

助成番号 0842

亜臨界水による酸性多糖類の分解に及ぼす対イオン形の影響

安達 修二

京都大学大学院農学研究科

概要 【目的】 常圧での沸点である 100°Cから 374°C(臨界温度)の範囲で加圧することにより液体状態を保った亜臨界水により、食品残渣等に含まれる酸性多糖を分解して資源化を図るには、多糖の加水分解と単糖の分解のいずれについても速度論的な知見が必要である。そこで本研究では、管型流通反応器を用いて、酸性多糖を構成するウロン酸であるグルクロン酸とガラクトロン酸の亜臨界水による分解に及ぼす対イオン形(H^+ および Na^+)の影響について検討した。

【方法】 所定濃度の基質溶液(ガラクトロン酸, ガラクトロン酸ナトリウム, グルクロン酸, グルクロン酸ナトリウムまたはグルクロノラク톤)をHPLC用ポンプにより一定の流量で一定温度(160°C~220°C)に保持したシリコン油浴に浸した管型反応器(SUS316 チューブ, 内径 0.8 mm, 長さ 1.0 m)に供給した。反応器からの流出液はただちに氷水に浸した冷却コイルに導いて反応を停止した。系の圧力は背圧弁により 10 MPa に保った。定常状態に達したのち、反応液中に残存する基質等の濃度をHPLCにより定量した。また、反応液の室温における pH は pH メータで測定した。

【結果と考察】 管型反応器を用いて、 H^+ 形および Na^+ 形のガラクトロン酸およびグルクロン酸の亜臨界水中での分解過程を測定した。対イオン形にかかわらず、グルクロン酸はガラクトロン酸より分解され易かった。また、いずれのウロン酸も Na^+ 形は H^+ 形より速く分解された。ガラクトロン酸の分解過程は一次反応速度式で表現できたが、他の成分の分解過程は一次反応速度式では表現できなかった。そこで、ガラクトロン酸ナトリウムの分解過程は Weibull 式を適用して解析した。また、グルクロン酸ナトリウムは完全には分解されず、一定の未分解率(約 0.07)に漸近した。この点を考慮した Weibull 式により、分解過程を表現した。さらに、グルクロン酸の分解過程では可逆的にグルクロノラク톤が生成するとともに、各成分は他の成分に分解された。これらの各過程が一次反応に従うと仮定した速度式は、グルクロン酸とグルクロノラク톤の濃度の変化をよく表現した。このように、酸性多糖を構成するウロン酸の亜臨界水中での分解速度過程は、ウロン酸の種類とともに対イオン形によっても大きく異なった。

1. 研究目的

常圧での沸点である 100°Cから 374°C(臨界温度)の範囲で加圧することにより液体状態を保った水を亜臨界水または加圧熱水という。亜臨界水は、常温常圧の水に比べて、比誘電率が低く、室温における水溶性有機溶媒のそれに近いという特徴をもつ¹⁾。また、水のイオン積は温度とともに大きくなり、200°Cから 300°Cでは 10^{-11} (mol/L)² のオーダーになる²⁾。後者の特徴は、亜臨界水中の水素および水酸化物イオンの濃度が高く、水が酸または塩基触媒として作用する可能性を示唆する。この特徴と高温であることから、亜臨界水により食品残渣や農産廃棄物などを処

理することにより、低分子化して再資源として利用する、または有用物質を回収しようとする試みがある^{3,4)}。食品(残渣)や農産廃棄物などには、デンプンやセルロースなどの中性の多糖とともに、ペクチンやアルギン酸などの酸性多糖が含有されることも多く、これらの多くは Na^+ 形であるが、一部は H^+ 形で存在する。酸性多糖を亜臨界水で加水分解して、構成単糖を高収率で回収するには、多糖の加水分解と単糖の分解のいずれについても速度論的な知見が必要である。しかし、亜臨界水による酸性多糖の加水分解および生成した単糖の分解に及ぼす対イオン形の影響はほとんど検討されていない。

そこで本研究では、管型流通反応器を用いて、酸性多糖を構成するウロン酸であるグルクロン酸とガラクトuron酸の亜臨界水による分解に及ぼす対イオン形 (H^+ および Na^+) の影響について検討した。

