

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360369

研究課題名(和文) 酵素反応と固体酸・塩基触媒の協調による環境調和型有機合成反応プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of environment benign synthetic process based on the enzymatic reaction using solid acid or base as a cooperative catalysis

研究代表者

伊藤 敏幸 (ITO, Toshiyuki)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50193503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：固体酸触媒であるゼオライトをラセミ化触媒に使用し、イオン液体を反応溶媒に用いるリパーゼ触媒不斉アシル化反応を組み合わせたアリールアルコールの動的光学分割(DKR)反応開発を検討した。ゼオライトは、H-beta-VALFOR CP811BL-25が最適であり、イミダゾリウム塩、もしくは4級アンモニウム塩イオン液体中でDKR反応に不可欠なラセミ化が進行し、これらの実験結果をもとに、イオン液体とヘキサンの混合溶媒システム、あるいはイオン液体コーティングで活性化したリパーゼPSとゼオライトを組み合わせたアリールアルコールのDKR反応プロセスを構築した。

研究成果の概要(英文)：Investigation for developing the efficient process of dynamic kinetic resolution (DKR) of secondary alcohols has been conducted: the desired DKR reaction has been accomplished through the combination of lipase-catalyzed enantioselective transesterification and zeolite-mediated racemization of the substrates. Among zeolites evaluated, H-beta-VALFOR CP811BL-25 was the best racemization catalyst and a mixed solvent system, hexane with ionic liquid was the suitable solvent system. Zeolite mediated racemization significantly depend on the ionic liquids, racemization proceeded smoothly in imidazolium or quaternary ammonium, while no racemization took place in phosphonium salts ionic liquids. It has also been established that a combination of ionic liquid coated lipase PS (IL1-PS) and H-beta-VALFOR CP811BL-25 in diisopropyl ether solvent system afforded good results and achieved efficient DKR system of aryl alcohols.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生体触媒工学 不斉合成 酵素反応 固体酸触媒 ラセミ化 イオン液体 動的光学分割(DKR)

1. 研究開始当初の背景

酵素は究極のグリーン触媒であり、今日ではキラルな医薬中間体分子の合成を目的に、ラセミ化合物の酵素による光学分割(KR)が工業的に使用されている。しかし、光学分割はラセミ体を分離する方法であるために、原理的に 50%しかエナンチオマーを得ることができない。医薬評価時には両対掌体の生理活性を評価する必要がある、このような用途のためには一挙に両エナンチオマーが得られる KR が良い方法であるが、すでに必要なエナンチオマーが決まっている場合、望む立体のエナンチオマーのみを収率 100%で得る方法が好ましい。そこで、最近では、ラセミ化反応と酵素触媒による不斉反応を組み合わせる動的光学分割法(DKR 反応)の開発に注目が集まっている。

酵素触媒による DKR 反応では基質分子のラセミ化と酵素反応による不斉化反応を組み合わせる必要がある。リパーゼは安定性が高く、安価な酵素として工業的に有用な酵素であり、その安定性のためにリパーゼと有機金属触媒反応を組み合わせることもでき、Bäckvall らはルテニウム錯体を使用してラセミ化を行い効率的な DKR 反応を達成している (J.-E. Bäckvall et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6535) (Fig. 1).

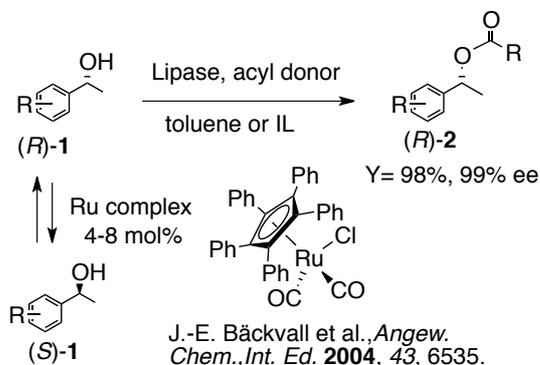


Figure 1. DKR reaction through Ru complex-mediated racemization of secondary alcohols

また、Lozano らは 1-フェニルエタノールのラセミ化が酸性イオン交換樹脂やゼオライトで起こることを明らかにし、リパーゼと共存させて DKR 反応を実現している (P. Lozano et al., *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1077) (Fig. 2).

