

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550054

研究課題名(和文)メタン生成菌による二酸化炭素固定とメタン生成プロセスを模倣した触媒反応系の創生

研究課題名(英文)Catalytic reactions for mimicking processes in the fixation of carbon dioxide and methanogenesis by methanogenic bacteria

研究代表者

福島 正巳 (FUKUSHIMA, Masami)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40344113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタン生成細菌によるメタン生成の初期過程では、CO₂がメタノフラン(MFR)へN-ホルミルとして固定化される。このCO₂固定を化学的に模倣するため、ベンジルアミンをMFのモデルとして用いてN-ホルミル化を促進する触媒反応系を探索した。その結果、銅-ジホスフィン錯体/ポリメチルヒドロシロキサン系が有用であることを明らかにした。また、メタン生成細菌の生息域に広く分布する腐植物質の影響について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：In the methanogenesis by methanogenic bacteria, CO₂ is fixed as N-formyl to methanofuran (MF). To mimic such processes chemically, catalytic systems were searched, in terms of the N-formylation of benzylamine as a model of MF. The Cu-diphosphine complex/polymethylhydrosiloxane system was found to be effective. In addition, the effects of humic substances, which are distributed in habitat of the bacteria, on the efficiency of N-formylation were also investigated.

研究分野：環境化学、触媒化学、分析化学

キーワード：環境技術 環境材料 触媒・化学プロセス 超分子化学 生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

近年、火力発電所など大規模発生源から排出されるCO₂を石炭や天然ガス採掘跡の地層に圧入する地中隔離(CCS)や炭層への導入によるコールベッドメタンの回収が試みられている。これらにより地中へ圧入されたCO₂は、比較的高温(60–100°C)、高圧(5 MPa 以上)で存在する[1]。天然ガス採掘跡の地層や炭層にはメタン生成菌が棲息するが、CO₂が圧入され酸性化する過酷な条件で、細菌は死滅すると言われている[2]。これまで研究代表者は、生体解毒酵素(シトクロム P450)の化学的模倣に関する研究を行ってきたが、このような生体模倣触媒の利点は微生物が死滅する厳しい環境でも反応が進行することである[3]。ゆえに、メタン生成菌によるCO₂固定とCH₄生成が化学的に模倣できれば、CO₂圧入によって過酷な条件になっている地中でもCH₄の生成が可能になると考えられる。メタン生成菌は、図1に示したスキームでCO₂からCH₄を生成する[4]。他の水素化還元によりメチル化していく過程は発熱反応であるが、(1)のN-ホルミル化によるCO₂の固定は吸熱反応であり、外部からのエネルギー供給が必要である。ゆえに、CO₂がメタン生成菌によりCH₄へと還元する過程で、(1)のメタノフラン(MFR)へのN-ホルミル化による固定は鍵を握ると考えられる。天然ガス採掘跡や炭層には動植物の遺骸が分解し縮重合して生成した腐植物質が分布しており、嫌気性微生物に対するエネルギー源として作用することが知られてきた。特に、腐植物質にはキノン/ヒドロキノン酸化還元対が存在しており、これが微生物活動に対して電子供与体や水素供与体として作用することが知られている。しかし、図1反応(1)のプロセスにおける腐植物質の役割は明らかにされていない。

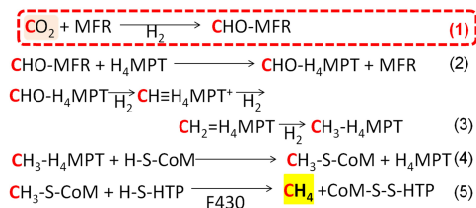


図1 メタン生成菌によるCO₂の固定とCH₄への還元過程

2. 研究の目的

- (1) 高温・高圧条件下でCO₂を圧入したとき、アミンに対するCO₂のN-ホルミル化固定が起こりうる触媒反応系を構築し、腐植物質あるいは腐植物質の酸化還元構造部位であるフェノール酸類が反応効率に及ぼす影響を評価する。
- (2) 腐植物質モデルの役割を解明する。
- (3) モデル反応として図2に示したベンジルアミン(BA)へのCO₂付加によるベンジルホルムアミド(BFA)の生成反応を対象にする。

