7.93 x 10⁻⁵ mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether.

Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-1-Phenyl-1-propanol; yield 33% (66%ee), 1-phenyl-1-propanol; yield 17% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 115 °C).

(Entry 18) The wet cell (6.0006 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (18 mL) in a 200 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (18 mL), racemic 1-phenyl-1-propanol (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0140 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 51 h at 30 °C, extracted with ether (10 mL, 8 mL, 3 mL x 6) by centrifugation (1 min, 8000 rpm). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-1-Phenyl-1-propanol; yield 49% (>99%ee), 1-phenyl-1-propanol; yield 32% (Determined by GC analysis. GC conditions: DEX, 115 °C).

(*R*)-3-Octanol: (Entry 19) racemic 3-octanol was subjected to the *G. candidum*-NaBH₄ system. (*R*)-3-Octanol; yield 90% (16%ee), 3-octanone; yield 3% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 115 °C (yield); CPCD 115 °C (ee) after the product alcohol was acetylated to determine ee by GC analysis).

(Entry 20) The wet cell (3.0004 g) was suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (18 mL) in a 200 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (18 mL), racemic 3-octanol (0.041 mmol), and NaBH₄ (0.0140 g, 9.0 eq., 0.37 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C,

extracted with ether (10 mL, 8 mL, 3 mL x 6) by centrifugation (1 min, 8000 rpm). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. (*R*)-3-Octanol; yield 41% (16%ee), 3-octanone; yield 9% (Determined by GC analysis. GC conditions: CPCD, 115 °C (yield); CPCD 115 °C (ee) after the product alcohol was acetylated to determine ee by GC analysis).

Deracemization of racemic secondary alcohols with the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* (Table 12).

Entry 1: the wet cell of *G. candidum* NBRC 5767 (0.5006 g) and ADH from *L. kefir* (4.9 mg, 2.0 units) were suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 12.

Entry 2: the wet cell (0.5001 g) and ADH from *L. kefir* (5.0 mg, 2.0 units) were suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3 mL) and racemic

1-phenylethanol (0.041 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 12.

Entry 3: the wet cell (0.4995 g) and ADH from *L. kefir* (4.9 mg, 2.0 units) were suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [bmim][PF₆] (3 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 12.

Entry 4: the wet cell (0.5005 g) and ADH from *L. kefir* (10.0 mg, 4.0 units) were suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether.

Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 12.

Entry 5: to a suspension of wet cell (0.4995 g) and ADH from *L. kefir* (4.9 mg, 2.0 units) in MES buffer solution (0.1M, pH 7) (1.5 mL), BL-100 (0.2500 g) was added. The mixture was stirred with a spatula. The resulting powder (1.500 g), [emim][BF₄] (3.0 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol) were added in a test tube. The mixture was stirred at 30 °C for 24 h and extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 12.

Entry 6: the wet cell (0.4995 g) and ADH from *L. kefir* (4.9 mg, 2.0 units) were suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (1.5 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 48 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 12.

Entry 7: the wet cell (0.9998 g) and ADH from *L. kefir* (5.1 mg, 2.0 units) were suspended in MES buffer solution (0.1 M, pH 7) (3.0 mL) in a 50 mL Erlenmeyer flask, followed by addition of [emim][BF₄] (3 mL) and racemic 1-phenylethanol (0.041 mmol). The whole was shaken at 280 rpm for 24 h at 30 °C, extracted with ether (5 mL x 5). Dodecane (7.93×10^{-5} mol) as an internal standard to determine chemical yield was added to ether extract. Ether layer (1 mL) was filtrated through Extrelut and eluted with ether. Chemical yield and ee were determined by GC analyses of the ether extract. The results are shown in Table 12.

第四章 フルオリナーゼによるフッ素化反応における反応性向上

4.1 はじめに

有機フッ素化合物は樹脂、ゴム、塗料などの工業製品、また医農薬品として非常に広範に使用されている。³³⁾⁻³⁶⁾ これらのほとんどすべての製品が石油を原料とした炭化水素系化合物と無機フッ素化合物を原料として合成されている。有機合成によるフッ素化反応は非常に高い温度や圧力などの厳しい条件下で行うため、環境配慮や安全性の面で不十分であると考えられる。このような背景から、より安全で環境に配慮されたフッ素化合物の合成法の開発が必要とされており、生体触媒の持つ、温和な反応条件で反応が進行する特徴や、特異な基質選択性に注目が集まっている。

フッ素化合物を作り出す酵素は唯一フルオリナーゼが知られているのみである。フルオリナーゼは放線菌 *Streptomyces cattleya* から産生される酵素であり、*S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) を 5'-フルオロ-5'-デオキシアデノシン (5'-FDA) に変換する酵素をとって知られている (Fig. 15)。このような無機のフッ化物イオンから直接フッ素化された化合物ができる酵素の報告例はこれまでないことから、このフッ素化酵素 (フルオリナーゼ) を用いる方法は、安全で環境に配慮された合成法である生体触媒を用いたフッ素化合物の合成法の開発につながると期待できる。しかしながら、このフルオリナーゼの欠点として、SAM から 5'-FDA への変換効率が低く安定性に欠けることが挙げられる。そこで、イオン液体を用いることによって変換効率の向上を試み、イオン液体の有用性を示すことにした。