2. 実験方法

2.1 実験材料

D-ガラクトuron酸 (一水和物)、D-グルクロン酸および D-グルクロン酸ナトリウム (一水和物) は和光純薬工業 (大阪) より購入した。また、D-ガラクトuron酸ナトリウムおよび D-グルクロノ-6,3-ラクトン (以下、グルクロノラクトンと表記) は Sigma-Aldrich Japan (東京) より購入した。

2.2 分解反応

所定濃度の基質溶液 (ガラクトuron酸, ガラクトuron酸ナトリウム, グルクロン酸, グルクロン酸ナトリウムまたはグルクロノラクトン) を減圧下で超音波処理により溶存する気体を取り除いたのち、空気中の酸素の再溶解を防ぐため、ヘリウムを満たしたガスバックを装着した。160°C から 220°C の一定温度に保持したシリコン油浴に浸した HPLC 用のステンレスチューブ (SUS316, 内径 0.8 mm) を管型反応器 (長さ 1.0 m) として使用した⁵⁾。HPLC 用ポンプ (LC-10Atvp, 島津製作所, 京都) を用いて一定の流量で基質溶液を反応器に供給した。温度による水の密度の変化を考慮して、室温における流量から反応器内での平均滞留時間を算出した。反応器を出た液はただちに氷水に浸した冷却コイル (内径 0.8 mm, 長さ 1.0 m) に導くことにより反応を停止した。系の圧力は冷却コイルの下流に接続した背圧弁 (Upchurch 社, Oak Harbor, WA, 米国) により 10 MPa に保った。基質溶液を通液してから反応器内の平均滞留時間の 5 倍以上の時間が経過して定常状態に達したのち、適当な間隔をおいて 3 回にわたって溶出液を採取して以下の分析に供した。なお、分析はこれらの 3 サンプルのすべてについて行い、平均値を採用した。

反応液中に残存するガラクトuron酸、ガラクトuron酸ナトリウム、グルクロン酸、グルクロン酸ナトリウムまたはグルクロノラクトンは、2本の Supelcogel Ca カラム (7.8 mmφ × 300 mm; Sigma-Aldrich Japan) を直列に連結し、さらに Supelgaud Ca ガードカラム (4.6 mmφ × 50 mm; Sigma-Aldrich Japan) を備えた HPLC (LC-10AS; 島津製作所) により定量した。なお、溶離液は純水を用い、検出器は示

差屈折計 (RID-10A; 島津製作所) を使用した。

反応液の室温における pH は pH メータ (F-13; 堀場製作所, 京都) により測定した。また、ガラクトuron酸の 190°C、反応時間 150 s の反応液およびガラクトuron酸ナトリウムの 180°C、反応時間 100 s と 200 s の反応液について、ATR 法による FT-IR (FTIR-8300; 島津製作所) 分析を行った。

2.3 グルクロン酸の反応過程で生成する物質の同定

後述するように、グルクロン酸の分解過程で生成する主要な生成物を次の方法により精製した。反応液 (約 8 mL) をロータリーエバポレータで約 2 mL に濃縮した。2.0 mol/L $CaCl_2$ 水溶液を用いて、定法により Ca^{2+} 形に置換した強酸性陽イオン交換樹脂 (Dowex 50W X8, 200 メッシュ; 室町化学, 東京) を充填したガラスカラム (内径 1.6 cm × 高さ 33 cm) に濃縮した反応液を負荷し、純水で溶出 (流量 0.5 mL/min) した。溶出液を 5 分毎に分画し、各画分を上述した HPLC 法で分析した。目的とする主要反応生成物を含む画分を集めて凍結乾燥したのち、LC/MS (Series 1100; Hewlett-Packard, CA, 米国および Mariner; Applied Biosystem, CA, 米国) および 1H NMR (JEOL ECP500; 日本分光, 東京) で分析した。

3. 結果および考察

3.1 各ウロン酸の分解過程の特徴

160°C におけるガラクトuron酸、ガラクトuron酸ナトリウム、グルクロン酸およびグルクロン酸ナトリウム (いずれも 0.5% (w/v)) の分解について、平均滞留時間 τ と反応液中の各基質の残存率 C_i/C_{i0} および pH の関係を Fig. 1 に示す。