いずれも優れた方法ではあるが解決すべき課題がある。すなわち、前者ではルテニウム触媒が必須であるが、ルテニウムなどの貴重な貴金属は限定して使うべきであり、貴金

属フリーのラセミ化法に切り替えることが望まれる。この観点で Lozano 法が環境調和型の DKR 反応として注目されるが、Lozano 法では超臨界二酸化炭素を使うために反応のスケールアップが難しいという問題があった。

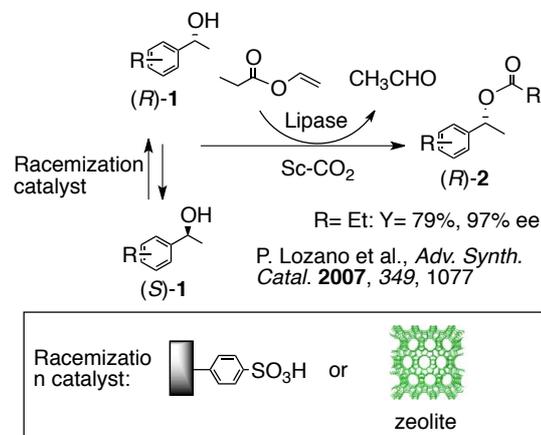


Figure 2. DKR reaction using ion exchange resin or zeolite as a racemization catalyst using sc-CO₂ solvent system

2. 研究の目的

本研究の目的は究極のグリーン触媒である酵素と固体酸・固体塩基触媒の協調で、遷移金属触媒フリーのバイオプロセスによる第 2 級アルコールの動的光学分割(DKR)反応を開発することである。

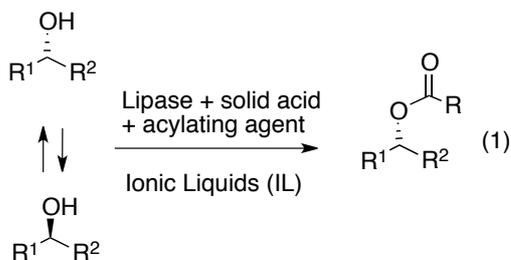
このような DKR 反応を実現させるためには、速いラセミ化と酵素の安定化が鍵になる。イオン液体は第三の液体と呼ばれ、近年注目が集まっている。筆者らはリパーゼがイオン液体中で高活性を示し、しかもイオン液体を適切に選ぶと、基質なしでも 2 ヶ月以上活性を失うことがないことを明らかにした (有機合成化学協会誌, **2009**, *67*, 143)。また、イオン液体は既存の非水溶媒を凌駕する高極性非水溶媒であり、ラセミ化はイオン液体中で加速されることが多い。従って、酵素反応の溶媒にイオン液体を溶媒に用いることで DKR 反応の効率向上が期待できる。そこで、本研究では、酵素反応と固体酸触媒とイオン液体という反応媒体との協調効果で DKR 反応プロセスの実現をめざして研究を行うことにし、酵素には加水分解酵素であるリパーゼを使うことにして研究計画を立案した。

3. 研究の方法

リパーゼは丈夫な酵素であり、貴金属触媒を共存させても活性を失うことなく、アシル化を触媒することが知られている。2 級アルコールのラセミ化を触媒する固体酸として

はゼオライトに着目し、ゼオライトで2級アルコールのラセミ化を行いつつ、リパーゼリパーゼで不斉アシル化を行う方法によるDKR 反応プロセスの開発を行うことにした (Eq. 1).