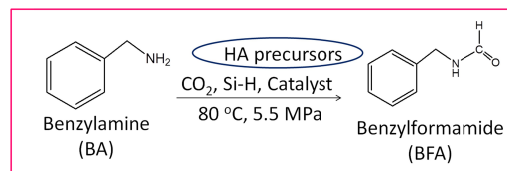


図2 BAへのCO₂付加によるBFAの生成

3. 研究の方法

(1) 有機金属触媒

有機金属触媒として、金属(Ru, Pd, Cu)の塩化物あるいは酢酸塩を用い、配位子としてトリフェニルホスフィン(PPh₃)、1,2-ビスジフェニルホスフィノエタン(dppe)及び1,2-ビスジフェニルフォスフィノベン(dppbe)ゼンを用いた。さらに、水素源としてポリメチルヒドロシロキサン(PMHS)を用いた。各配位子、金属塩および水素源の構造を図3に示す。

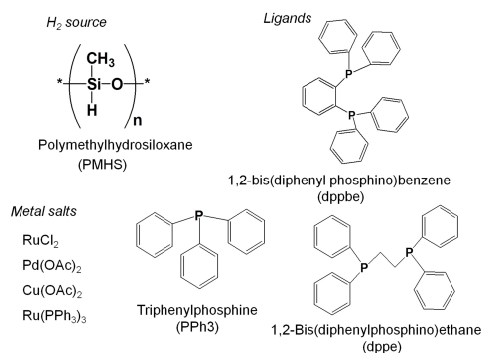


図3 各配位子、金属塩および水素源の構造

(2) 腐植物質モデル

腐植物質を構成するリグニンフェノール由来のフェノール酸類を腐植物質モデルとして使用した(図4)。

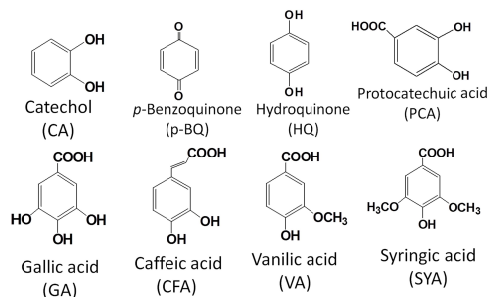


図4 腐植物質モデルの構造

(3) 実験操作

テフロンチューブを図5に示したオートクレーブにセットし、金属塩 0.5 μmol、配位子およびPMHS 1.5 μmol、BA 1.5 μmol、腐植物質モデル 2 μmol、そして溶媒としてジオキサン 2 mL を加え、ヘリウム(99.995%)を30 min 通じることにより容器内を置換した。その後温度を80°Cへ上昇させ、CO₂を5.5 MPaまで

圧入した。二時間反応させた後、容器を冷却し反応液中の BFA を HPLC で、ギ酸をイオンクロマトグラフィーにて測定した。反応生成物を解析するため、重水素置換ジオキサンを用いて反応を行い、¹H NMR スペクトルを測定した。



図 5 反応容器(オートクレーブ)の外観

4. 研究成果

(1) 金属種および配位子の影響

BA から BFA が生成する金属種と配位子との組み合わせについて検討を行った。各金属塩および配位子の組み合わせで、BFA の生成が見られたが、ギ酸もまた生成した。表 1 に各種金属塩と配位子を用いたときの BFA とギ酸の生成量をまとめた。Ru 錯体は、CO₂ のアミンへの *N*-ホルミル化を促進すると報告されてきたが[5]、BFA への転化率は 3%程度であった。しかし、Cu 錯体を用いると転化率は 15%以上となり、dppbe との組み合わせの時に 44.5%となった。また、ギ酸の生成量も著しく増加した。ゆえに、以後 Cu(OAc)₂ と dppbe の組み合わせを触媒として使用する。