H^+ 形と Na^+ 形にかかわらず、グルクロン酸はガラクトuron酸より分解され易かった。また、グルクロン酸とガラクトuron酸はともに Na^+ 形は H^+ 形より速く分解された。 C_i/C_{i0} の τ に対する片対数プロットは、ガラクトuron酸についてのみ直線となり、その分解過程は式 (1) の一次反応速度式で表現できることが示唆された。

$$C_i / C_{i0} = \exp(-k\tau) \quad (1)$$

ここで、 k は速度定数である。一方、他の基質については、いずれもプロットは下に凸となり、一次反応速度式では表現できなかった。それらの過程を表現する速度式については後述する。

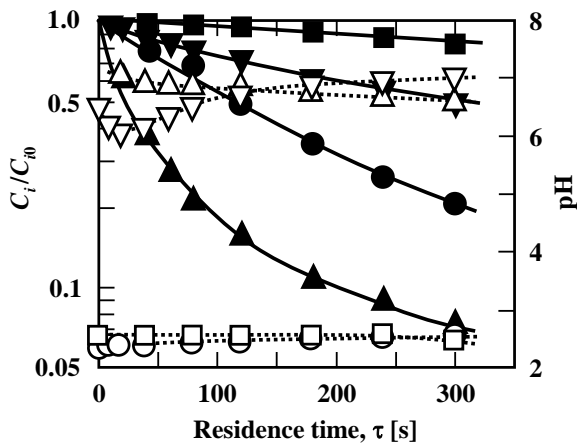


Fig. 1. Degradation processes at 160°C (closed symbols) and pH changes during the process (open symbols) for (■, □) galacturonic acid, (▼, ▽) sodium galacturonate, (●, ○) glucuronic acid and (▲, △) sodium glucuronate. C_i and C_{i0} on the ordinate indicate the concentration of a substrate in the reactor effluent and that of the substrate in the feed.

H^+ 形のガラクトン酸およびグルクロン酸の反応液の pH は反応の進行に伴って上昇した。一方、 Na^+ 形のガラクトン酸ナトリウムとグルクロン酸ナトリウムの分解過程では、反応時間が短いときには pH はいったん低下するが、その後は上昇に転じた。ガラクトン酸およびガラクトン酸ナトリウムの pH の変化は、基質のカルボキシル基の脱離またはケト体の形成に起因すると推測された。この推測は、反応液の FT-IR による分析結果と矛盾しなかった。

3.2 ガラクトン酸およびガラクトン酸ナトリウムの分解

ガラクトン酸 (GalA) およびガラクトン酸ナトリウム (GalNa) の分解過程と反応液の pH の例を Fig. 2 に示す。

ガラクトン酸の分解過程は、上述したように、 C_i/C_{i0} ($i = \text{GalA}$ または GalNa) 対 τ の片対数プロットはいずれの温度でも直線となった。一方、ガラクトン酸ナトリウムの分解過程は反応の後期に減速する傾向が認められた。そこで、ガラクトン酸ナトリウムの分解過程には、各種の分解および劣化過程を表現できる式 (2) の Weibull 式⁹⁾ を適用した。

$$C_i/C_{i0} = \exp[-(k\tau)^n] \quad (2)$$

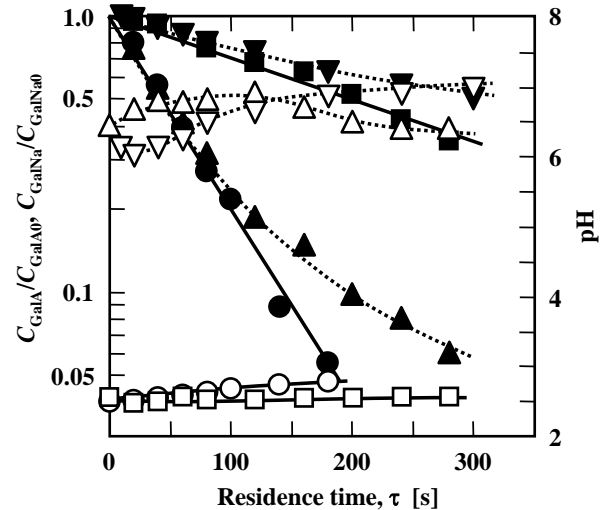


Fig. 2. Degradation processes (closed symbols) and pH changes during the process (open symbols) for galacturonic acid (GalA) at (■, □) 180°C and (●, ○) 200°C, and for sodium galacturonate (GalNa) at (▼, ▽) 160°C and (▲, △) 180°C

