

研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

1. 研究課題名

天然リグニンの逐次構造変換による芳香族原料化およびその利用

2. 研究代表者

三亀 啓吾（三重大学 大学院生物資源学研究科 特任准教授）

3. 研究シーズ探索成果の概要

本研究は植物主要構成成分リグニンから石油代替芳香族化学原料を得るため相分離系変換システムにより得られるリグノフェノールをアルカリ処理やルイス酸処理、微生物変換などにより逐次構造変換し、最終的にモノフェノールへと誘導することを目的とした。

低フェノール活性ではあるが潜在的フェノール活性を持つ天然リグニンを相分離系変換処理により、ベンジルエーテルの開裂およびフェノールグラフィティングにより高フェノール活性であるリグノフェノールに変換、続いて、アルカリ二次機能変換によりリグニンの主要単位間結合である β -エーテル結合を開裂、そして、ルイス酸処理によりリグニン芳香核メトキシル基を脱メチル化とモノフェノール化することにより、逐次リグニン潜在的フェノール性水酸基を活性化することが可能であった。これはリグニン生合成過程の逆経路に従っている。また、このようなリグニンエーテル結合の逐次開放は、生態系でのリグニン分解機構にも類似している。

4. 研究シーズ探索のねらい

現在の我々の生活を支えている石油は、ガソリン、軽油、重油などのエネルギーとしての役割、そして、プラスチック、溶剤、合成繊維、接着剤などの原料としての役割を果たしている。石油代替エネルギーは、太陽エネルギー、燃料電池、地熱などにより代替できる可能性はある。一方、石油代替化学原料は、石油に含まれる脂肪族化合物と芳香族化合物の両方を持つ植物資源以外の候補は考えられない。

近年、サトウキビ、トウモロコシなどの植物資源からバイオエタノールや生分解性プラスチック、パームオイルや大豆油を用いた洗剤やバイオディーゼルなどが実用化されている。これらは主に植物資源の炭水化物や脂質から誘導した脂肪族化合物としての利用が中心となっている。しかし、石油代替化学原料のもう1つの重要な芳香族化合物の植物資源からの代替は進展していない。この芳香族化合物の代替原料としてなりうるのが、リグノセルロース資源に約 30%含まれるリグニンと言われている。

リグニンは、炭水化物と比べ難分解性物質であるため、植物の枯死後、土壌中で徐々に分解されフミン系物質となり、土壌中で長期にわたり堆積し、様々な機能を果たしながらさらに分解し、最終的には CO_2 へと変換され、大気に戻る。したがって、リグニンは炭水化物よりも長期にわたり利用しないと生態系を乱す可能性がある。このリグニンの土壌中における逐次分解機能化反応を参考に石油代替原料として長期循環活用することが重要である。

石油代替芳香族化学原料として食品と競合しないリグノセルロース系植物の主要構成成分の一つであるリグニンの有効利用が重要である。三重大学船岡らが開発した相分離系変換システ

ムは、リグノセルロース系材料を常温、常圧下で分子機能変換と分離を達成する手法である。これは、炭水化物とリグニンの完全分離のみならず、構造制御が困難なリグニンを機能性素材(リグノフェノール)へと精密変換し得るシステムである。現在、このリグノフェノールのフェノール活性や熱可塑性特性を利用し、様々な分野への応用研究が行われている。

そこで本研究では、リグノフェノールがその構造内に比較的開裂が容易であるエーテル結合を多く残していることを利用し、種々の方法によりリグノフェノールを低分子化し、芳香族化学原料に適した化合物に変換を行い、石油に依存しないシステムの開発を行う。

また、植物資源の石油代替化学原料化を進めるためには、その過程で高付加価値製品の開発を行い、コスト的にもシステムとして流れるようにする必要がある。分解過程で生じる低分子化体の高付加価値用途への応用も検討する。リグニン分解物には、植物抽出成分には含まれない新規化合物が含まれていることから、その生理活性などの新しい機能を有していることが期待される。

相分離系変換システムは、植物の主要構成成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンを迅速かつ定量的に分離・機能変換することが可能である。これにより天然リグニンはその最も反応活性なベンジル位にフェノールが結合し、1,1-ビスアリールプロパン構造を持つリグノフェノールへと変換される。この時使用するフェノールは、現在石油由来のフェノールを使用している。本研究では、このリグノフェノールを逐次構造変換し、最終的にモノフェノールを誘導する。これにより、自立型植物資源の石油代替原料変換システムを確立する。

