

保健食品クロレラ製剤：グロスミンの生体触媒としての応用

石原浩二* 中島伸佳**

要旨：新規な生体触媒の探索研究、および、保健食品の新たな利用法の開拓研究の一環として、ドラッグストア等で市販されているクロレラ錠剤（商品名：グロスミン）を生体触媒として用いたカルボニル化合物の立体選択的還元について検討した。基質としては、脂肪族 α -ケトエステルであるピルビン酸エチル、2-オキソペンタン酸エチル、2-オキソヘプタン酸エチル、3-メチル-2-オキソブタン酸エチル、脂肪族 β -ケトエステルであるアセト酢酸メチル、アセト酢酸エチル、4-クロロアセト酢酸エチル、そして、芳香族ケトンであるアセトフェノンを用いた。その結果、ケトエステル類に対しては高い還元活性を示すことが分かり、また、反応溶媒を生理食塩水から水へと変更することで、生成物の還元率や立体選択性が改善された。以上、クロレラ錠剤であるグロスミンが、乾燥パン酵母等と同様に、Ready-to-Use（培養操作なしですぐに利用可能）な生体触媒としての利用可能であることが分かった。

キーワード：緑藻、クロレラ、生体触媒、不斉合成、光学活性

1. はじめに

光学的に純粋な光学活性化合物を合成することは、医薬品等の各種生理活性物質の合成だけでなく、液晶材料、生分解性ポリマー等の機能性材料の開発においても重要なテーマとなっている。それ故に、高効率で高立体選択的な不斉合成は、今日の有機化学分野における最も重要な研究課題の一つとされている。特に、地球環境の汚染や資源枯渇が深刻化する現代においては、人類の生活環境だけでなく、他の生物が生息する自然環境にも配慮したグローバルな視点に立った光学活性化合物の合成方法が求められている。

不斉合成法は、不斉配位子を有する有機金属等を利用する「化学的手法」と微生物や酵素などの生体触媒を利用する「生物化学的手法」の二つに大別される。後者は、人体に有害な物質を使わないこと、また、生物機能の有効利用という点で環境に優しい不斉合成法として大変注目されている。

これまでに、パン酵母を生体触媒として用いた研究報告は多数存在していた¹⁻⁶⁾が、その他の微生物を用いた報告例は少なかった。この理由の一つに、パン酵母は圧搾酵母（生イースト）としても乾燥酵

母（ドライイースト）としても市販されており、利用者は培養することなく、ready-to-useな触媒として利用が可能である点が挙げられよう。そのような中、新規な生体触媒探索研究の一環として、緑藻の一種であるクロレラに、ケトエステル類に対する優れた還元能力の存在が報告された^{7,8)}。クロレラは優れた生体触媒であるが、不斉合成に利用される微生物の中では、増殖速度が比較的遅く、また、照明や通気（炭酸ガスなど）が必要など、培養方法が煩雑であり、一般的な有機合成化学者には簡単に扱えない微生物であるのが欠点であった。

そこで、市販されているクロレラの錠剤を生体触媒として利用できれば、培養に関するデメリットを解消でき、生体触媒としての価値を高めることが出来るのではないかと考えた。本研究では、保健食品として市販されているクロレラを生体触媒として用いたカルボニル化合物の還元について検討し、生体触媒としての可能性について明らかにすることを目的とした（図1）。