表 1 各種金属と配位子の組み合わせによる BFA およびギ酸の生成量

Catalyst		BFA [μmol] (Conversion)	HCOOH [μmol]
Metal	Ligand		
Pc(OAc) ₂	dppbe	0.45 ± 0.1 (3.2%)	2.65 ± 2.0
RuCl ₃	dppbe	0.24 ± 0.1 (1.7%)	5.08 ± 0.6
Ru(PPh) ₃ Cl ₂	-	0.42 ± 0.2 (3.0%)	3.66 ± 1.6
Cu(OAc) ₂ ·H ₂ O	dppe	2.18 ± 0.3 (15.6%)	44.2 ± 37
Cu(OAc) ₂ ·H ₂ O	PPh	2.45 ± 1.4 (17.5%)	3.83 ± 4.3
Cu(OAc) ₂ ·H ₂ O	dppbe	6.23 ± 0.4 (44.5%)	76.7 ± 8.2

図 6 には Cu(OAc)₂ / dppbe 触媒反応系に於ける BFA の生成に及ぼす反応温度の影響、図 7 にはギ酸生成に及ぼす反応温度の影響を示している。BFA の生成量は 80°C まで増加し、その後ほぼ一定になったが、ギ酸は 100°C まで増加する傾向を示した。BFA の場合、BFA のホルミル基がメチル基に還元されている可能性も考え、GC/MS により解析を行ったが、生成していると思われるメチルアミンは見られなかった。一方で、BFA の二量体生成物が検出された。

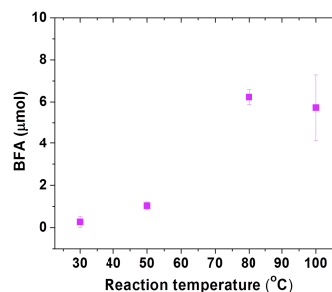


図 6 Cu(OAc)₂ / dppbe 触媒反応系に於ける BFA の生成に及ぼす反応温度の影響

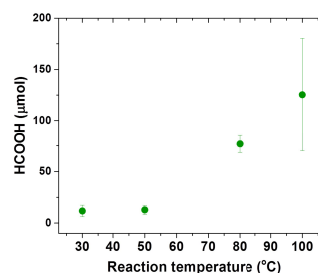


図 7 Cu(OAc)₂ / dppbe 触媒反応系に於けるギ酸の生成に及ぼす反応温度の影響

(2) BFA 生成に及ぼす腐植物質モデルの影響

表 2 は、BFA およびギ酸の生成に及ぼす腐植物質モデルの影響を纏めたものである。いずれの腐植物質モデルの添加は、何も添加しない場合に比べて BFA の生成量を増加させた。特に、SYA の添加により BFA とギ酸の生成が大きく増加した。しかし、HQ や PCA を加えたとき、BFA の生成量は何も加えない場合に比べて大きく減少した。

表 2 Cu(OAc)₂ / dppbe 触媒反応系に於ける BFA 生成に及ぼす腐植物質モデルの影響









HS models	BFA [μmol] (Conversion%)	HCOOH [μmol]
None	6.23 ± 0.4 (44.5)	76.7 ± 8.2
 Catechol (CA)	7.75 ± 0.8 (55.4)	44.7 ± 15.7
 p-benzoquinone (p-BQ)	6.12 ± 0.6 (43.7)	72.9 ± 27.2
 Hydroquinone (HQ)	5.63 ± 2.1 (40.2)	41.3 ± 3.9
 Protocatechuic acid (PCA)	5.11 ± 0.2 (36.5)	55.8 ± 3.7
 Gallic acid (GA)	6.41 ± 1.6 (45.8)	54.5 ± 4.9
 Caffeic acid (CFA)	6.87 ± 0.3 (49.0)	78.5 ± 9.8
 Vanillic acid (VA)	7.27 ± 3.3 (51.9)	62.3 ± 51.0
 Syringic acid (SYA)	9.67 ± 0.7 (69.1)	108 ± 15

図 8 は Cu(OAc)₂、腐植物質モデル、それらの混合物のジオキサン溶液に対する紫外・可視吸収スペクトルを示している。BFA 生成を阻害した HQ を加えた場合には、410 nm 付近に大きなピークが見られた。Cu(OAc)₂ ジオキサン溶液の色は本来青であるが、図 8 に示されているような緑になった。これは銅(II)と