石油危機によりガソリン等のエネルギー価格の高騰が経済に大きな影響を与えるが、その後、工業原料の枯渇による産業へ大きな影響が出ると予測される。特に油田を持たない工業国である日本が受ける影響が大きい。現在の文明を維持するためにはエネルギー以上に石油代替原料の開発が重要である。脂肪族及び芳香族の両方を持つ植物資源を効率よく分離し、逐次構造変換を行いながらカスケード的に長期循環利用し、石油代替原料として現在の工業原料から少しずつ変更することにより、石油使用のコックを徐々に閉じていくことにより低炭素社会をつくることを目指す。

5. 研究シーズ探索の方法と成果

5.1 方法

① リグノフェノールの大量調製

リグノフェノールのモノフェノール化およびリグノフェノール低分子化体の用途開発の検討を行うため、リグノフェノールの大量調製を行った。

三重大学内植物資源変換プラント(パッチ式相分離系変換システムプラント)を使用し、針葉樹であるスギ木粉から導入フェノール誘導体として *p*-cresol を用いて、7kg の木粉からスグリグノクレゾールを調製した。

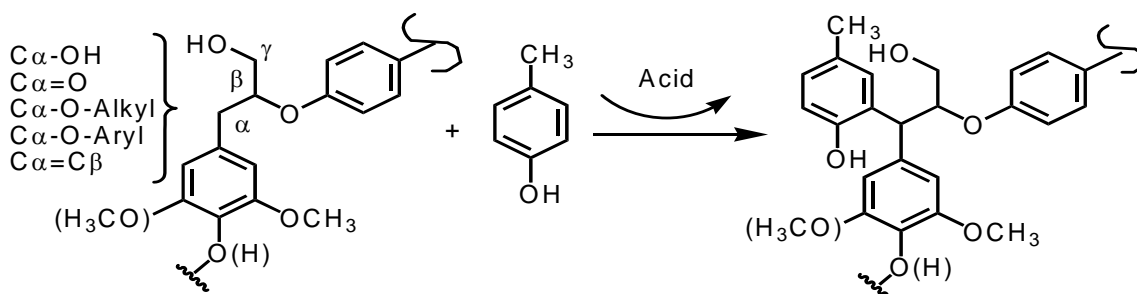


図1 天然リグニンの相分離系変換システムによるリグノフェノールへの変換

② リグノフェノールアルカリ処理のスケールアップ

天然リグニンから相分離系変換処理により誘導されたリグノフェノールは、アルカリ処理を行うと容易に低分子化することが可能である。これまでの検討結果から、リグノフェノールのアルカリ処理は、0.5～1.0N NaOH, 140～170℃, 60～90 分処理を行ってきた。低分子化機構は図 2 のメカニズムであった。この処理により平均分子量 8000～15000 リグノフェノールは、2 量体レベルまで分解可能である。しかし、現在の研究室の設備では、1 回 15g の処理が最大であり、低分子化体の用途開発を行うには、スケールアップが必要である。高温タイプのオートクレーブ等によるリグノフェノールアルカリ処理のスケールアップ検討を行った。

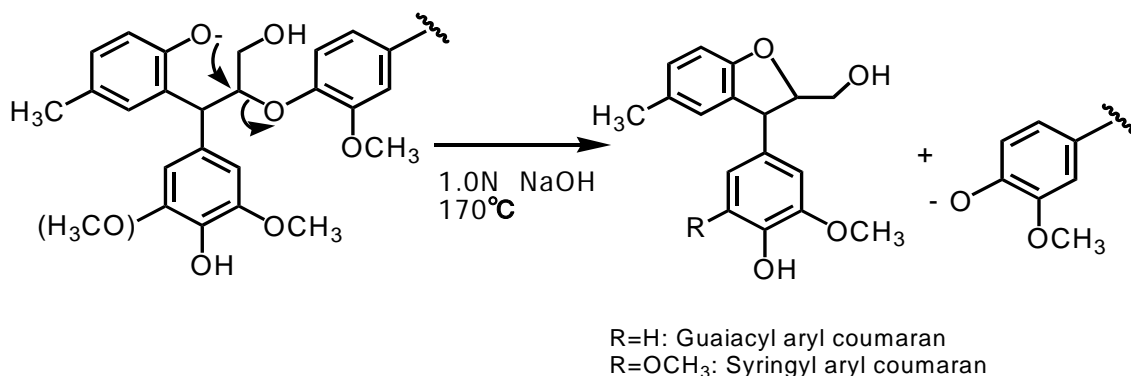


図 2 リグノフェノールのアルカリ低分子化

③ リグノフェノールアルカリ分解物のモノフェノール化

リグノフェノールに含まれるジフェニルメタン構造は、ルイス酸処理により脱アルキル化し、モノフェノールを分離することが可能である。ルイス酸触媒である BF_3 を用いたリグニンの側鎖一芳香核間結合を選択的かつ定量的に解裂させる手法である核交換法によりリグノフェノールアルカリ低分子化体のモノフェノール化を行なった(図 3)。