* 岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

** 岡山理科大学理学部臨床生命科学科

〒719-1197 岡山県総社市窪木111

〒701-0005 岡山県岡山市北区理大町1-1

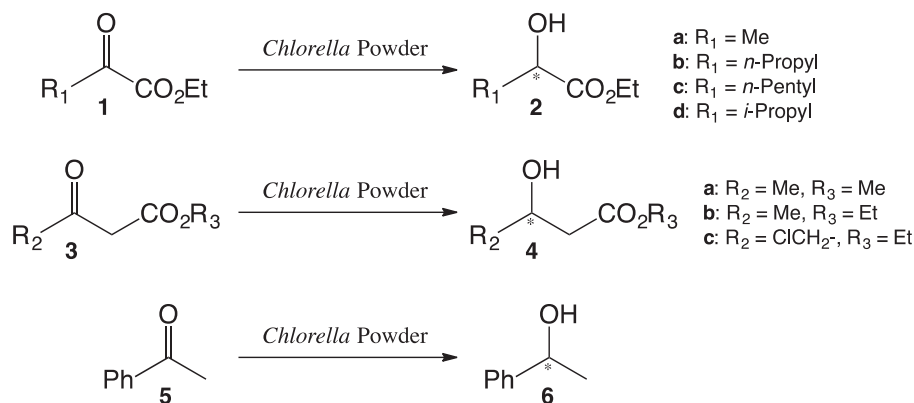


図1. クロレラ粉末によるカルボニル化合物の還元

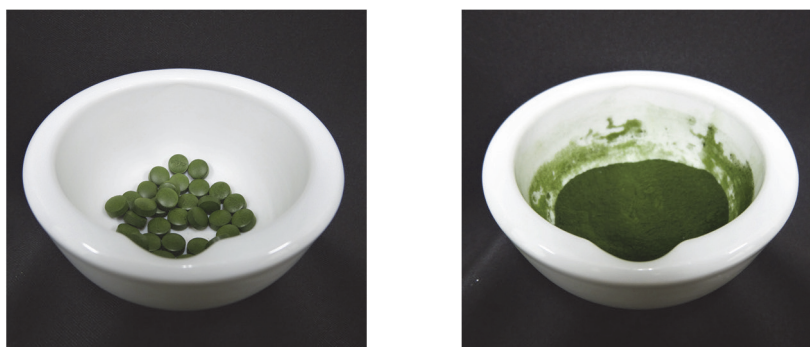


図2. 市販クロレラ錠剤 (左) を粉末化後のクロレラ (右)

2. 実験材料と方法

クロレラ製剤はクロレラ工業(株)のグロスミンを使用し、錠剤を乳鉢ですり潰した粉末状のクロレラを用いた(図2)。ピルビン酸エチル(1a)、アセト酢酸メチル(3a)、アセト酢酸エチル(3b)、4-クロロアセト酢酸エチル(3c)、アセトフェノン(5)、フェネチルアルコール(6)は和光純薬株式会社より、3-メチル-2-オキソブタン酸エチル(1d)はシグマアルドリッチ株式会社より購入し、2-オキソペンタン酸エチル(1b)、2-オキソヘプタン酸エチル(1c)、および、還元生成物であるヒドロキシエステル類(2, 4)については文献にしたがって合成した⁶⁾。

クロレラ粉末0.5g、生理食塩水(0.85% NaCl aq.)もしくは水20mL、基質0.15mmolを大型試験管内で混合し、暗所、25°C、60度に傾斜させて水平方向に好氣的に72時間振盪した。反応終了後、反応液の一部(0.5mL)を珪藻土カラム(φ0.8cm x 4cm)にアプライし、ジエチルエーテル(3mL)を

用いて固相抽出を行い、窒素気流下で濃縮した。還元率(アルコール体への変換率)と立体選択性については、キャピラリーカラムを用いたGLC分析により決定した。

3. 結果と考察

1) α-ケトエステル(1)の還元

生理食塩水(0.85% NaCl aq.)を反応溶媒として用いた場合、脂肪族α-ケトエステルとして代表的なピルビン酸エチル(1a)、2-オキソペンタン酸エチル(1b)、2-オキソヘプタン酸エチル(1c)、3-メチル-2-オキソブタン酸エチル(1d)の全てにおいて、対応する(*S*)-ヒドロキシエステルへの還元を確認出来た(表1左欄)。特に、1aは立体特異的(>99% e.e.)に(*S*)-乳酸エチル(2a)へと還元された。一方、水を反応溶媒にした場合(表1右欄)、試した基質全てにおいて還元率(変換率)が改善され(>85%)、中でも、3-メチル-2-オキソブタン酸エチル(1d)は>99%の還元率、>99% e.e.で

表1. グロスミンを用いた α -ケトエステルの還元

Products	0.85% NaCl aq.			Water		
	conv.(%)	e.e.(%)	(R/S)	conv.(%)	e.e.(%)	(R/S)
2a	57	>99	S	96	>99	S
2b	76	74	S	90	80	S
2c	51	70	S	85	78	S
2d	73	96	S	>99	>99	R

表2. グロスミンを用いた β -ケトエステルおよびアセトフェノンの還元

Products	0.85% NaCl aq.			Water		
	conv.(%)	e.e.(%)	(R/S)	conv.(%)	e.e.(%)	(R/S)
4a	69	70	S	78	>99	S
4b	>99	83	S	>99	>99	S
4c	89	98	R	>99	>99	R
6	<1	---	--	<1	---	--