ここで、 k は速度定数、 n は形状係数と呼ばれるパラメータである。

Fig. 1 および Fig. 2 中の曲線は Microsoft Excel[®] の Solver 機能を用いて実測値にもっとも適合するように決定した⁷⁾ パラメータを用いた計算線である。

ガラクトン酸とガラクトン酸ナトリウムのそれぞれについて、160°C~220°Cと 160°C~190°Cでの分解過程を測定し、速度定数 k を算出した。ガラクトン酸ナトリウムについて算出した形状係数 n は、190°Cでは約 0.7 であったが、温度が低下するとともに大きくなり 1 に漸近した。また、ガラクトン酸およびガラクトン酸ナトリウムの分解過程に対する速度定数 k の温度依存性はいずれも式 (3) の Arrhenius の式に従った。

$$k = k_0 \exp(-E/RT) \quad (3)$$

ここで、 E は活性化エネルギー、 k_0 は頻度因子、 R は気体定数、 T は絶対温度であり、ガラクトン酸およびガラクトン酸ナトリウムの分解過程に対する活性化エネルギーはそれぞれ 131 J/mol と 147 J/mol であった。

反応液の pH はいずれの温度でも Fig. 1 とほぼ同様の傾向であったが、180°Cにおけるガラクトン酸ナトリウム

の分解過程では、反応時間(平均滞留時間)が150 sまでは pH が徐々に上昇し、さらに反応時間が長くなると低下した。

3.3 グルクロン酸およびグルクロン酸ナトリウムの分解

0.5%(w/v) グルクロン酸を180°Cで反応時間(平均滞留時間)が160 sのときの反応液のHPLCクロマトグラムをFig. 3(a)に示す。溶出時間が約19 minのピークは基質であるグルクロン酸に対応し、反応時間とともにピーク面積が減少した。一方、溶出時間が約37 minのピーク面積は反応時間とともに増大した。この成分をCa²⁺形強酸性陽イオン交換樹脂を用いて分離・精製したのち、LC/MS および¹H NMRにより分析したところ、グルクロノラクトンと同定された。

グルクロノラクトンに対応するHPLCのピーク面積の反応時間による変化のパターンから、グルクロノラクトンはグルクロン酸から可逆的に生成すると推測された。そこで、グルクロノラクトンを基質として、その分解過程を測定した。

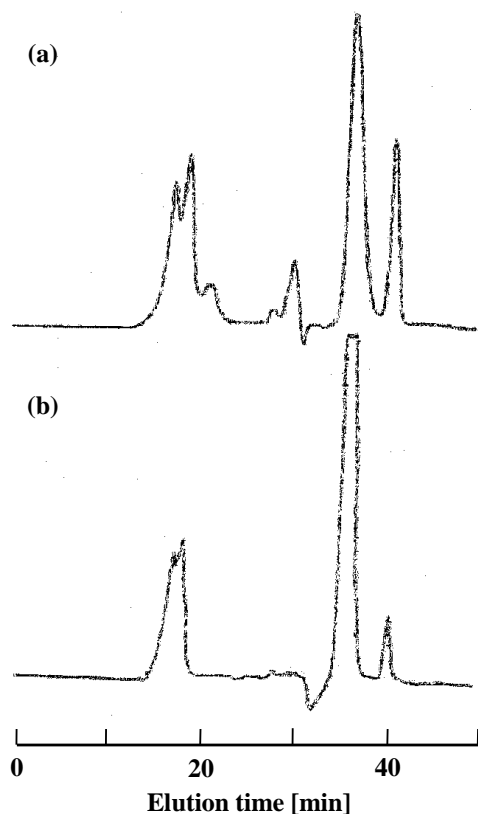
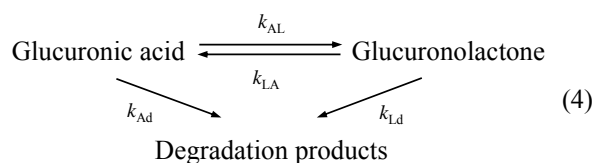