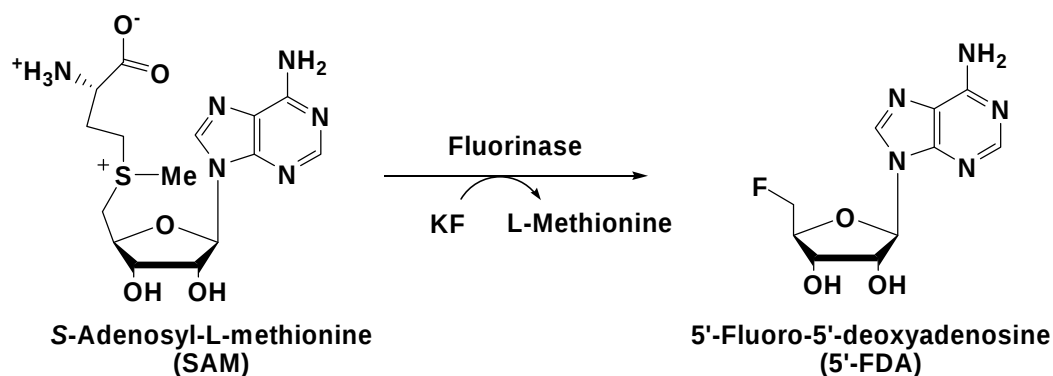


Fig. 15 フルオリナーゼを用いたフッ素化反応

4.2 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応におけるイオン液体の効果

フルオリナーゼ (E.C. 2.5.1.63) を Tris-HCl バッファー (pH 8.0) で溶かした溶液 (200 μ L, 1 mg/mL) に基質 SAM (50 nmol)、KF 溶液 (1 mM in H₂O, 2 μ mol) を加え、Tris-HCl バッファー (pH 8.0, 1 mL) を溶媒に用いて反応させたとき、5'-FDA は変換率 5.7%で得られる。この反応の変換効率を向上させる試みとしてイオン液体中でフッ素化反応を行ったが進行しなかった (Fig. 16)。

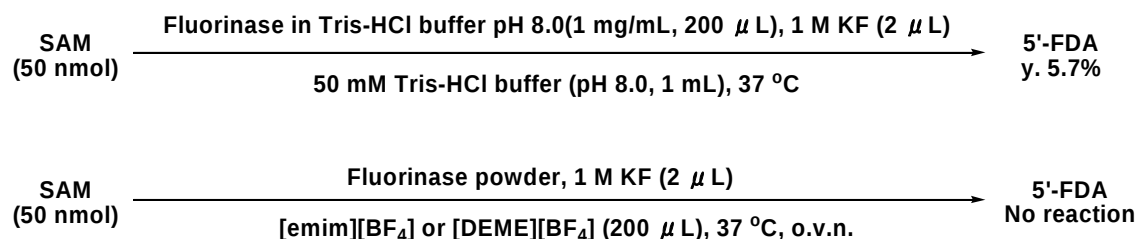


Fig. 16 これまでの実験結果

第二章、第三章で述べたように、酵素には少量の水が必要であると考えられる。そこで、フルオリナーゼの安定化を図り、酵素の周りに反応に必要な水を

保持するために吸水性ポリマーによる固定化を行った。さらに、固定化酵素をイオン液体中で用いることで酵素反応を促進させることを試みた (Table 13)。また、固定化することで抽出時の酵素の抽出を防げると考え、再利用を行った。

フルオリナーゼ溶液 (200 μ L, 1 mg/mL)、SAM (50 nmol)、KF 溶液 (2 μ mol) を吸水性ポリマー-BL-100 (20 mg) で固定化し、Tris-HCl バッファー (800 μ L) またはイオン液体 (800 μ L) を加え 37°C で 6 時間反応を行った (Fig. 17)。その後、5'-FDA をエーテル (10 mL x 10) で抽出した後、エーテル溶液を濃縮し HPLC で定量した。残った反応場は残存しているエーテルを減圧下で留去した後、1 時間反応を行い、同様の操作で定量を行った。それを 3 回目まで繰り返した。