また、このときの反応溶媒にはできる限りイオン液体を活用することにした。イオン液体反応システムを使うとリパーゼの安定性が向上すると期待される。



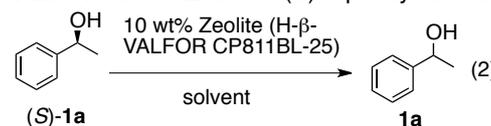
4. 研究成果

研究開始時点では、イオン液体溶媒中でのゼオライト触媒による2級アルコールのラセミ化反応の報告は皆無であったが、ゼオライトのラセミ化機能はイオン液体の種類に依存すると予想される。そこで、1-フェニルエタノール(**1a**)をモデル基質に用いてイオン液体溶媒中でゼオライトによるラセミ化を検討した。

予備的実験の結果、ゼオライトとしてはH- β -VALFOR CP811BL-25が1-フェニルエタノール(**1a**)をラセミ化する能力が高いことがわかった。そこで、ラセミ化触媒をゼオライトH- β -VALFOR CP811BL-25に固定して90% eeの基質アルコール**1a**に対して10 wt%使用し、各種溶媒中でラセミ化を検討した (Eq. 2, Table 1)。

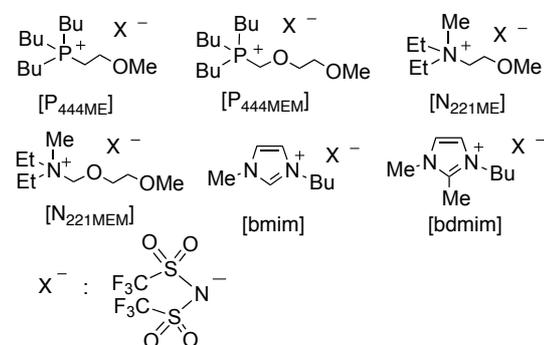
ラセミ化は温度と溶媒に大きく依存し、35°Cではラセミ化速度は低かったが、ヘキサンやトルエン中では60°Cで速やかにラセミ化が進行した(Entries 1 and 2)。また、ジイソプロピルエーテル(*i*-Pr₂O)溶媒ではラセミ化速度が低下した (Entry 3)。一方、ホスホニウム塩イオン液体中では全くラセミ化が進行しないことが分かったが(Entries 4 and 5)、アンモニウム塩イオン液体中では速やかにラセミ化が進行し(Entries 4 and 5)、なかでも当研究室で開発した[N₂₂₁MEM][NTf₂] (雑誌論文 8)で素早いラセミ化が進行した(Entry 5)。また、イミダゾリウム塩イオン液体、[bmim][NTf₂]、[bdmim][NTf₂]を溶媒とした場合もラセミ化が進行した (Entries 8 and 9)。

Table 1. Racemization of (*S*)-1-phenylethanol (**1a**)



Entry	Solvent	% ee of 1a	
		35°C	60°C
1	toluene	65	5
2	n-hexane	58	3
3	<i>i</i> -Pr ₂ O	86	17
4	[P ₄₄₄ ME][NTf ₂]	90	90
5	[P ₄₄₄ MEM][NTf ₂]	90	90
4	[N ₂₂₁ ME][NTf ₂]	85	3
5	[N ₂₂₁ MEM][NTf ₂]	85	0
8	[bmim][NTf ₂]	67	2
9	[bdmim][NTf ₂]	87	3

a) Determined by HPLC. Daicel CHIRALPAK OB-H, hexane/*i*-PrOH=20:1, 1.0 ml/min.



