

含塩亜臨界水中での単糖類の変換に対する食塩の役割

小林 敬

京都大学大学院農学研究科

概要 グルコースおよびフルクトースの含塩亜臨界水中での分解および異性化挙動を検証した。まず、食塩水(NaCl = 0~20%)にグルコースまたはフルクトースを終濃度 1%となるように溶解させた。次いで、180~220°Cの範囲に保った管形反応器中で、グルコース溶液またはフルクトース溶液を通液し、所定の滞留時間(20~420 s)となるように亜臨界処理を実施した。得られた処理液を HPLC で分析した。処理温度が上昇すると、塩の有無にかかわらずグルコースおよびフルクトースの分解は加速した。しかし、グルコースとフルクトースで分解挙動が異なり、グルコースの分解速度は、反応後半で低下する傾向が観測された。この反応挙動を定量化するために、速度解析を実施したところ、Weibull 型の式で反応を表現できた。そして、反応の進行につれて、グルコースからフルクトースと少量のマンノースが生成する異性化が観測された。

フルクトースを亜臨界処理した場合には、反応の後半で、反応速度が増加する傾向が観測された。この傾向は、低温では顕著ではなかったが、高温で亜臨界処理した場合には顕著になった。この反応を速度解析したところ、反応の前半は一次反応であることが判明した。一方、反応の後半では、自触媒型の反応速度式を適用することができた。これは、フルクトースの過分解に伴い有機酸が生成し、その有機酸がフルクトースの分解を促進したと解釈することができた。また、フルクトースからのグルコースおよびマンノースの生成は確認できなかった。このことから、含塩亜臨界水中ではグルコース(アルドース)からフルクトース(ケトース)への異性化は起こるものの、逆反応はほとんど起こらず、フルクトースは有機酸などに過分解されるのみであると言える。

塩濃度(0~20%)がグルコースおよびフルクトースの分解に及ぼす影響を 200°Cで測定した。グルコースを亜臨界処理したところ、分解の促進が観測された。しかし、促進の程度は小さく、塩化ナトリウムがグルコースの変換に及ぼす影響は大きくないことが示唆された。一方、グルコースの異性化によって生成したフルクトースの生成挙動は塩濃度によって大きく異なり、10~20%の塩濃度ではフルクトースの生成率が低かった。次いで、同様にしてフルクトースの分解挙動に及ぼす塩濃度の影響を検討した。グルコースの場合とは大幅に異なり、塩濃度の上昇とともにフルクトースの分解は加速した。そして、グルコースやマンノースの生成は確認されなかった。このことから、塩化ナトリウムはグルコースの分解をやや促進する一方、フルクトースの分解を大幅に促進すると考えられる。

これらの結果より、亜臨界処理において塩化ナトリウムが存在する場合、主にケトースの分解が大きな影響を受けることが判明した。これらの結果は、亜臨界水処理による食品加工において起こる反応の解釈に寄与するものと思われる。

1. 研究目的

沸点以上の加圧下で液体状態を保った水のことを亜臨界水と呼ぶ。亜臨界水は誘電率が低く、高いイオン積を有するため、抽出や反応の触媒としての利用が期待されている。また、水は無害な物質であることから、亜臨界水

処理の食品加工への適用も期待されており、抽出力を利用したバイオマスからの糖類やタンパク質、フェノール性物質などの抽出が報告されている⁽¹⁻⁶⁾。抽出の際には、並行して含有成分の反応が起こる。しかし、食品は多成分系であるため、同時に起こっているすべての反応を分析する

ことは不可能である。そこで、反応挙動を説明するために、単一あるいは少数の成分を含んだモデル系において解析がなされようとしている。我々は主要な栄養素の1つである糖が亜臨界水中でどのように分解されるのかを解析してきた⁽⁷⁻¹⁰⁾。そして、亜臨界水中で糖は分解するとともに、一部の糖は他の糖に異性化することを見いだした⁽¹⁰⁾。