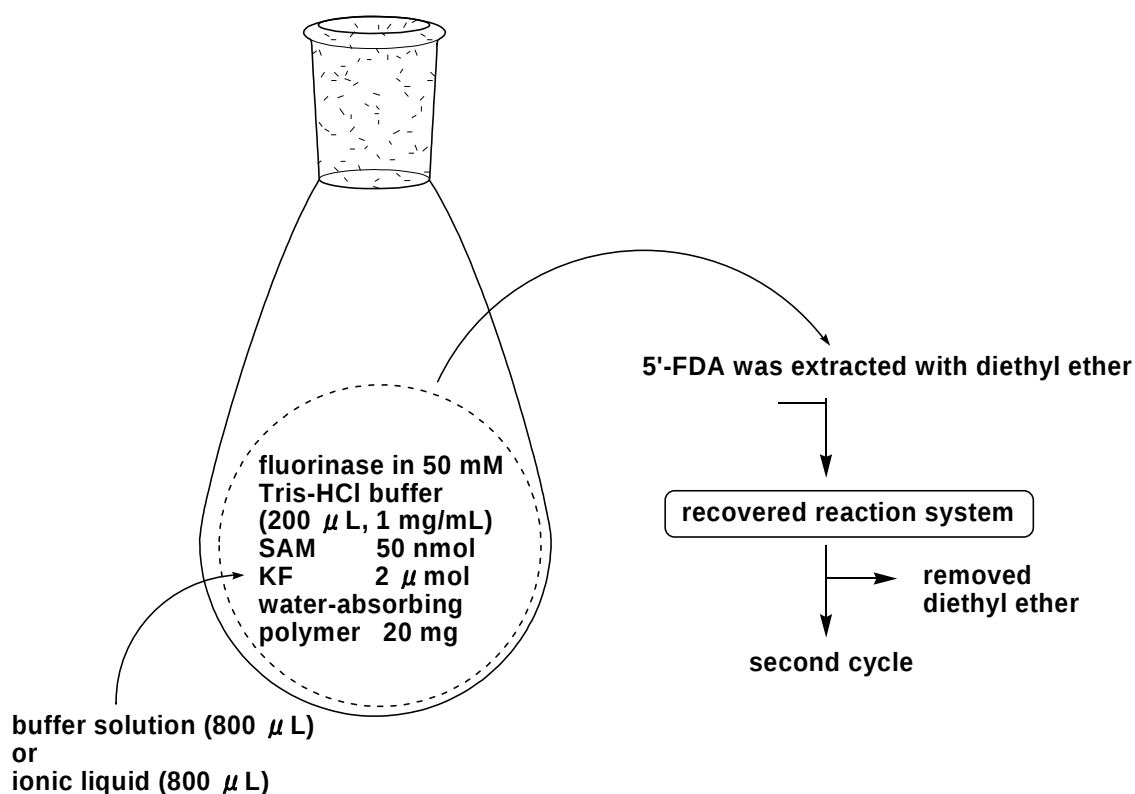


Fig. 17 固定化フルオリナーゼによるフッ素化反応

まず、基準として Tris-HCl バッファーを溶媒に用いて反応を試みたところ、固定化しなかった場合に比べて変換率が約 3 分の 2 に低下したが、固定化することによって再利用が可能になった (Entry 12)。しかし、抽出時にバッファーも抽出され、酵素反応に必要な水を失ってしまったためか 2 回目で変換率が激減し、3 回目では 5'-FDA を定量できなかった。そして、様々なイオン液体を用いて検討を行った。まず、アニオン部位が BF_4^- のイオン液体で試みたところ、繰り返し使えることが分かった (Entry 1- 5)。さらに、カチオン部位にイミダゾール環を含むイオン液体では、イミダゾリウム環の片側の側鎖 (メチル基の反対側) の炭素鎖が長いほど変換効率が向上する傾向であることが分かった (Entry 1- 4)。また、[bmim][BF_4], [hexmim][BF_4] と [DEME][BF_4] では、バッファーと比べて変換効率が向上した (Entry 3- 5)。一方、[emim][BF_4], [amim][BF_4] では、バッファーと比べ変換効率が低下した (Entry 1, 2)。次に、アニオン部位が BF_4^- 以外のイオン液体で検討を行った (Entry 6- 11)。
[bmim][PF_6], [emim][OTf], PP13 TFSA の場合は、バッファーと比べて変換効率が減少した (Entry 6- 8)。
[DEME][TFSA], [bmim][TFSA], [$\text{Bu}_3\text{P}(\text{C}_{12})$][BF_4] ではイオン液体がエーテルに溶けてしまい、5'-FDA を HPLC で検出できなかった (Entry 9- 11)。

Table 13. 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応におけるイオン液体の効果

Entry	IL or Buffer	Conversion yield (%) ^a			Total	Ratio ^c
		first	second	third		
1	[emim][BF ₄]	1.7	1.0	0.7	3.4	87
2	[amim][BF ₄]	1.6	1.6	1.2	3.4	87
3	[bmim][BF ₄]	2.8	2.1	0.6	5.4	138
4	[hexmim][BF ₄]	4.9	3.3	1.1	9.1	233
5	[DEME][BF ₄]	2.9	1.8	1.2	5.9	151
6	[bmim][PF ₆]	2.7	0.3	0.1	3.0	77
7	[emim][OTf]	1.3	0.9	0.4	2.6	67
8	PP13 TFSA	1.8	- ^b	- ^b	1.8	46
9	[DEME][TFSA]	- ^b				
10	[bmim][TFSA]	- ^b				
11	[Bu ₃ P(C12)][BF ₄]	- ^b				
12	Tris-HCl buffer	3.4	0.5	- ^b	3.9	100

^a Reaction condition: immobilized cell was prepared from fluorinase in Tris-HCl buffer solution (1 mg/mL, 200 μ L), 2 μ mol KF, SAM 50 nmol, and water-absorbing polymer 20 mg, 37 °C, 6 h, Tris-HCl buffer or ionic liquid (800 μ L). ^b 5'-FDA was not isolated. ^c Ratio of total conversion yield of ionic liquid/Tris-HCl buffer.

4.3 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応における条件の検討

これまでの検討では反応回数が増えるにしたがって変換率が減少している。Tris-HCl バッファーを用いたとき、抽出時にバッファーも抽出されたことから、イオン液体のときもポリマーからバッファーの抽出が起こっていると考えた。特に減少が著しかった[bmim][PF₆]は水と混じらない性質であるため、ポリマー中のバッファーとエーテルが直接接触してしまい、多量のバッファーが抽出されてしまうのだと思う。また、他のイオン液体は水と混ざるため、イオン液体がバッファーとエーテルとの接触を防ぎ、バッファーの抽出を少なくしているのだと思われる。そこで、酵素溶液、KF 溶液、ポリマー、溶媒の量を増やして反

応を行った (Table 14)。溶媒は[DEME][BF₄]を用いた。酵素溶液, KF 溶液, [DEME][BF₄]を増やしたところ変換効率は変わらなかったが、3 回目に変換率の向上が見られた (Entry 2)。また、ポリマーによる固定化でイオン液体中の酵素反応が進んだことから、ポリマーの量を増やした結果、変換効率は低下してしまった (Entry 3)。この場合、1 回目から 3 回目まで変換率が変わらなかったため、1 回目の反応時間に 6 時間行う必要はないと思い、Entry 2 の条件で 1 回目の反応時間を 1 時間にして試みたところ Entry 2 と同じ変換効率であった。このことから、一定の量の 5'-FDA が生成されたら反応が進行しなくなってしまうと示唆できる。

Table 14. 酵素反応の条件検討

Entry	Fluorinase solution (μ L) ^a	1M KF (μ L)	Water-absorbing polymer (g)	[DEME][BF ₄] (mL)	Conversion yield (%) ^b			Total
					first	second	third	
1	200	2	0.02	0.8	2.9 (6 h)	1.8	1.2	5.9
2	400	4	0.02	2.0	3.2 (6 h)	1.1	2.0	6.3
3	400	4	0.04	2.0	1.4 (6 h)	1.5	1.6	4.5
4	400	4	0.02	2.0	2.3 (1 h)	2.5	1.4	6.3

^a Fluorinase in Tris-HCl buffer solution (1 mg/mL). ^b Reaction condition: immobilized cell was prepared from fluorinase in Tris-HCl buffer solution (1 mg/mL), 1M KF, SAM 50 nmol, and water-absorbing polymer, 37 °C, 1 h, [DEME][BF₄].