Fig. 3. HPLC chromatograms of the reactor effluents at 180°C and the residence time of 160 s for (a) glucuronic acid and (b) glucuronolactone

0.5%(w/v) グルクロノラクトンを180°Cで160 s反応したときの反応液のHPLCクロマトグラムをFig. 3(b)に示す。グルクロン酸に対応するピークが認められた。このことより、グルクロン酸とグルクロノラクトンは可逆的に生成することが示された。

これらの結果に基づき、亜臨界水中でグルクロン酸とグルクロノラクトンは以下の反応機構に従って分解されると仮定した。



ここで、 k_{AL} 、 k_{LA} 、 k_{Ad} と k_{Ld} はそれぞれの過程の速度定数である。これらの各過程が一次反応で表わされると仮定すると、グルクロン酸およびグルクロノラクトンの濃度、 C_A と C_L 、の変化はそれぞれ次式で与えられる。

$$dC_A / d\tau = -(k_{AL} + k_{Ad})C_A + k_{LA}C_L \quad (5)$$

$$dC_L / d\tau = k_{AL}C_A - (k_{LA} + k_{Ld})C_L \quad (6)$$

グルクロン酸とグルクロノラクトンのいずれを基質とした場合にも k_{AL} 、 k_{LA} 、 k_{Ad} および k_{Ld} の値は共通であり、温度のみに依存するはずである。そこで、Microsoft Excel[®]のSolver機能を用いて、所定の温度におけるグルクロン酸およびグルクロノラクトン(いずれも0.5%(w/v))の分解過程における両成分の濃度の実測値と式(5)と式(6)による計算値との残差二乗和が最小となるように最適な k_{AL} 、 k_{LA} 、 k_{Ad} と k_{Ld} の値を決定した。

Fig. 4は、0.5%(w/v) グルクロン酸または0.5%(w/v) グルクロノラクトンの190°Cでの分解過程における両成分の濃度の変化を示す。また、図中の曲線は上述の方法により決定した速度定数 k_{AL} 、 k_{LA} 、 k_{Ad} および k_{Ld} を用いた計算線であり、実測値の傾向をよく表現した。したがって、これらの分解過程は式(4)の機構に従うと考えて矛盾しない。

他の温度においても同様にして、各過程の速度定数を算出した。それらの温度依存性は、Fig. 5に示すように、式(3)のArrhenius式に従い、グルクロン酸がグルクロノラ

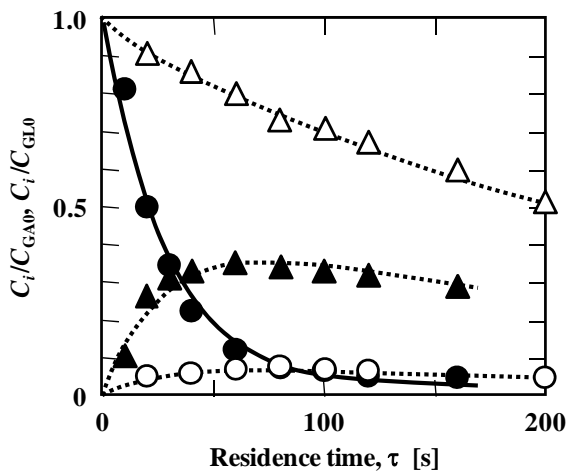


Fig. 4. Concentrations of (●, ○) glucuronic acid and (▲, △) glucuronolactone at different residence times for the degradations at 190°C of glucuronic acid (closed symbols) and glucuronolactone (open symbols). C_{GA0} and C_{GL0} are the feed concentrations of glucuronic acid and glucuronolactone, respectively.