そこで、[N₂₂₁MEM][NTf₂]と[bmim][NTf₂]を溶媒に用いて酢酸ビニルをアシル化剤に使用して丈夫なリパーゼとして知られる *Candida antarctica* lipase (CAL-B)による不斉アシル化でDKR 反応を行った。ところが、これらのイオン液体を溶媒に用いた場合、目的とする(*R*)-**2a**は>99%eeで得られるものの、基質2量体である**3**が大量に副生し、(*R*)-**2a**の収率が上がらないという問題が生じた (Fig.3)。

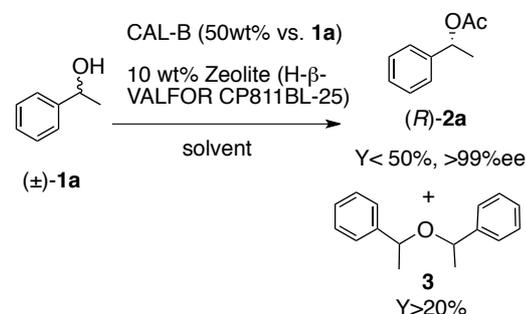


Figure 3. CAL-catalyzed DKR reaction of 1-phenylethanol in the presence of zeolite

このために、溶媒をイオン液体からヘキサ

ンに変更したが、同様に2量体が大量に副生することがわかった。このために、反応基質、ゼオライト、反応溶媒の最適化をさらに詳細に行った結果、アシル化剤にペンタン酸ビニルを使用し、(±)-1-インダノール (**4**) を基質に、溶媒にはイオン液体[N₂₂₁MEM][NTf₂]とヘキサンの混合溶媒を用いると2量体の生成が抑えられ、目的とする(*R*)-**5** を収率 84%で得ることができたが、エナンチオ選択性は 81% ee と不十分な結果であった (Fig.4)

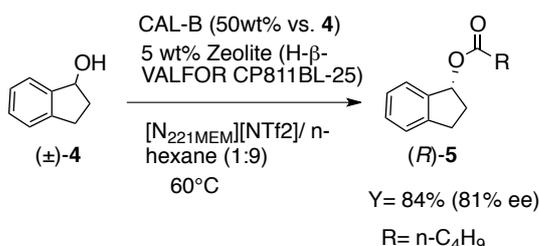


Figure 4. CAL-catalyzed DKR reaction of 1-indanol in the presence of zeolite

そこで、リパーゼを CAL-B から我々の研究室で開発したイオン液体コーティングリパーゼ IL1-PS(東京化成 TCI-B302)に変更し、さらなる条件検討を行った。モデル反応基質に 1-フェニルエタノール(**1a**)を使用して酵素は IL1-PS、ゼオライトに H-b-VALFOR CP811BL-25 を使用した場合、アシル化剤にオクタン酸ビニル、溶媒に *i*-Pr₂O を使用すると2量体 **3** の生成が抑えられることがわかり、目的とするオクタン酸エステル(*R*)-**2c** を収率 76%、>98% ee で得ることができた(Fig.5).

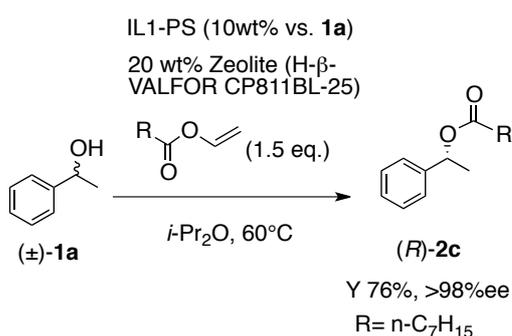


Figure 5. IL1-PS-catalyzed DKR reaction of 1-phenylethanol in the presence of zeolite

ゼオライトでラセミ化できる反応基質を探索したところ、ベンジル位に水酸基をもつアリールアルコールでは円滑なラセミ化が進行し DKR 反応が実現したが、脂肪族アルコールではラセミ化が全く進行せず、また、

ラセミ化が進行しやすいと期待されたアリールアルコールでも H-β-VALFOR CP811BL-25 では全くラセミ化が起こらなかった。アリールアルコールのラセミ化を触媒できるゼオライトをさらに探索したが、より酸性の強いゼオライトを使用するとラセミ化のみならず、副反応が起きるために複雑な混合物を与え、DKR 反応に適応することができるゼオライトを見つけることができなかった。このため、リパーゼと固体酸触媒(ゼオライト)を用いる DKR 反応は、残念ながら適応基質に制限があることがわかった(論文投稿中)。