4.4 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応に適したイオン液体

前項の結果や当研究室で行われた細かい条件検討の結果から、反応条件として酵素量と KF の量を倍にし、時間を短くして再度検討を行うことにした (Table 15)。フルオリナーゼ溶液 (400 μ L, 1 mg/mL)、SAM (50 nmol)、KF 溶液 (4 μ mol) を吸水性ポリマー BL-100 (20 mg) で固定化し、Tris-HCl バッファー (2 mL) またはイオン液体 (2 mL) を加え 37°C で 1 時間反応を行った (Fig. 18)。その後、5'-FDA をエーテル (10 mL x 10) で抽出した後、エーテル溶液を濃縮し HPLC で定量した。残った反応場は残存しているエーテルを減圧下で留去し

た後、1 時間反応を行い、同様の操作で定量を行った。それを 5 回目まで繰り返した。

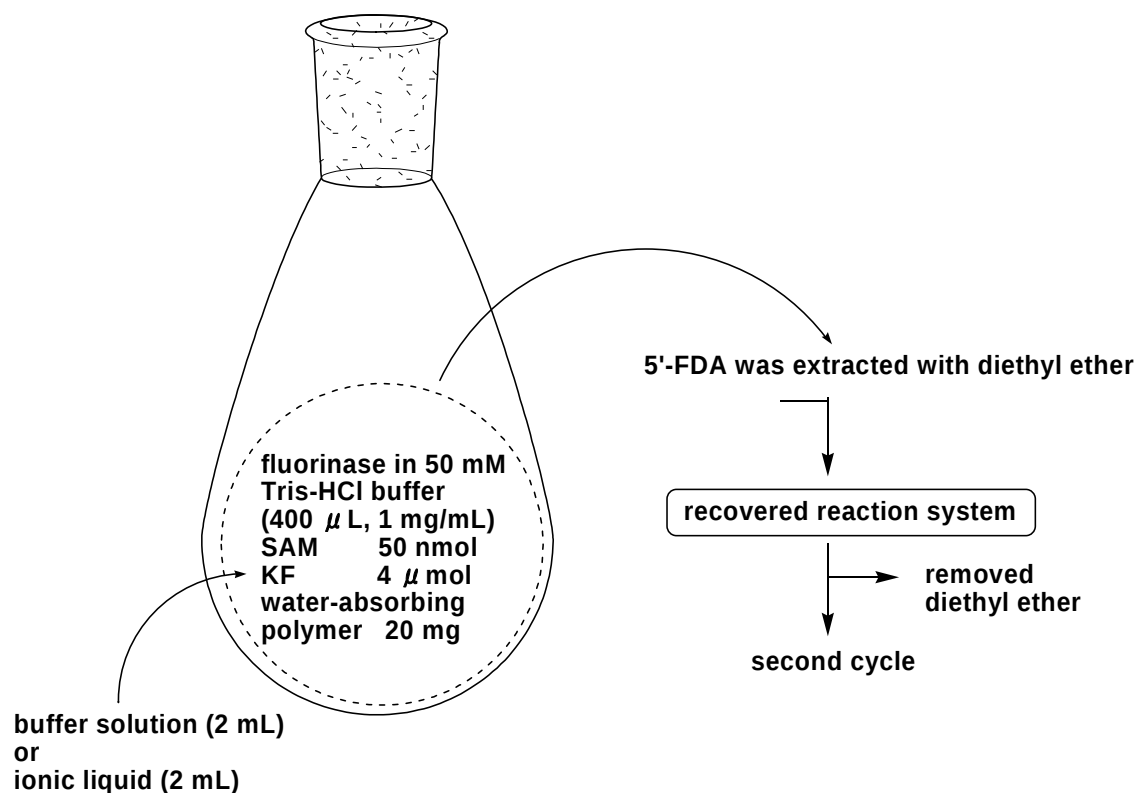


Fig. 18 固定化フルオリナーゼによるフッ素化反応（再検討）

最初に、Tris-HCl バッファー中で行うと先ほどは 3 回目で検出されなかったが、5 回目まで検出でき 3.9%から 9.4%（固定化しない場合と比較し 1.6 倍）まで変換率を向上させることができた（Entry 6）。次に、アニオン部位が BF_4^- のイオン液体で検討を行った（Entry 1- 3）。[DEME][BF_4]中で固定化酵素を用いたときは、Tris-HCl バッファーを用いたときよりも若干変換効率は低かった（Entry 1）。しかし、イミダゾリウム環に長い側鎖を有するイオン液体である [hexmim][BF_4]と [octylmim][BF_4]を用いた場合は、バッファーを用いたときと比べて 1.3~1.4 倍の変換効率に向上した（Entry 2, 3）。また、アニオン部位が

PF₆⁻のイオン液体で検討を行った (Entry 4, 5)。BF₄⁻系のイオン液体のときと同様に、イミダゾリウム環に長い側鎖を有するイオン液体である[hexmim][PF₆]と[octylmim][PF₆]を用いて反応を試みた。[hexmim][PF₆]を用いたときは 1.7 倍に変換効率が向上した (Entry 5)。特に、[octylmim][PF₆]を用いたときは、Tris-HCl バッファーを用いたときの 2.4 倍 (固定化せず Tris-HCl バッファー中で反応を行ったときの約 4 倍) にまで向上した (Entry 4)。

当研究室での研究から、フルオリナーゼの反応では SAM と 5'-FDA がある濃度で平衡状態になると考えられている。このイオン液体の反応系では、生成した 5'-FDA がイオン液体に溶解するために平衡がずれると考えられ、変換効率が向上するのだと考えられる。このことから、さらなる変換効率の向上のためには、いかにイオン液体に 5'-FDA を溶解させるかが重要だと思われる。また、PF₆系のイオン液体ではバッファーが抽出されたことから変換率が低下したと考えられるため、反応性を維持するために反応ごとにバッファーを加えるなどの検討が必要だと思われる。