HQ との錯形成によると思われる。同様な傾向が、PCA が共存した紫外可視吸収スペクトルでも見られた。しかし、SYA 添加ではこのような 400nm 付近の吸収の顕著な増大は見られず、反応液の色の変化も見られず青のままであった。したがって、銅と錯形成能を有する腐植物質モデルは反応を阻害すると考えられる。

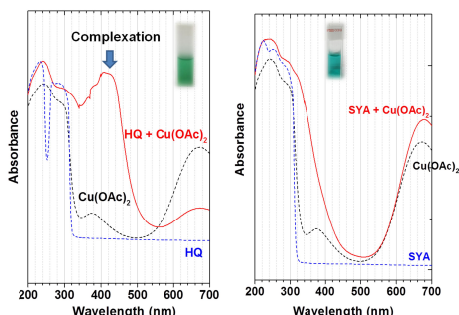


図 8 HQ および SYA と Cu(OAc)₂ 混合ジオキサン溶液の紫外可視吸収スペクトル

(3) ギ酸と BA から BFA の生成に及ぼす腐植物質モデルの影響

本研究では、BFA のみならず CO₂ の還元生成物としてギ酸の生成も顕著に見られた。N-ホルミル化の別な経路として、図 9 に示したように、ギ酸へのアミンの付加が知られている。その寄与の度合いを調べるために、ギ酸による BA の N-ホルミル化に及ぼす腐植物質モデルの影響を調べた。

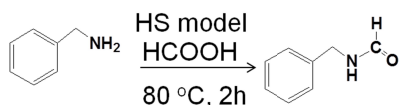


図 9 ギ酸による BA の N-ホルミル化

表 3 は、ギ酸と BA のジオキサン溶液における BFA 生成に及ぼす腐植物質モデルの添加効果を示している。腐植物質モデルを加えなければ BFA は生成しなかった。しかし、腐植物質モデルを添加すると BFA が生成し、SYA を添加したときに最も高い値を示した。この結果は、表 2 の触媒反応系と同様の傾向を示した。ゆえに、CO₂ がギ酸に還元し、それが BA に作用して N-ホルミル化する経路の関与が示唆される。

表 3 ギ酸による BA の BFA への転化に及ぼす腐植物質モデルの影響

HS models	BFA [μmol]
SYA	5.36
VA	3.52
CA	2.68
p-BQ	2.36
none	N.D.

反応後の SYA の構造変化を調べることを目的として、重水素置換ジオキサンを用いて反応を行い、¹H NMR スペクトルを測定した。図 10 は、ギ酸、SYA、BFA、BA、そして反応液の ¹H NMR スペクトルを示している。ギ酸、SYA、BFA、BA のスペクトルと比較した場合、反応液ではメチルプロトンと O-アルキルプロトンの新たなピークが見られ、これらは SYA 由来の酸化生成物と考えられる。ゆえに、SYA が反応に電子供与体として利用されたと考えられる。

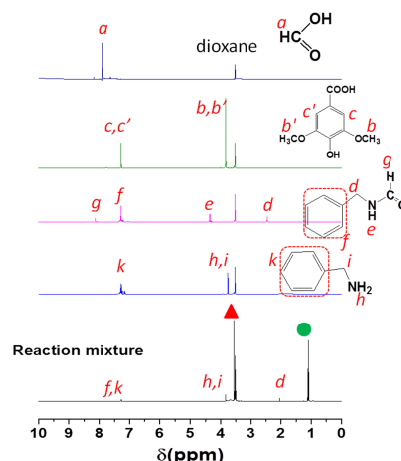


図 10 ギ酸、SYA、BFA、BA、反応液の ¹H NMR スペクトル

(4) 推定反応経路

SYA など HS モデルが、CO₂ の N-ホルミル化の促進に大きく寄与することを明らかにした。しかし、HQ や PCA のような銅との錯形成能が強い腐植物質モデルは、触媒活性種の生成を阻害するので BFA の生成量減少を引き起こすと考えられる。BA は CO₂ の還元生成したギ酸によってもホルミル化され、その促進に腐植物質モデルが寄与していることを明らかにした。ゆえに、腐植物質モデルの添加で N-ホルミル化が促進した理由として、図 11 のようにギ酸による BA の N-ホルミル化による寄与が考えられる。これにおける腐植物質モデルの役割として、それらが電子供与体として作用しているものと推定できる。