なお、本研究の過程で得られたリパーゼ活性化の手法で低温でのリパーゼ触媒アシル化を行うことで、第1級水酸基を持つニトロアルコールの光学分割を行い、生理活性化合物の合成に応用した(雑誌論文 9)。

さらにイオン液体のデザインを検討する中でセルロースやリグニンを溶解できるイオン液体の開発にも成功した(雑誌論文 3, 6, 10)。

リパーゼに限らず、ラッカーゼを IL1 でコーティングして数種のケトンを経基質に Baeyer-Viliger 酸化反応について検討したが、純イオン液体と有機溶媒中では全く活性が認められず、また緩衝液を使用した場合、native 酵素とイオン液体コーティング酵素との間にわずかに活性差が認められたが、有意な差で再現性を確認するに至らなかった。今後、コーティング剤としてのイオン液体のデザインをさらに詳細に検討する予定である。

【おわりに】

DKR 反応は、酵素によるスムーズな不斉アシル化とラセミ化速度のタイミングを合わせる事が重要であった。2量体生成がゼオライトにより促進される理由はまだ不明であり、今後さらに詳細な研究が必要である。

本研究過程で様々なイオン液体を合成し、反応溶媒として評価してきたが、このなかで Pd 触媒アリール位アルキル化(雑誌論文 14)に適したイオン液体を見いだすことができた。また、イオン液体コーティングによる酵素活性を考えるうえで、セルロースやリグニンの溶解に使えるイオン液体デザインのヒントが得られ、新たな研究を展開する契機になった。溶媒は化学反応の基本であり、新しい溶媒が化学反応の成果を支配することを改めて実感している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)。

本研究課題及び派生して得られた成果に関する査読付発表論文のみを示す。

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 1) 有機合成におけるイオン液体化学のトレンド, 伊藤敏幸, 有機合成化学協会誌, **2014**, 72, 518-528.
- 2) Synergetic Activation of Lipase by an Amino Acid with Alkyl-PEG-sulfate Ionic Liquid, Yoshiyama, K.; Abe, Y.; Hayase, S.; Nokami, T.; Itoh, T.* *Chem. Lett.* **2013**, 42, 663-665. DOI: 10.1246/cl.130171, **Editor's choice.**
- 3) Possible Means of Realizing a Sacrifice-free Three Component Separation of Lignocellulose from Wood Biomass Using an Amino Acid Ionic Liquid, Hamada, Y.; Yoshida, Y.; Asai, A.; Hayase, S.; Nokami, T.; Izumi, S.; Itoh, T.* *Green Chem.* **2013**, 15, 1863-1868. DOI:10.1039/C3GC40445E.
- 4) A Chronicle Review: Regioselective Synthesis of Trifluoromethyl Group Containing Allylic Amines using Palladium-catalyzed Allylic Amination Pathway, Hirakawa, T.; Kawatsura, M.*; Itoh, T.* *J. Fluorine Chem.*, **2013**, 152, 62-69. DOI: 10.1016/j.jfluchem.2013.03.008
- 5) Structure of regenerated celluloses treated with ionic liquids and comparison of their enzymatic digestibility by purified cellulase components, Mizuno¹, M.; Kachi S.; Togawa, E.; Hayashi, N.; Nozaki, K.; Itoh, T.*; Amano, Y.^{1,*} *Aust. J. Chem.* **2012**, 65, 1491-1496. DOI: 10.1071/CH12342
- 6) Amino Acid Ionic Liquid as an Efficient Cosolvent of Dimethyl Sulfoxide to Realize Cellulose Dissolution at Room Temperature, Ohira, K.; Yoshida, K.; Hayase, S.; Itoh T.* *Chem. Lett.* **2012**, 41, 987-989. DOI:10.1246/cl.2012.987
- 7) Ionic Liquid Engineering for Lipase-mediated Optical Resolution of Secondary Alcohols: Design of Ionic Liquids Applicable to Ionic Liquid Coated-Lipase Catalyzed Reaction, Abe, Y.; Yagi, Y.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Itoh, T.* *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **2012**, 51, 9952-9958. DOI:10.1021/ie202740u
- 8) Heck-Matsuda Reaction for Allylic Nitro Compounds: A Short Asymmetric Synthesis of an FTY720 Derivative, Nakano, T.; Miyahara, M.; Itoh, T.*; Kamimura, A.* *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2161-2166. DOI: 10.1002/ejoc.201101703
- 9) Design of Cellulose Dissolving Ionic Liquids Inspired by Nature, Ohira, K.; Abe, Y.; Suzuki, K.; Mizuno, M.; Amano, Y.; Itoh, T.* *ChemSusChem*. **2012**, 5, 388-391. DOI: 10.1002/cssc.201100427
- 10) Regioselective synthesis of trifluoromethyl group containing allylic amines by palladium-catalyzed allylic amination and