(R)-2-ヒドロキシ-3-メチルブタン酸エチル (2d) へと還元され、栄養食品クロレラが α -ケトエステルの還元には有用であることが示唆された。

2) β -ケトエステル (3)、および、アセトフェノン (5) の還元

生理食塩水を反応溶媒とした場合 (表2左欄)、アセト酢酸エチル (3b) の還元率は >99% であり、4-クロロアセト酢酸エチル (3c) では高立体選択的 (98% e.e.) に R 体のヒドロキシエステル (4c) へと還元された。一方、溶媒を水へ変更すると (表2右欄)、 β -ケトエステルは試した3種の基質全てにおいて高い還元率、かつ立体特異的 (>99% e.e.) に β -ヒドロキシエステルへと還元されることが分かった。しかし、芳香族ケトンとして代表的なアセトフェノンについては、生理食塩水中、および、水中のいずれにおいても生成物 (6) は検出されず、還元されないことがわかった。

3) グロスミンの生体触媒としての可能性について

以上の実験結果により、市販品であるグロスミン (クロレラ錠剤) に、 α -、および、 β -ケトエステルに対する還元活性が存在することは明確になったが、この還元作用の要因としては大きく分けて、1) グロスミンはクロレラの細胞を破碎して消化吸収しやすいことになっているが、実はグロスミン中にクロレラの生菌が残存しており、それが触媒として作用している、2) グロスミン中のクロレラ細胞は十分に破碎されていて、その上でクロレラ細胞に含まれていた酵素が失活せずに残存しており、その酵素が触媒として直接作用しているという2つの可能性が考えられる。

そこで、これらの可能性について調査するため、グロスミン粉末の一部をクロレラ生育用寒天培地へ植菌し、光照射下で培養を試みたが、クロレラの生育は確認できなかった。つまり、グロスミン中に残存しているクロレラ生菌が触媒として作用したのではなく、加工段階で破壊されたクロレラ細胞内に存

在していた酵素が触媒として作用したと考えられる。今後、還元可能な基質の範囲を詳細に調査すると同時に、補酵素再生系についても精査し、保健食品グロスマインの生体触媒としての有用性を高めていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Servi, S. (1990) Baker's yeast as a reagent in organic synthesis. *Synthesis*, 1-25.
- 2) Nakamura, K., Miyai, T., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A. (1988) Enantioselective reduction of 2-methyl-3-oxopropionate by baker's yeast. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 61, 2089-2093.
- 3) Nakamura, K., Kawai, Y., Oka, S., Ohno, A. (1989) Stereochemical control in microbial reduction. VIII. Stereochemical control in microbial reduction of β -keto esters. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62, 875-879.
- 4) Nakamura, K., Kawai, Y., Ohno, A. (1990) A novel method to synthesize (L)- β -hydroxy esters by the reduction with baker's yeast. *Tetrahedron Lett.*, 31, 267-270.
- 5) Nakamura, K., Kondo, S., Kawai, Y., Nakajima, N., Ohno, A. (1994) Purification and characterization of α -keto ester reductases from baker's yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 2236-2240.
- 6) Nakamura, K., Inoue, K., Ushio, K., Oka, S., Ohno, A. (1998) Stereochemical control on yeast reduction of α -keto esters. Reduction by immobilized baker's yeast in hexane. *J. Org. Chem.*, 53, 2589-2593.
- 7) Ishihara, K., Yamaguchi, H., Adachi, N., Hamada, H., Nakajima, N. (2000) Stereocontrolled reduction of α - and β -keto esters with micro green algae, *Chlorella strains*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(10), 2099-2103.
- 8) Ishihara, K., Iwai, R., Yoshida, M., Morishita, M., Yamaguchi, H., Nakajima, N. (2011) Purification and characterization of a novel keto ester reductase from the green alga, *Chlorella sorokiniana*: Comparison of enzymological properties with other microbial keto ester reductases. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 17-24.

Stereoselective reduction of carbonyl compounds with a commercially available supplement food, *Chlorella* powder “Grosmin”

KOJI ISHIHARA*, NOBUYOSHI NAKAJIMA**

**Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

***Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja, Okayama, 719-1197, Japan*

Abstract : To research the potential ability of a commercially available supplement food to act as biocatalyst, we screened *Chlorella* powder, “Grosmin” for stereoselective reduction of some carbonyl compounds. It was found that the powder possessed a reducing activity toward various aliphatic keto esters. In particular, ethyl acetoacetate and ethyl 4-chloroacetoacetate were reduced by the powder in the water to the corresponding β -hydroxy esters with high conversion ratios (>99%) and excellent enantiomeric excesses (>99% e.e.). Thus, we found that the *Chlorella* powder has great potential to be used as a biocatalyst for the stereoselective reduction of α - and β -keto esters.

Keywords : micro green algae, *Chlorella*, biocatalyst, asymmetric synthesis, chirality