Table 15. 固定化フルオリナーゼのフッ素化反応に適したイオン液体

Entry	IL or Buffer	Conversion yield (%) ^a					Total	Ratio ^c
		first	second	third	fourth	fifth		
1	[DEME][BF ₄]	2.3	2.5	1.4	1.0	1.3	8.5	90
2	[hexmim][BF ₄]	4.7	3.2	1.8	1.3	1.5	12.5	133
3	[octylmim][BF ₄]	4.5	3.8	2.6	1.1	0.7	12.7	135
4	[octylmim][PF ₆]	19.8	2.6	0.4	- ^b	- ^b	22.8	243
5	[hexmim][PF ₆]	12.9	2.7	0.3	- ^b	- ^b	15.9	169
6	Tris-HCl buffer	2.5	3.5	2.7	0.5	0.2	9.4	100

^a Reaction condition: immobilized cell was prepared from fluorinase in Tris-HCl buffer solution (1 mg/mL, 400 μ L), 4 μ mol KF, SAM 50 nmol, and water-absorbing polymer 20 mg, 37 °C, 1 h, ionic liquid (2 mL). ^b 5'-FDA was not isolated. ^c Ratio of total conversion yield of ionic liquid/Tris-HCl buffer.

4.5 第四章のまとめ

SAM を 5'-FDA に変換する反応を触媒する酵素であるフルオリナーゼが生体触媒を用いたフッ素化合物の合成法の開発につながると期待できる。しかし、フルオリナーゼは反応性が低いため、イオン液体を用いることで反応性の向上を試みた。まず、イオン液体中でフルオリナーゼによるフッ素化反応が進行しないため、吸水性ポリマーで固定化し酵素の周りに水を保持させ、イオン液体中での酵素反応を進行させた。また、固定化によって再利用も可能になった。さらに、反応性を向上させるために、反応条件を変えて様々なイオン液体を検討した結果、酵素反応に適したイオン液体を見つけることができた。溶媒に [hexmim][BF₄], [octylmim][BF₄], [octylmim][PF₆], または [hexmim][PF₆] を用いることによって、固定化しないで Tris-HCl バッファーを用いたときと比べ 2.2 ～ 4 倍に向上させることができた。特に、[octylmim][PF₆] を溶媒として用いたときは 5'-FDA の変換効率を約 4 倍に向上させることができた。イオン液体を用いることが、固定化フルオリナーゼによるフッ素化反応の反応性向上に有効であることを明らかにした。

4.4 Experimental for Chapter 4

Instruments. DNA analysis was performed using CEQ8000 (Beackman Coulter). HPLC analyses were performed using a Shimadzu LC-10ADVP Liquid Chromatogagraph with Shimadzu C-R8A Chromatopac equipped with Shimadzu SPD-10AVP UV-VIS Detector, DGU-12A Degasser, Shim-pack GVP-ODS (10L x 4.6), and Shim-pack VP-ODS (150L x 4.6).

Chemicals. Organic reagents were purchased from Nacalai Tesque, Inc., Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Kanto Chemical Co., Inc., Aldrich Chemical Company, Inc., Across Organics, Merck Ltd., Japan or Tokyo Kasei Kogyo Company, Ltd. unless noted otherwise. BL-100 (water-absorbing polymer) was kindly supplied by Prof. Matsuda at Tokyo Institute of Technology.

Preparation of *fIA* protein. *E. coli* BL21(DE3) pLysS were used for fluorinase production. The fluorinase gene (*fIA*) was amplified from the *Streptomyces cattleya* NBRC 14057 genome using primers reported previously.⁴⁸⁾ Only a single, silent mutation in *fIA* was detected by CEQ8000 DNA analysis (Beackman Coulter). The *fIA* was cloned in pET28b+ (Novagen) and consequently fused to the His-tag-containing peptide in the *N*-terminal of the enzyme, termed pETfIA. The *fIA* protein was purified by Ni²⁺-affinity column.

General procedure for fluorination reaction with immobilized fluorinase.

Table 13: the *fIA* protein (200 μ L, 1 mg/mL) in 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 50 nM of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) and KF in water (1 mM in H₂O, 2 μ L) were mixed, and then the water-absorbing polymer (BL-100, 20 mg) was added into the above mixture and then stirred quickly. An ionic liquid (800 μ L) was added to the resulting immobilized *fIA* protein, and then the mixture was stirred for 6 h at 37 °C, and then the 5'-FDA was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the remained diethyl ether in the reaction system was removed under dynamic vacuum, the recovered reaction system was used in the second cycle. After the recovered reaction system was stirred for 1 h at 37 °C, the product (5'-FDA) was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the system was worked up similarly, the recovered reaction system was reused in the third cycle. HPLC conditions (Shim-pack VP-ODS (150L x 4.6), eluent, MeOH / 10 mM pH 7.0 KH₂PO₄ = 1 / 4, 0.75 mL/min).

Table 14, Entry 1: the *fIA* protein (200 μ L, 1 mg/mL) in 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 50 nM of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) and KF in water (1 mM in H₂O, 2 μ L) were mixed, and then the water-absorbing polymer (BL-100, 20 mg) was added into the above mixture and then stirred quickly. [DEME][BF₄] (800 μ L) was added to the resulting immobilized *fIA* protein, and then the mixture was stirred for 6 h at 37 °C, and then the 5'-FDA was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the remained diethyl ether in the reaction system was removed under dynamic

vacuum, the recovered reaction system was used in the second cycle. After the recovered reaction system was stirred for 1 h at 37 °C, the product (5'-FDA) was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the system was worked up similarly, the recovered reaction system was reused in the third cycle. HPLC conditions (Shim-pack VP-ODS (150L x 4.6), eluent, MeOH / 10 mM pH7.0 KH₂PO₄ = 1 / 4, 0.75 mL/min). The results are shown in Table 14.