試料として針葉樹スプルースリグノクレゾール(LCspr), 広葉樹カバリグノクレゾール(LCbir)の 170℃アルカリ低分子化体(LCspr 170C, LCbir 170C), これらを分取 GPC を用いて分子量分画した高分子画分(LCspr170C,F1, LCbir170CF1)および低分子画分(LCspr 170CF2, LCbir 170CF2)を核交換処理した。低分子画分を ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, LC/MS, GC/MS で分析した結果、針葉樹では Guaiscyl aryl coumaran, 広葉樹では Syringyl aryl coumaran であった。

核交換試薬は、Phenol / Xylene / BF_3 -phenol complex = 19 / 10 / 2.5(v/v)の比率とした。核交換処理は、各 Lignocresol アルカリ低分子化体試料 5.6mg を 1ml 試験管に採り、核交換試薬 0.2ml を加え、110℃のオイルバスで 4 時間処理した。4 時間後、冷却し、処理液に内部標準物質として 4,4'-biphenol を加えた。これを飽和食塩水、ジエチルエーテルで分液し、ジエチルエーテル層を LC/MS にて分析した。

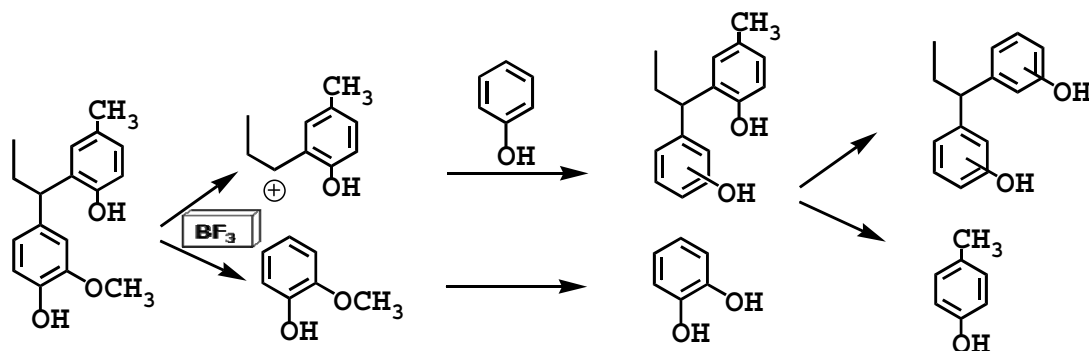


図 3 核交換反応による針葉樹リグノクレゾールからのモノフェノールの変換

④ リグノフェノール分解物の用途開発

リグノフェノール分解物は天然リグニンより誘導されているが、自然界には存在しない構造特性を有している。2 量体レベルまで分解すると構造決定も可能であることから、新規な生理活性物質となりうる可能性がある。これまでの天然生理活性成分の利用は、植物等に含まれる低分子生理活性物質の利用が中心であり、多くの天然成分が検討され、利用されている。今後は天然高分子化合物を逐次構造変換することにより、新規な生理活性物質を誘導することが重要であると考えている。そこで、リグノフェノール分解物の生理活性の検討を行った。

5. 2 成果

① リグノフェノールの大量調製

木粉は 80 メッシュパススギ木粉 7kg を使用した。まず、抽出物を除くため、アセトンで 3 回脱脂処理した。この脱脂木粉に 3.5kg の *p*-cresol を含むアセトン溶液を加え、十分に浸漬した後、アセトンを留去し、*p*-cresol 収着木粉を調製した。

この収着木粉 3.2kg に 72%硫酸 8L を加え、30℃で激しく攪拌した。1 時間攪拌後、反応液を大過剰の水に分散させた。リグノフェノールを含む不溶解物を自然沈降させ、上澄みを除去した後、再度水に懸濁した。そして、自然沈降させ、上澄みが中性になるまで洗浄した。この不溶解区分を凍結乾燥、続いて減圧乾燥し、未精製リグノフェノールを得た。この操作を 3 回繰り返し、3.2kg の未精製リグノフェノールを得た。