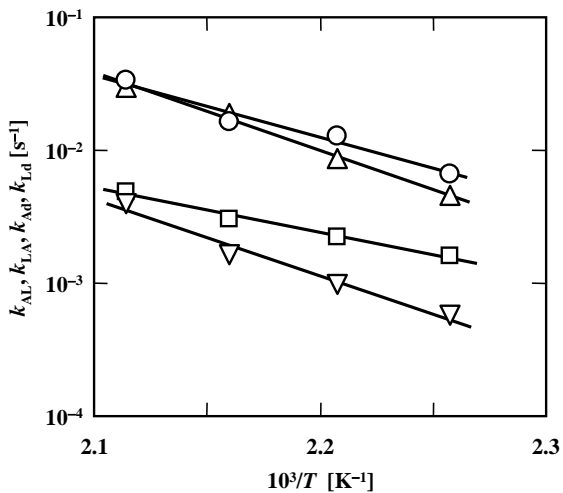


Fig. 5. Arrhenius plots for the rate constants, (○) k_{AL} , (□) k_{LA} , (△) k_{Ad} and (▽) k_{Ld}

クトンに変換される過程とその逆過程に対する活性化エネルギーはそれぞれ 88.1 J/mol と 63.2 J/mol であった。したがって、両成分間の平衡は低温ほどグルクロノラクトンが生成する側に偏倚することが示された。また、グルクロン酸とグルクロノラクトンのそれぞれが分解される過程の活性化エネルギーはともに 110 J/mol であり、ほぼ同じ値であった。

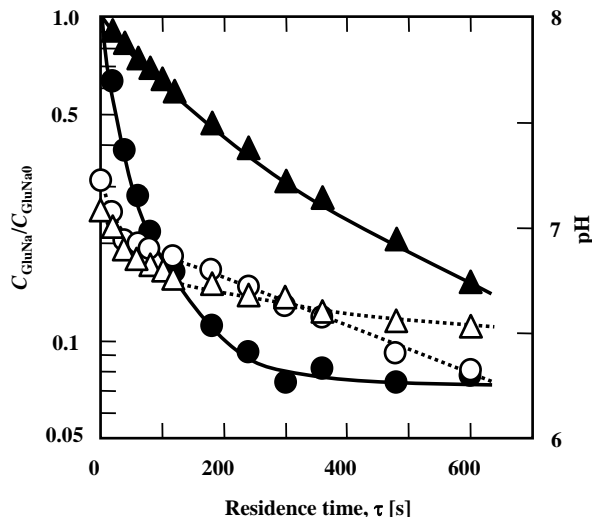


Fig. 6. Degradation processes (closed symbols) and pH changes during the process (open symbols) for sodium glucuronate at (▲, △) 140°C and (●, ○) 160°C

140°C と 160°C におけるグルクロン酸ナトリウム (GluNa) の分解過程とそのときの反応液の pH の変化を Fig. 6 に示す。グルクロン酸ナトリウムは反応時間 (平均滞留時間) が長くなっても完全に分解されることはなく、一定の値に漸近した。140°C から 170°C の範囲では、そのレベルは温度に依存せず、未分解率 $y = C_{GluNa}/C_{GluNa0}$ がほぼ 0.07 であった。そこで、グルクロン酸ナトリウムの分解過程は、未分解率が一定値 ($y_{\infty} = 0.07$) に漸近することを考慮して、式 (2) の Weibull 式を修飾した式 (7) を適用した。

$$\frac{y - y_{\infty}}{1 - y_{\infty}} = \exp[-(k\tau)^n] \quad (7)$$

ここで、 k と n はそれぞれ速度定数と形状係数であり、上記と同様に、Microsoft Excel[®] の Solver 機能を用いて実測値にもっとも適合するように決定した。Fig. 6 中の実線はそうにして得られたパラメータを用いた計算線である。

また、速度定数の温度依存性についても、上記と同様に、Arrhenius 式で表現でき、活性化エネルギーは 147 J/mol と算出された。

4. 結論

管型反応器を用いて、H⁺ 形および Na⁺ 形のガラクトン酸およびグルクロン酸の亜臨界水中での分解過程を測定した。対イオン形にかかわらず、グルクロン酸はガラクトン