Entry 2: the *fIA* protein (400 μ L, 1 mg/mL) in 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 50 nM of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) and KF in water (1 mM in H₂O, 4 μ L) were mixed, and then the water-absorbing polymer (BL-100, 20 mg) was added into the above mixture and then stirred quickly. [DEME][BF₄] (2 mL) was added to the resulting immobilized *fIA* protein, and then the mixture was stirred for 6 h at 37 °C, and then the 5'-FDA was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the remained diethyl ether in the reaction system was removed under dynamic vacuum, the recovered reaction system was used in the second cycle. After the recovered reaction system was stirred for 1 h at 37 °C, the product (5'-FDA) was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the system was worked up similarly, the recovered reaction system was reused in the third cycle. HPLC conditions (Shim-pack VP-ODS (150L x 4.6), eluent, MeOH / 10 mM pH7.0 KH₂PO₄ = 1 / 4, 0.75 mL/min). The results are shown in Table 14.

Entry 3: the *fIA* protein (400 μ L, 1 mg/mL) in 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 50 nM of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) and KF in water (1 mM in H₂O, 4 μ L) were mixed, and then the water-absorbing polymer (BL-100, 40 mg) was added into the above mixture and then stirred quickly. [DEME][BF₄] (2 mL) was added to the resulting immobilized *fIA* protein, and then the mixture was stirred for 6 h at 37 °C, and then the 5'-FDA was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the remained diethyl ether in the reaction system was removed under dynamic vacuum, the recovered reaction system was used in the second cycle. After the recovered reaction system was stirred for 1 h at 37 °C, the product (5'-FDA) was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the system was worked up similarly, the recovered reaction system was reused in the third cycle. HPLC conditions (Shim-pack VP-ODS (150L x 4.6), eluent, MeOH / 10 mM pH7.0 KH₂PO₄ = 1 / 4, 0.75 mL/min). The results are shown in Table 14.

Entry 4: the *fIA* protein (400 μ L, 1 mg/mL) in 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 50 nM of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) and KF in water (1 mM in H₂O, 4 μ L) were mixed, and then the water-absorbing polymer (BL-100, 20 mg) was added into the above mixture and then stirred quickly. [DEME][BF₄] (2 mL) was added to the resulting immobilized *fIA* protein, and then the mixture was stirred for 1 h at 37 °C, and then the 5'-FDA was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the remained diethyl ether in the reaction system was removed under dynamic

vacuum, the recovered reaction system was used in the second cycle. After the recovered reaction system was stirred for 1 h at 37 °C, the product (5'-FDA) was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the system was worked up similarly, the recovered reaction system was reused in the third cycle. HPLC conditions (Shim-pack VP-ODS (150L x 4.6), eluent, MeOH / 10 mM pH7.0 KH₂PO₄ = 1 / 4, 0.75 mL/min). The results are shown in Table 14.

Table 15: The *f*lA protein (400 μL, 1 mg/mL) in 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 50 nM of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) and KF in water (1 mM in H₂O, 4 μL) were mixed, and then the water-absorbing polymer (BL-100, 20 mg) was added into the above mixture and then stirred quickly. An ionic liquid (2 mL) was added to the resulting immobilized *f*lA protein, and then the mixture was stirred for 1 h at 37 °C, and then the 5'-FDA was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the remained diethyl ether in the reaction system was removed under dynamic vacuum, the recovered reaction system was used in the second cycle. After the recovered reaction system was stirred for 1 h at 37 °C, the product (5'-FDA) was extracted with diethyl ether (10 mL x 10), and analyzed by HPLC. After the system was worked up similarly, the recovered reaction system was reused in the third cycle. The third, fourth and/or fifth cycle was worked up similarly. HPLC conditions (Shim-pack VP-ODS (150L x 4.6), eluent, MeOH / 10 mM pH7.0 KH₂PO₄ = 1 / 4, 0.55 mL/min, 0.65 mL/min or 0.75 mL/min).

第五章 総括

5.1 本研究の総括

第二章では、*G. candidum* NBRC 5767 の固定化休止菌体を用いて、イオン液体中でのラセミ体二級アルコール類の立体選択的酸化反応を試みた。イオン液体[emim][BF₄]を溶媒に用いることで、今まで報告されている *G. candidum* NBRC 4597 の固定化休止菌体を用いたヘキサン溶媒中での立体選択的酸化反応^{26), 27)} と比べ幅広い基質に対して適用できるようになった。さらに、イオン液体の不揮発性、不燃性という特徴から環境に負荷を掛けない安全な手法だと考えられる。

第三章では、ラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応を検討した。*G. candidum* NBRC 5767 の休止菌体を三角フラスコに入れ、MES バッファーに懸濁させた後、[emim][BF₄]と基質（ラセミ体二級アルコール類）と化学還元剤 NaBH₄を加えて振盪させることでラセミ体二級アルコール類のデラセミ化反応を達成した。水中におけるデラセミ化反応と比べ、幅広い基質に対して適用できる。また、[emim][BF₄]を溶媒に用いることで抽出操作を容易にでき、収率を向上させることができた。一方で、NaBH₄の代わりに *L. kefir* 由来のアルコールデヒドロゲナーゼを用いることでより安全で効率的なデラセミ化反応の開発に道筋をつけることができた。

第四章では、フルオリナーゼのフッ素化反応の反応性向上のため、酵素の固定化を行い、反応溶媒として Tris-HCl 緩衝液やイオン液体を用いてフッ素化反応を試みた。固定化することで繰り返し使用可能になり、イオン液体を用いることで変換効率を著しく向上させることができた。このことから、イオン液体

が固定化フルオリナーゼのフッ素化反応における反応性向上に有効であることを明らかにした。

当研究全体を通して、イオン液体は酵素を利用した反応場の構築に有効な溶剤であることを明らかにできた。様々なイオン液体を検討することで酵素の反応性を向上させることができ、また酵素と化学試薬を組み合わせた反応の構築にも有効であると思う。

5.2 今後の展望

今回開発した化学還元剤を用いたデラセミ化反応では、基質によって多量の菌体を必要とするため工業化は困難である。この問題を解決するには休止菌体に含まれている補酵素の還元体から酸化体への変換ができるようにする必要がある。そうすることで補酵素の循環が進み、菌体の量を減らすことができると考えられる。