この未精製リグノフェノール 1.1kg からリグノフェノールをアセトン抽出し、アセトン溶液をベンゼン/*n*-ヘキサン=2/1 に滴下した。Lignocresol を不溶区分として回収し、さらにジエチルエーテルで洗浄し、精製リグノフェノール 750g を得た。収率は木粉あたり 32%であった。

GPC、¹H-NMR による性状分析を行った結果、分子量分布、平均分子量、導入フェノール量ともラボでのビーカースケールで調製したリグノクレゾールとほぼ同じ性状を示した。

②リグノフェノールアルカリ処理のスケールアップ

リグノフェノールアルカリ処理用高温オートクレーブ装置として、150℃まで処理が可能なアルプ MCS-3032S 高圧蒸気滅菌器を購入した。この装置を用い、微粉化大量精製スギリグノクレゾール 40g を 350ml の 1.0N NaOH に溶かし、1L 三角フラスコに入れた。これを 3 セット用意した。これを高温オートクレーブを用いて 150℃-90min 処理した。終了後、水で約 1.5 倍に希釈後、1.0N HCl で pH2 に酸性化後、遠心分離した。イオン交換水で pH6 になるまで洗浄し、凍結乾燥した。

105g のスギリグノクレゾールアルカリ低分子化体を得た。この操作を繰り返し、506g のリグノクレゾールアルカリ低分子化体を得た。

GPC 分析を行った結果、20ml 容ステンレスオートクレーブを用い、170℃で 90min 処理した場合とほぼ同じ分子量分布を示した。

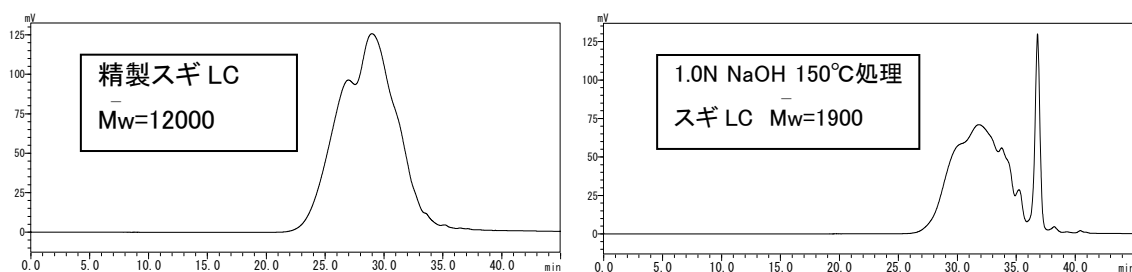


図 4 1.0N NaOH 150℃処理スギ Lignocresol の分子量分布

③ リグノフェノールアルカリ分解物のモノフェノール化

LCspr 170C 核交換処理では, catechol, guaiacol, *p*-cresol, 4,4'-biphenol (内部標準物質)を分析対象物とした。birch LC170C の核交換処理では, pyrogallol, catechol, 3-methoxycatechol, guaiacol, 2, 6-methoxyphenol, *p*-cresol, 4,4'-biphenol (内部標準物質)を分析対象物とした。

まず, LCspr 170C を 110℃で 4 時間核交換処理した結果, オリジナルリグニン芳香核由来の guaiacol とそのメキシル基が脱メチル化した catechol が 18%, 相分離系変換処理により導入された *p*-cresol が 20%得られた。一方, LCbir170C を 110℃で 4 時間核交換処理した結果, グアイアシル骨格由来の catechol, guaiacol が 8% シリンギル骨格由来の 3-methoxycatechol, 2,6-methoxyphenol が 25%, 導入クレゾール由来の *p*-cresol が 22%得られた。spruce LC170C と birch LC170C に含まれる *p*-cresol は約 25%であることから, 相分離系変換処理により導入された *p*-cresol は, 核交換処理によりほぼ定量的に分離することが可能であることが確認された。

分子量分画したリグノフェノールアルカリ分解物の核交換処理

Guaisyl aryl coumaran が主成分である LCspr170CF2 を 110℃で核交換処理した結果, モノフェノールの収率は高く, オリジナルリグニン芳香核由来の guaiacol と catechol の比率が高く, *p*-cresol の収率以上となった(図 5)。一方, 高分子画分 LCspr 170CF1 からのモノフェノールの収率は低く, guaiacol と catechol の比率も低くなった。核交換処理ではオリジナルリグニン芳香核が縮合型構造を有している場合, guaiacol と catechol は誘導されない。したがって, 針葉樹 2 次機能変換体高分子画分には, オリジナルリグニンの縮合型構造を有する画分の比率が高いことを示している。また, 高分子画分では *p*-cresol の収率も低く, ベンジル位への *p*-cresol の導入率が低いことが示唆された。