ロン酸より分解され易かった。また、いずれのウロン酸も Na^+ 形は H^+ 形より速く分解された。ガラクトン酸の分解過程は一次反応速度式で表現できたが、他の成分の分解過程は一次反応速度式では表現できなかった。そこで、ガラクトン酸ナトリウムの分解過程は Weibull 式を適用して解析した。また、グルクロン酸ナトリウムは完全には分解されず、一定の未分解率(約 0.07)に漸近した。この点を考慮した Weibull 式により、分解過程を表現した。さらに、グルクロン酸の分解過程では可逆的にグルクロノラクトンが生成するとともに、各成分は他の成分に分解された。これらの各過程が一次反応速度式で表わされると仮定した速度式は、グルクロン酸とグルクロノラクトンの濃度変化をよく表現した。

このように、酸性多糖を構成するウロン酸の亜臨界水中での分解速度過程は、ウロン酸の種類とともに対イオン形によっても大きく異なった。

引用文献

- 1) Miller, D. J. and Hawthorne, S. B. (1998). Method for determining the solubilities of hydrophobic organics in subcritical water. *Anal. Chem.*, 70, 1618-1621.
- 2) Clifford, T. (1998). *Fundamentals of supercritical fluids*. New York, Oxford University, pp. 22-23.
- 3) Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food by-products, algae and microalgae. *Food Chem.*, 98, 136-148.
- 4) Wiboonsirikul, J. and Adachi, S. (2008). Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment. *Food Sci. Tech. Res.*, 14, 319-328
- 5) Haghghat Khajavi, S., Ota, S., Nakazawa, R., Kimura, Y. and Adachi, S. (2006). Hydrolysis kinetics of trisaccharides consisting of glucose, galactose, and fructose residues in subcritical water. *Biotechnol. Prog.*, 22, 1321-1326.
- 6) Cunha, L. M., Oliveira, F. A. R. and Oliveira, J. C. (1998). Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by Weibull probability distribution function. *J. Food Eng.*, 37, 175-191.
- 7) Harris, D. C. (1998). Nonlinear least-squares curve fitting with Microsoft excel solver. *J. Chem. Educ.*, 75, 119-121.

No. 0842

Effect of the Counter-Ion Form of Acidic Polymer on Its Degradation in Subcritical Water

Shuji Adachi

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

Water that maintains its liquid state at the temperature range of 100°C to 374°C (critical temperature) under pressurized conditions is called subcritical water. Subcritical water has two distinct features: one is a lower relative dielectric constant at higher temperature, and another is a high ion product. The latter feature indicates that subcritical water itself acts as an acid or base catalyst due to high concentrations of hydrogen and hydroxyl ions. Based on this property, subcritical water is expected to be usable for recovering constituent components of polymers in food and agricultural wastes or extracting functional substances from natural resources. Acidic polysaccharides, such as pectin and alginic acid, are found in food and agricultural wastes as well as neutral polymers such as starch and cellulose. The acidic polysaccharides are consisted of some kinds of uronic acids, the counter-ions of which are hydrogen, sodium, potassium ions and so on. In order to efficiently recover the constituent uronic acids from the wastes by their subcritical water treatment, kinetic aspects are required on both hydrolysis of the polysaccharides and degradation of the constituent uronic acids. The kind and counter-ion type of uronic acids would affect their degradation kinetics. In this context, degradation kinetics of galacturonic and glucuronic acids in hydrogen and sodium forms in subcritical water was examined using a tubular reactor.

Regardless of the counter-ion form, glucuronic acid and sodium glucuronate was more easily degraded than galacturonic acid and sodium galacturonate. For both the uronic acids, the sodium form was more fragile than the hydrogen form. The degradation process of galacturonic acid obeyed the first-order kinetics at any temperature. The Weibull probabilistic equation was applied to describe the degradation process of sodium galacturonate. These substrates were almost completely decomposed at prolonged reaction times. However, the degradation of sodium glucuronate leveled off at a fraction of remaining substrate (about 0.07), and was described by a modified Weibull-type equation. During the degradation of glucuronic acid, glucuronolactone was reversibly produced. From the observation, a reaction scheme for the degradation of glucuronic acid in subcritical water was proposed. The changes in the concentration of glucuronic acid and glucuronolactone were analyzed based on the kinetic equations derived from the scheme. The calculated results are found to be in satisfactory agreement with the experimental ones.