L. kefir 由来のアルコールデヒドロゲナーゼを用いたデラセミ化反応においても休止菌体に含まれる補酵素の循環法を構築することが重要である。

フルオリナーゼを用いたフッ素化反応の反応性向上については、イオン液体のイミダゾリウム環の側鎖の炭素鎖が長いほど変換効率が向上する傾向が見られるため、より長い置換基を持つイオン液体を検討するといえると思われる。また、抽出によってバッファーも抽出されたことから、反応性を維持するために反応の度にバッファーを加えるなどの検討が必要であると考えられる。水だけでなく酵素も抽出されている可能性もあるので調べる必要がある。

引用文献

- 1) Eissen, M.; Metzger, J. O.; Schmidt, E.; Schneidewind, U. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 414-436.
- 2) Anastas, P. T.; Lankey, R. L. *Green Chemistry*, **2000**, *2*, 289-295.
- 3) Brundtland, G. *Our Common Future*, Oxford University Press, Oxford, **1987**.
- 4) Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry, Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, **1998**.
- 5) 太田博道, 生体触媒を使う有機合成, 講談社サイエンティフィク, **2003**.
- 6) Sheldon, R. A. *Pure Appl. Chem.*, **2000**, *72*, 1233-1246.
- 7) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature*, **2001**, *409*, 258-268.
- 8) Roberts, S. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 611-633.
- 9) Zaks, A.; Dodds, D. R. *Drug Disc. Today*, **1997**, *2*, 513-531.
- 10) Filho, M. V.; Stillger, T. M.; Müller, M.; Liese, A.; Wandrey, C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 2993-2996.
- 11) 北爪智哉, 梶上寿雄, 沢田英夫, 伊藤敏幸, イオン液体 - 常識を覆す不思議な塩 -, コロナ社, **2005**.
- 12) 北爪智哉, 北爪麻己, イオン液体の不思議 驚異の液体 - 何が起こり、何ができるか?, 工業調査会, **2007**.
- 13) Walden, P. *Bull. Acad. Imper. Sci (St. Petersburg)*, **1914**, 405-422.
- 14) Wilkes, J. S.; Zaworotko, M. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 965-967.
- 15) Welton, T. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2071-2083.
- 16) Jain, N.; Kumar, A.; Chauhan, S.; Chauhan, S. M. S. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 1015-1060.
- 17) Klibanov, A. M. *Nature*, **2001**, *409*, 241-246.
- 18) Klibanov, A. M. *Trends Biotechnol.*, **1997**, *15*, 97-101.
- 19) Eckstein, M.; Filho, M. V.; Liese, A.; Kragl, U. *Chem. Commun.*, **2004**, 1084-1085.
- 20) Madeira Lau, R.; Van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 4189-4191.
- 21) Cull, S. G.; Holbrey, J. D.; Vargas-Mora, V.; Seddon, K. R.; Lye, G. J. *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, *69*, 227-233.
- 22) Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 2757-2785.

- 23) Kitazume, T.; Jiang, Z.; Kasai, K.; Mihara, Y.; Suzuki, M. *J. Fluorine Chem.*, **2003**, *121*, 205-212.
- 24) 松田知子, 原田忠夫, 中村薫, *有機合成化学協会誌*, **2001**, *59*, 659-669.
- 25) Santaniello, E.; Ferraboshi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.*, **1992**, *92*, 1071-1140.
- 26) Nakamura, K.; Inoue, T.; Matsuda, T.; Misawa, I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 2397-2402.
- 27) Nakamura, K.; Matsuda, T.; Harada, T. *Chirality*, **2002**, *14*, 703-708.
- 28) Nakamura, K.; Matsuda, T. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 8957-8964.
- 29) Matsuda, T.; Harada, T.; Nakajima, N.; Itoh, T.; Nakamura, K. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 156-163.
- 30) Nakamura, K.; Inoue, Y.; Matsuda, T.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 6263-6266.
- 31) Nakamura, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 3147-3153.
- 32) Matsuda, T.; Yamagishi, Y.; Koguchi, S.; Iwai, N.; Kitazume, T. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 4619-4622.
- 33) 北爪智哉, 石原孝, 田口武夫, フッ素の化学, 講談社サイエンティフィク, **1993**.
- 34) Hagmann, W. K. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 4359-4369.
- 35) Suzuki, Y.; Hagiwara, T.; Kawamura, I.; Okumura, N.; Kitazume, T.; Kakimoto, M.; Imai, Y.; Ouchi, Y.; Takezoe, H.; Fukuda, A. *Liquid Crystals*, **2006**, *33*, 1344-1349.
- 36) Isanbor, C.; O'Hagan, D. *J. Fluorine Chem.*, **2006**, *127*, 303-319.
- 37) O'Hagan, D.; Harper, D. B. *J. Fluorine Chem.*, **1999**, *100*, 127-133.
- 38) O'Hagan, D. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 308-319.
- 39) Bondi, A. *J. Phys. Chem.*, **1964**, *68*, 441-451.
- 40) Sanada, M.; Miyano, T.; Iwadare, S.; Williamson, J. M.; Arison, B. H.; Smith, J. L.; Douglas, A. W.; Liesh, J. M.; Inamine, E. *J. Antibiotics*, **1986**, *39*, 259-265.
- 41) O'Hagan, D.; Schaffrath, C.; Cobb, S. L.; Hamilton, J. T. G.; Murphy, C. D. *Nature*, **2002**, *416*, 279.
- 42) O'Hagan, D. *J. Fluorine Chem.*, **2006**, *127*, 1479-1483.
- 43) Reid, K. A.; Hamilton, J. T. G.; Bowden, R. D.; O'Hagan, D.; Dasaradhi, L.; Amin, M. R.; Harper, D. B. *Microbiology*, **1995**, *141*, 1385-1393.
- 44) Moss, S. J.; Murphy, C. D.; Hamilton, J. T. G.; McRoberts, W. C.;