sequential isomerization, Hirakawa, T.; Ikeda, K.; Ikeda, D.; Tanaka, T.; Ogasa, H.; Kawatsura, M.; Itoh, T.* *Tetrahedron*, **2011**, 67, 8238-8247. DOI:10.1016/j.tet.2011.08.093

- 11) Chemo-Enzymatic Synthesis of a Multi-useful Chiral Building Block Molecule for the Synthesis of Medicinal Compounds, Nakano, T.; Yagi, Y.; Miyahara, M.; Kaminura, A.*; Kawatsura, M.; Itoh, T.* *Molecules*, 2011, 16, 6747-6757. DOI: 10.3390/molecules16086747
- 12) Palladium-catalyzed Regio- and Diastereoselective Allylic Alkylation in Ionic Liquids, Kawatsura, M.*; Nobuto, H.; Hayashi, S.; Hirakawa, T.; Ikeda, D.; Itoh, T.* *Chem. Lett.* 2011, 40, 953-955. DOI:10.1246/cl.2011.953

〔学会発表〕(計 45 件)

- 1) ホスホニウムカチオン系アルキル PEG イオン液体によるリパーゼ触媒アシル化の活性化, 松原佑衣・原見 浩幸・野上 敏材・伊藤 敏幸, 第 17 回生体触媒化学シンポジウム, 2013/12/20-21, 岡山市, 岡山理科大学, ポスター.
- 2) イオン液体溶媒を用いる減圧条件下リパーゼと固体酸触媒による第 2 級アルコールの DKR 反応, 高田 祐希・原見 浩幸・早瀬 修一・野上 敏材・伊藤 敏幸, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 23 日-25 日, 3D4-11, 滋賀県、立命館大学草津キャンパス, 口頭.
- 3) 固体酸触媒とリパーゼの協調による第 2 級アルコールの DKR 反応, 原見浩幸・霜村 賢一・早瀬修一・野上敏材・片田直伸・伊藤敏幸, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 23 日-25 日, 3D4-10, 滋賀県、立命館大学草津キャンパス, 口頭.
- 4) イオン液体コーティングリパーゼを用いる不斉アシル化反応, 原見浩幸・霜村賢一・早瀬修一・片田直伸・伊藤敏幸, 2012 年日本化学会西日本大会, IL02, 2012 年 11 月 9-11 日, 佐賀, 口頭.
- 5) Design of Ionic Liquids for the Ionic Liquid-Coated-Lipase, Toshiyuki Itoh, 2012 International Symposium on Advanced Biological Engineering, IS-I-7, October 25-28, 2012, Guilin, Guangxi, China, 基調講演.
- 6) 固体酸触媒とリパーゼの協調による DKR 反応の開発, 霜村賢一・原見浩幸・早瀬修一・川面 基・片田直伸・伊藤敏幸, 日本化学会第 92 春季年会, 横浜、慶応大学日吉、2012 年 3 月 25 日-29 日, ポスター.
- 7) Ionic Liquid Technology for Biotransformation : Recyclable Use of Ionic Liquid Coated-Enzyme Using an Ionic Liquid