また広葉樹においては, 低分子画分 LCbir170CF2 からはオリジナルリグニン芳香核由来のモノフェノールの比率が高くなった(図 6)。一方, 高分子画分(LCbir 170CF1)からのモノフェノールの収率は低く, オリジナルリグニン芳香核由来のモノフェノールの比率も低くなった。核交換処理ではオリジナルリグニン芳香核が縮合型構造を有している場合, catechol, 3-OMe-catechol, guaiacol, 2,6-OMe-phenol は誘導されない。したがって, 2 次機能変換体高分子画分には, オリジナルリグニンの縮合型構造を有する画分の比率が高いことを示している。また, 高分子画分では *p*-cresol の収率も低く, ベンジル位への *p*-cresol の導入率が低いことが示唆された。

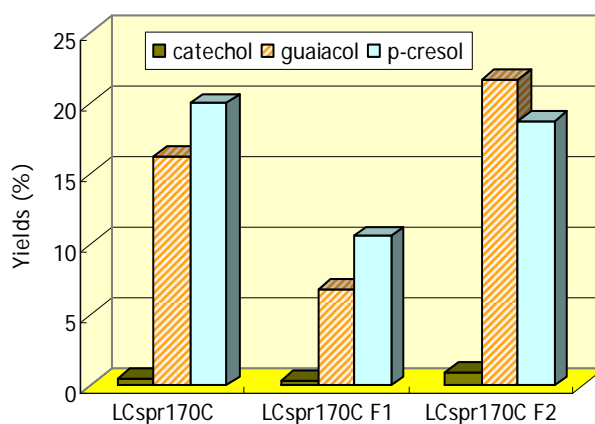


図 5 spruce lignocresol アルカリ低分子化体の核交換処理により得られたモノフェノールの収率

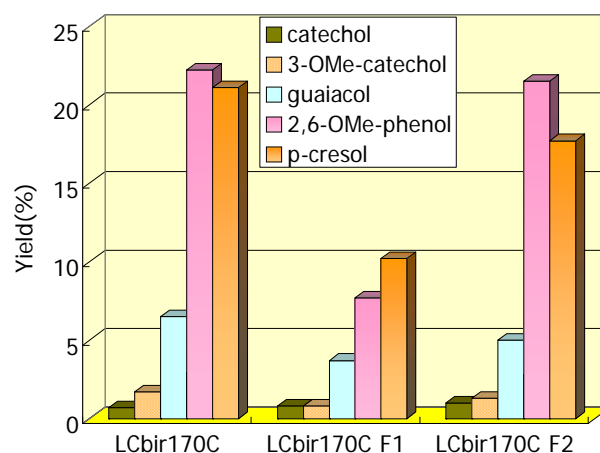


図 6 birch lignocresol アルカリ低分子化体の核交換処理により得られたモノフェノールの収率

リグノフェノールアルカリ低分子化体核交換条件の検討

核交換処理温度を下げた条件で行い、モノフェノール収率の変化を見ることにより、解離しやすさについて検討した。LCspr 170C および LCbir 170C を 90℃および 70℃で 4 時間核交換処理した。

LCspr 170C においては、核交換処理温度を 70℃まで下げると *p*-cresol の収率が大きく低下した(図 7)。LCbir170C においても、核交換処理温度を 70℃まで下げると *p*-cresol の収率が大きく低下した(図 8)。またオリジナルリグニン芳香核由来の guaiacol と 2,6-OMe-phenol の収率は、核交換処理温度 70℃においてもほとんど低下しなかった。

これらの結果、リグノフェノールアルカリ低分子化体においては導入フェノール核よりもオリジナルリグニン芳香核のほうが解離されやすいことが確認された。まだ過去のリグノフェノールの核交換処理条件の検討結果と比較していないため明確にはいえないが、2 次機能変換体の場合、導入クレゾール核のフェノール性水酸基がエーテル結合しているタイプが多いことから、マイルドな核交換処理条件では、遊離されにくくなっている可能性が示唆された。これについては今後もう少し確認したい。