- O'Hagan, D.; Schaffrath, C.; Harper, D. B. *Chem. Commun.*, **2000**, 2281-2282.
- 45) Murphy, C. D.; Moss, S. J.; O'Hagan, D. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, *67*, 4919-4921.
- 46) Murphy, C. D.; O'Hagan, D.; Schaffrath, C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4479-4481.
- 47) Schaffrath, C.; Deng, H.; O'Hagan, D. *FEBS Lett.*, **2003**, *547*, 111-114.
- 48) Dong, C.; Huang, F. L.; Deng, H.; Schaffrath, C.; Spencer, J. B.; O'Hagan, D.; Naismith, J. H. *Nature*, **2004**, *427*, 561-565.
- 49) Cobb, S. L.; Deng, H.; Hamilton, J. T. G.; McGlinchey, R. P.; O'Hagan, D. *Chem. Commun.*, **2004**, 592-593.
- 50) Onega, M.; McGlinchey, R. P.; Deng, H.; Hamilton, J. T. G.; O'Hagan, D. *Bioorg. Chem.*, **2007**, *35*, 375-385.
- 51) Cadicamo, C. D.; Courtieu, J.; Deng, H.; Meddour, A.; O'Hagan, D. *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 685-690.
- 52) Gruber, C. C., Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. *Adv. Synth. Catal.*, **2006**, *348*, 1789-1805.
- 53) Faber, K. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5004-5010.
- 54) Azerad, R.; Buisson, D. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2000**, *11*, 565-571.
- 55) Strauss, U. T.; Felfer, U.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 107-117.
- 56) Stecher, H.; Faber, K. *Synthesis*, **1997**, 1-16.
- 57) Titu, D.; Chadha, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2008**, *52-53*, 168-172.
- 58) Vijayanthi, T.; Chadha, A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 1077-1084.
- 59) Padhi, S. K.; Titu, D.; Pandian, N. G.; Chadha, A. *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5133-5140.
- 60) Nie, Y.; Xu, Y.; Mu, X. Q. *Org. Process Res. Dev.*, **2004**, *8*, 246-251.
- 61) Allan, G. R.; Carnell, A. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6495-6497.
- 62) Ogawa, J.; Shimizu, S. *Biotechnol. Biochem.*, **1999**, *63*, 1721-1729.
- 63) Ogawa, J.; Xie, S.-X.; Shimizu, S. *Biotechnol. Lett.*, **1999**, *21*, 331-335.
- 64) Xie, S.-X.; Ogawa, J.; Shimizu, S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1999**, *52*, 327-331.
- 65) Tsuchiya, S.; Miyamoto, K.; Ohta, H. *Biotechnol. Lett.*, **1992**, *14*, 1137-1142.
- 66) Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Kroutil, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*,

- 741-745.
- 67) Stampfer, W.; Kosjek, B.; Faber, K.; Kroutil, W. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 402-406.
 - 68) Van Deursen, R.; Stampfer, W.; Edegger, K.; Faber, K.; Kroutil, W. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *31*, 159-163.
 - 69) Ohkuma, T.; Koizumi, M.; Yoshida, M.; Noyori, R. *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 1749-1751.
 - 70) Noji, M.; Ohno, T.; Fuji, K.; Futaba, N.; Tajima, H.; Ishii, K. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 9340-9347.
 - 71) Nakamura, K.; Takenaka, K.; Fujii, M.; Ida, Y. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 3629-3631.
 - 72) Dunsmore, C. L.; Carr, R.; Fleming, T.; Turner, N. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 2224-2225.
 - 73) Turner, N. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, *8*, 114-119.
 - 74) Carr, R.; Alexeeva, M.; Enright, A.; Eve, T. S. C.; Dawson, M. J.; Turner, N. J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *42*, 4807-4810.
 - 75) Beard, T. M.; Turner, N. J. *Chem. Commun.*, **2002**, 246-247.
 - 76) Prelog, V. *Pure Appl. Chem.*, **1964**, *9*, 119-130.
 - 77) Hu, J.; Xu, Y., *Biotechnol. Lett.*, **2006**, *28*, 1115-1119.
 - 78) Zhu, D.; Yang, Y.; Hua, L. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 4202-4205.
 - 79) Riebel, B.; Hummel, W. *Biotechnol. Lett.*, **2001**, *23*, 231-234.
 - 80) Bradshaw, C. W.; Hummel, W.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 1532-1536.
 - 81) Berkessel, A.; Sebastian-Ibarz, M. L.; Müller, T. N. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6567-6570.
 - 82) Faller, J. W.; Lavoie, A. R. *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 3703-3706.

論文目録

1. Utility of ionic liquid for *Geotrichum candidum*-catalyzed synthesis of optically active alcohols

Takamasa Tanaka, Noritaka Iwai, Tomoko Matsuda, Tomoya Kitazume

J. Mol. Catal. B: Enzym., **2008**, doi:10.1016/j.molcatb.2008.07.011

2. Utility of ionic liquid for improvement of fluorination reaction with immobilized fluorinase

Noritaka Iwai, Takamasa Tanaka, Tomoya Kitazume

J. Mol. Catal. B: Enzym., **2008**, doi:10.1016/j.molcatb.2009.02.002

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成および発表に際して、終始、ご指導およびご鞭撻を賜りました東京工業大学大学院 生命理工学研究科教授 北爪 智哉博士に深く感謝致します。

また、本研究の遂行に関してのご指導、ご助言、ならびに本論文に関して審査およびご指導、ご助言を賜りました東京工業大学大学院 生命理工学研究科講師 松田 知子博士に心より御礼を申し上げます。

さらに、本論文に関して審査およびご指導、ご助言を賜りました東京工業大学大学院 生命理工学研究科教授 三原 久和博士、同大学大学院 生命理工学研究科助教授 小林 雄一博士、同大学大学院 生命理工学研究科講師 朝倉 則行博士に深く感謝致します。

また、本研究で研究室を使わせていただき、実験操作のご指導を賜りました松田研究室の方々に御礼を申し上げます。

そして、研究室生活の多岐に渡りご協力を頂いた東京工業大学大学院 生命理工学研究科助教 池田 博博士ならびに北爪研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、筆者を温かく見守ってくれた家族ならびに友人に感謝を申し上げます。

2009 年 3 月

田中 孝昌