- Solvent System, Toshiyuki Itoh^{*}, Yusuke Yagi, Ken-ichi Shimomura, Shuichi Hayase, Motoi Kawatsura, 243rd ACS National Meeting, San Diego, CA, San Diego, コンフェレンスセンター, California, March 25-29, 2012, 依頼講演.
- 8) Rational Design of Ionic Liquids for Lipase-catalyzed Reactions, Toshiyuki Itoh, 14th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress, 2012年2月20日～平成24年2月24日/シンガポール, 招待講演.
- 9) Rational Design of Ionic Liquids for Lipase-mediated Reactions, Toshiyuki Itoh, The 4th Congress on Ionic Liquids (COIL4), Washington DC, USA, 2011/6/15, 基調講演.
- 10) Rational Design of Ionic Liquids Appropriate for Lipase-mediated Reactions, Toshiyuki Itoh, Ionic Liquid Symposium at KICChE (Korea Inst. of Chem. Eng.) Spring Meeting, Changwon, Korea, 2011/4/29, 招待講演.
- 35 件省略

[図書] (計 8 件)

- 1) 23章生物化学的合成法, 23.5有機溶媒やイオン液体を溶媒に用いたリパーゼ触媒による光学活性アルコールの合成, 伊藤敏幸, 有機合成実験法ハンドブック, 有機合成化学協会編, 丸善出版, 東京(2014), 印刷中.
- 2) Design of ionic liquids for cellulosed dissolution, Itoh, T.: Eds: Zhen Fang, Richard, L. S mith, Jr., Xinhua, Q I, Production of Biofuels and Chemicals with Ionic Liquids, Biofuels and Biorefineries Volume 1, Springer (New York), pp-91-106 (2014) , ISBN 978-94-007-7710-1.
- 3) 第4章, 化学合成技術, 4.6.b.液-液異相系反応: イオン液体・フルオラス液体 伊藤敏幸, 化学便覧 応用化学編 第7版, 編集委員長辰巳敬, 公益社団法人日本化学会, 丸善出版(東京), (2014) . ISBN 978-4-621-08759-6
- 4) 第3章2節: イオン液体を溶媒に用いた光学活性アルコールの合成, 伊藤敏幸, 新しい溶媒を用いた有機合成, S&T出版(東京), pp. 184-194 (2013). ISBN:978-4-907002-10-7
- 5) 第2章 (2.1.1, 2.4.1) , 伊藤敏幸, イオン液体の化学-次世代液体への挑戦-, イオン液体研究会監修, 西川恵子・大内幸雄・伊藤敏幸・大野弘幸・渡邊正義編, 丸善出版(東京) pp. 147-163, pp. 202-217 (2012) . ISBN978-4-621-08612-4
- 6) 第3章: 合成・触媒反応への適応, 伊藤敏幸, 最先端材料システムワンポイントシリーズ 2, イオン液体, 高分子学会編, 共立出版(東京) , pp.39-60 (2012) . ISBN 978-4-320-04426-5.

- 7) 5.19 Addition Reaction: 1,4-Addition Heteroatom, Kawatsura, M.; Itoh, T. “Comprehensive Chirality (CHIR)” Ed. Maruoka, K. Volume 5: Synthetic Methods IV – Asymmetric Oxidation Reduction, C–N, Elsevier, pp.436-469 (2012), ISBN: 978-0-08-095167-6
- 8) イオン液体を反応媒体に用いる酵素触媒反応, 伊藤敏幸, バイオテクノロジーシリーズ, 酵素開発・利用の最新技術, 監修: 今中忠行, CMC出版, 東京(2011), 8月, 第4編第1章, pp.153-167. 普及版, ISBN 978-4-7843-0357-4-C3045

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤敏幸 (ITOH, Toshiyuki)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号: 50193503

(2) 研究分担者, (3) 連携研究者
該当なし ()