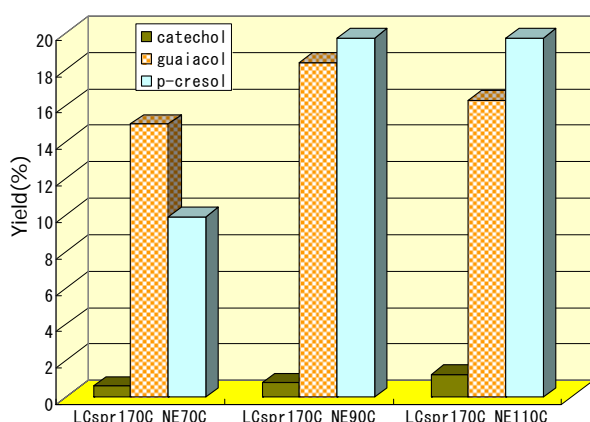


図 7 LCspr 170C からのモノフェノール収率における核交換処理温度の影響

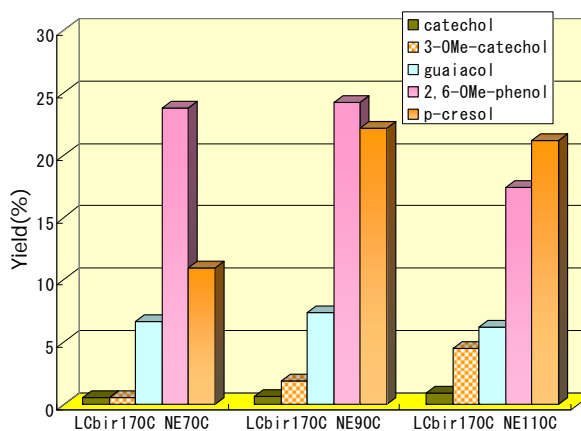


図 8 LCbir 170C からのモノフェノール収率における核交換処理温度の影響

リグノフェノールアルカリ低分子化体核交換処理におけるフェノールの削減

これまでリグノフェノールアルカリ低分子化体の核交換処理は、核交換試薬として Phenol / Xylene / BF₃-phenol complex = 19 / 10 / 2.5(v/v)を使用してきた。この中で Phenol はリグノフェノールの構成芳香核と入れ替わる試薬であるとともに溶媒としての機能を有しているため、大過剰の phenol が含まれている。核交換処理後、リグノフェノール構成芳香核の回収を行うためには分離が必要であり、Phenol の量は少ないほうが良い。そこで、まず、核交換試薬における Phenol の使用量を 1/2 に削減した条件でリグノフェノールアルカリ低分子化体の核交換処理を行った。Phenol 量を 1/2 に削減した分 Xylene の量を増やした条件で検討した。

110℃ 4 時間の核交換処理で比較した結果(図 9)、針葉樹、広葉樹とも Phenol 量を 1/2 に減らした核交換試薬を用いた場合のほうが若干モノフェノール収率は低下したが、ほぼ同じレベルであった。よって、さらに削減できる可能性がある。

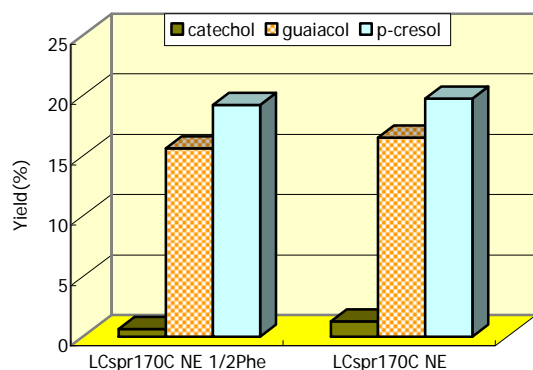


図 9 LCspr 170C の核交換処理における Phenol 量の影響

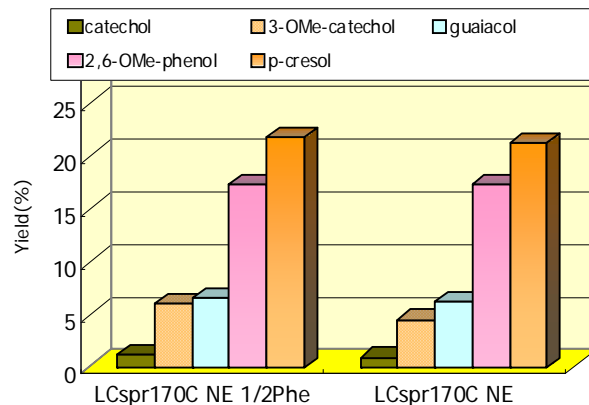


図 10 LCbir 170C の核交換処理における Phenol 量の影響

④ リグノフェノール分解物の用途開発

高脂肪食負荷肥満ラットの脂質代謝に及ぼすリグノフェノールの影響

肥満は、糖尿病、高血圧などの危険因子として知られている。これまでリグノフェノールアルカリ低分子化体を糖尿病モデルラットに投与すると、非投与の糖尿病ラットの血糖値 (Glc) は低下しなかったが、血漿中トリグリセリド (TG) や総コレステロール (T-cho) 値が低下することを報告した。また、LP は糖尿病ラットの血管の酸化ストレスを軽減する新しい事実も得た。