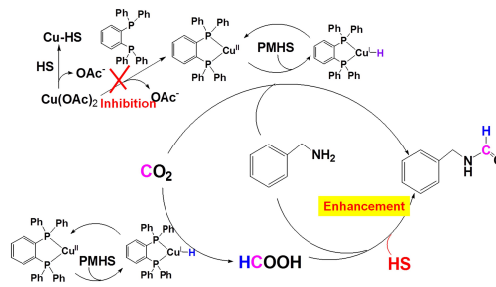


図 11 BA の N-ホルミル化に対する推定機構

<引用文献>

- [1] 乾智行, CO₂固定化・隔離技術, シーエムシー出版, 2008年.
- [2] K. Yanagawa, Y. Morono, D. de Beer, M. Haeckel, M. Sunamura, T. Futagami, T. Hoshino, T. Terada, K.-i. Nakamura, T. Urabe, G. Rehder, A. Boetius, F. Inagaki, Metabolically active microbial communities in marine sediment under high-CO₂ and low-pH extremes. *ISME J.* **7**, 555-567 (2013).
- [3] M. Fukushima, Y. Tanabe, K. Morimoto, K. Tatsumi, Role of humic acid fraction with higher aromaticity in enhancing the activity of a biomimetic catalyst, tetra(*p*-sulfonatophenyl)porphineiron(III). *Biomacromolecules* **8**, 386-391 (2007).
- [4] S. Rospert, J. Breitung, K. Ma, B. Sehwirer, C. Zirngibl, R.K. Thauer, D. Linder, R. Huber, K.O. Stetter, Methyl-coenzyme M reductase and other enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂ in the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Arch. Microbiol.* **156**, 49 - 55 (1991).
- [5] A. Tlili, E. Blondiaux, X. Frogneux, T. Cantat, Reductive functionalization of CO₂ with amines: an entry to formamide, formamidine and methylamine derivatives. *Green Chem.* **17**, 157-168 (2015).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. K. Nagasawa, B. Wang, K. Nishiya, K. Ushijima, Q. Zhu, M. Fukushima, T. Ichijo, Effects of humic acids derived from lignite and cattle manure on antioxidant enzymatic activities of barley root. *J. Environ. Sci. Heal. B* 査読有, 51, 2016, 81-89. DOI: 10.1080/03601234.2015.1080516
2. R. Nishimoto, Q. Zhu, T. Miyamoto, T. Sato, X. Tu, A. Aneksampant, M. Fukushima, Monopersulfate oxidation of Acid Orange 7 with an iron(III)-tetrakis (*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrin intercalated into the layers of montmorillonite and pillared clay. *J. Mol. Catal. A-Chem.* 査読有, 396, 2015, 84-89. DOI: 10.1016/j.molcata.2014.09.035

〔学会発表〕(計 3件)

1. 五十嵐真美、福島正巳、有機リン金属触媒によるCO₂の*N*-ホルミル化に及ぼす腐植物質前駆体の影響、日本化学会第96春季年会、2016年3月24日~3月27日、同志社大学京田辺キャンパス(京都).
2. 福島正巳、五十嵐真美、メタン生成細菌による二酸化炭素固定を模倣した触媒反応に関する研究、日本化学会第96春季年会、2016年3月24日~3月27日、同志社大学京田辺キャンパス(京都).

3. 西本遼、宮本貴文、朱倩倩、佐藤努、福島正巳、モンモリロナイトに担持された鉄ポルフィリン触媒の活性評価、日本分析化学会第63年会、2014年9月16日~9月18日、広島大学(広島).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福島 正巳 (FUKUSHIMA, Masami)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：4 0 3 4 4 1 1 3