一方、肥満では TG や T-cho 値が上昇することはよく知られている。しかし、肥満におけるリグノフェノールアルカリ低分子化体の生理的役割に関する知見はほとんどない。そこでリグノフェノールアルカリ低分子化体の脂質代謝における生理調節機能を明らかにするために、高脂肪食負荷肥満ラットを用いて、血漿、肝臓および脂肪組織中の TG や T-cho 値に及ぼすリグノフェノールアルカリ低分子化体の影響を検討した。

摂食に関してはリグノフェノールアルカリ低分子化体の影響は見られなかった。現在、生体機能の確認中である。

⑤ まとめ

従って、1st step として相分離系変換処理により、リグニン生合成キノンメチドへの求核付加により生成したベンジルエーテルの開裂、2nd step としてアルカリ 2 次機能変換処理によりラジカルカップリングにより生成した β -エーテル結合の開裂、3rd step として三臭化ホウ素処理によりリグニン前駆体モノリグノール

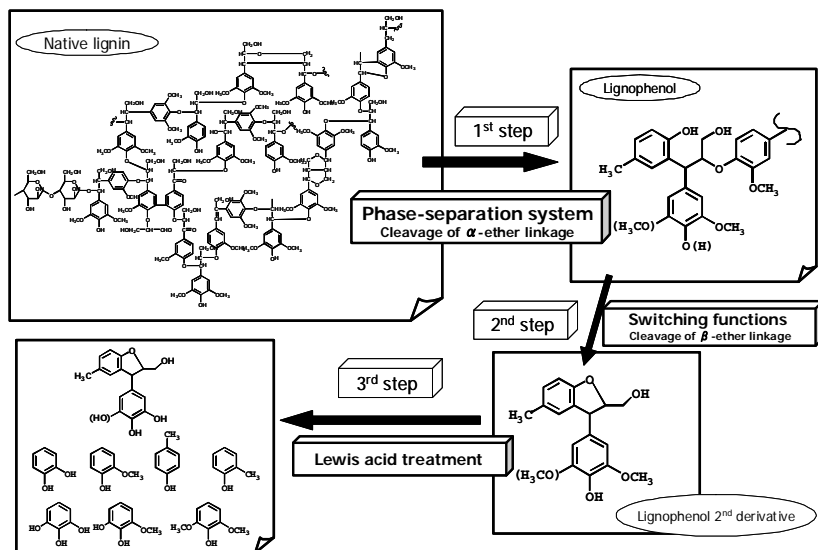


図 11 天然リグニンの逐次構造変換によるモノフェノール化

生成過程での形成されたメトキシル基の脱メチル化、そして、三フッ化ホウ素を用いた核交換処理による脱アルキル化により、天然リグニンに含まれる潜在的フェノール性水酸基を逐次開放することにより、カスケード的にリグニンを活用し、最終的に高収率でモノフェノールへと誘導し、芳香族化学原料として活用することが可能である(図 11)。

6. 自己評価

植物バイオマスの石油代替原料化を目的に、これまでほとんど検討されていない芳香族化学原料化を検討した。地球上に最も豊富に存在する芳香族化合物である天然リグニンから相分離系変換システム→アルカリ処理→ルイス酸処理を行うことにより高フェノール活性な低分子化合物およびモノフェノールを高収率で得ることが可能であることは確認できた。この過程で使用する触媒として三臭化ホウ素や三フッ化ホウ素というルイス酸触媒を使用しているが、実用化を考えた場合、もっと容易に変換できる触媒系や酵素処理方法などの開発が必要であり、もう少し基礎的な研究が必要である。

また、バイオマス利用実用化において高付加価値製品がその過程で生まれない限り、コスト的にバイオマスの石油代替化は難しい。そこで高付加価値用途開発として、今回リグノフェノールアルカリ低分子化体の生理活性試験を行った。糖尿病ラットに対して効果的な生理活性を示したが、肥満ラットを用いた脂質合成転写因子の活性抑制効果を検討したところ、まだ試験中のため、最終的な判断はできていないが、高い抑制効果は見られなかった。しかし、リグノフェノールは構造を任意に制御できることから、親水性化などを行い更なる生理活性試験を行いたい。

7. PO の見解

リグニンは天然資源で唯一大量の産出が見込める芳香族化合物であり、そこから高効率で工業原料であるモノマーを生成できれば、石油代替物質として極めて有望となる。本研究は、リグニンの分解による有用有機(芳香族)化合物合成プロセスの開発を目的とするものであった。

本研究においては、リグニンの低分子化によるフェノール生成に成功している。リグニンは工業的に使い道が無くボイラーに入れて熱回収しているのが現状で植物が作る構造的化合物でありながら有効に使う術を欠いていたが、本研究でここまで分解したのは非常に素晴らしい成果である。残滓も不燃性プラスチック原料に適用できるなど、プロセス全体としての完成度は高い。換言するならば、天然リグニンの芳香族原料化への道筋をつけ、当初の目標は達成できたと思われる。

しかし、リグニンは、なお扱いづらい物質である。リグニンの低分子化プロセスの可能性は示されたが、まだ純度(もしくは生成率)が高いとはいえない。現実的な触媒系の探索を含め反応条件の詳細な検討を詰める必要がある。大量には扱いにくいルイス酸を利用することには工業化の観点から疑問なしとはいえず、今後プラント化を意識した反応の選択も必要になってこよう。さらに、市場では芳香族化合物が望まれているかを検討していくことも必要であろう。加えて、選択性も実技術への展開においては高度化されていかねばならない。

現時点での研究成果に対して、以上のような種々の追加課題が想起されるのは、ひとえに、天然リグニンの化学原料としての利用は今後の低炭素社会構築に重要であるからであるからこそであり、更なる研究開発の地道な継続進展を期待したい。

8. 研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Norikura, T., Y. Mukai, S. Fujita, K. Mikame, M. Funaoka and S. Sato, Lignophenols decrease oleate-induced apolipoprotein-B secretion in HepG2 cells, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **107**, 813-817 (2010)

2. Mukai, Y., T. Norikura, S. Fujita, K. Mikame, M. Funaoka and S. Sato, Effect of

lignin-derived lignophenols on vascular oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, DOI: 10.1007/s11010-010-0645-9 (2010)

3. Mikame, K. and M. Funaoka, Structural conversion of lignophenol derivatives by Lewis acid treatment for chemical feedstock, *Trans. the Materials Research Society of Japan*, **35**, in press (2010)

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3)口頭発表

①学会

国内 8 件, 海外 0 件

1. 三亀啓吾, 青柳充, 船岡正光:リグノセルロース資源を機能性分子へ～実証プラントの設計と変換試験～, 第 10 回 GSC シンポジウム, 東京, 3 月 4-5 日(2010)
2. 三亀啓吾, 船岡正光:核交換反応系によるリグノフェノールの芳香族原料化, 化学工学会 第 75 年回, 鹿児島, 3 月 18-20 日(2010)
3. 三亀啓吾, 船岡正光:リグノセルロース系複合体の精密機能変換システム～連続式相分離系変換システムプラントの開発とその効果～, 化学工学会 第 75 年回, 鹿児島, 3 月 18-20 日(2010)
4. 三亀啓吾, 船岡正光:リグノセルロース連続式相分離系変換システムプラントの開発とその効果, 第 59 回高分子学会年次大会, 横浜, 5 月 26-28 日 (2010)
5. 三亀啓吾, 船岡正光:広葉樹リグノフェノールのルイス酸処理による芳香族原料化, 第 59 回高分子学会年次大会, 横浜, 5 月 26-28 日 (2010)
6. 三亀啓吾, 船岡正光:低分子化リグノフェノールのルイス酸処理によるモノフェノール化, 第 59 回高分子討論会, 札幌, 9.月 15-17 日 (2010)
7. 三亀啓吾, 船岡正光:核交換反応系による低分子化リグノフェノールのモノフェノール化, 第 60 回ネットワークポリマー講演討論会, 東京, 10 月 14-15 日 (2010)
8. 三亀啓吾, 船岡正光:リグニン系機能性高分子リグノフェノールの連続的工業生産システム, 第 19 回ポリマー材料フォーラム, 名古屋 12 月 2-3 日 (2010)

②その他

国内 0 件, 海外 0 件

(4)その他の成果(受賞, 著書, 招待講演, 特記事項等)

なし