食品加工を行う際には、食塩はごく一般的に使用される。しかし、亜臨界条件下での塩化ナトリウムが食品成分に対して果たす役割についてはほとんど解明されていない。そのため、食塩を使用した亜臨界水処理による食品加工で生起する現象を予測することも実現していない。そこで、本研究では、単糖であるグルコースおよびフルクトースを用いて、含塩亜臨界水中での反応挙動を速度論的に検証した。

2. 研究方法

2.1 材料

グルコース、フルクトース、塩化ナトリウムおよびDOWEX 50Wx8 陽イオン交換樹脂(50-100メッシュ)は和光純薬(大阪)から購入した。他の物質は、和光純薬またはナカライテスク(京都)から購入した。

2.2 反応器

亜臨界水処理は管形反応器中で実施した。反応器はHPLCポンプ(LC-10ATVP, 島津, 京都)と背圧弁(P-880, Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA)およびHPLCチューブで構成した。亜臨界処理のために、チューブの一部(体積 1.9 mL)をシリコン油浴(180-220°C)に浸した。そして、残りのチューブは冷却用の水浴中に浸した。ここで、塩化ナトリウム水溶液が本検討で用いる温度帯(180-220°C)で腐食性を示すため、ステンレスHPLCチューブの使用は不適であると考えられた。そこで、PEEK樹脂製のHPLCチューブ(0.75 mm I.D.×5 m, 外径 1/16 インチ)を亜臨界処理に使用した。PEEKチューブは不活性であるが、高温ではガラス転移を起こすため強靱さに欠ける。そこで、チューブの破損を避けるために、PEEKチューブを内径 2 mm のステンレスチューブに挿入し、PEEKチューブとステンレスチューブの間をシリコン油で満たした。

2.3 グルコースとフルクトースの亜臨界処理

グルコースまたはフルクトースを、蒸留水または食塩水

(1-20%, g/g-water)に終濃度が1% (g/g-water)となるように溶解した。亜臨界処理に先だて、溶液を減圧下で超音波を与えながら脱気した。そして、大気中の酸素の再溶解を防ぐため、窒素のガスバッグを容器に接続した。溶液を所定の滞留時間(20-420 s)となるように管形反応器(体積 1.9 mL)に送液した。そして、処理液の組成をHPLCにより測定した。HPLC分析の前に、内部標準として、等量の1% (w/v)のキシロース水溶液を処理液(0.5 mL)と混合した。次いで、混合液からナトリウムイオンを除去するために、1 mLのDOWEX 50Wx8 陽イオン交換樹脂(H⁺形, wet)と混合し、攪拌した。本操作で得られた上澄みをHPLC分析に供した。

2.4 HPLC分析

HPLCポンプ(LC-20AD, 島津)および紫外可視検出器(SPD-20A, 島津; 検出波長 190 nm), COSMOSIL Sugar-D カラム(3.0 mm I.D.×250 mm, ナカライテスク)からなるHPLCシステムでグルコース、フルクトースおよびマンノースを定量した。移動相には80%のアセトニトリルを用い、流速は0.5 mL/minとした。なお、内部標準としてキシロースを用いた。

3. 研究結果と考察

3.1 グルコースとフルクトースの亜臨界処理に及ぼす温度の影響

図1にグルコースの含塩亜臨界水中での処理に伴う各成分の経時変化を示す。180°Cにおいては、塩化ナトリウムの存在がグルコースの分解およびフルクトースとマンノースの生成に及ぼす影響は小さかった。一方、200°C以上では、グルコースの減少は塩化ナトリウムの存在により明らかに加速した。

塩化ナトリウムは220°Cにおけるフルクトースの生成を加速し、含塩亜臨界水中でその最大収率は約5%に達した。そして、このことが、塩化ナトリウムの存在によりフルクトースの選択性がより高まったことを示している。一方、フルクトースは反応初期には増加したが、200~220°Cの範囲では反応の後半に分解する傾向が観測された。これは塩化ナトリウムが存在する場合に顕著であり、高温ほどフルクトースの減少の程度が大きかった。これらの結果より、200°C以上では塩化ナトリウムの触媒としての効果が現れ、グルコースおよびフルクトースのいずれも分解が促進されたと

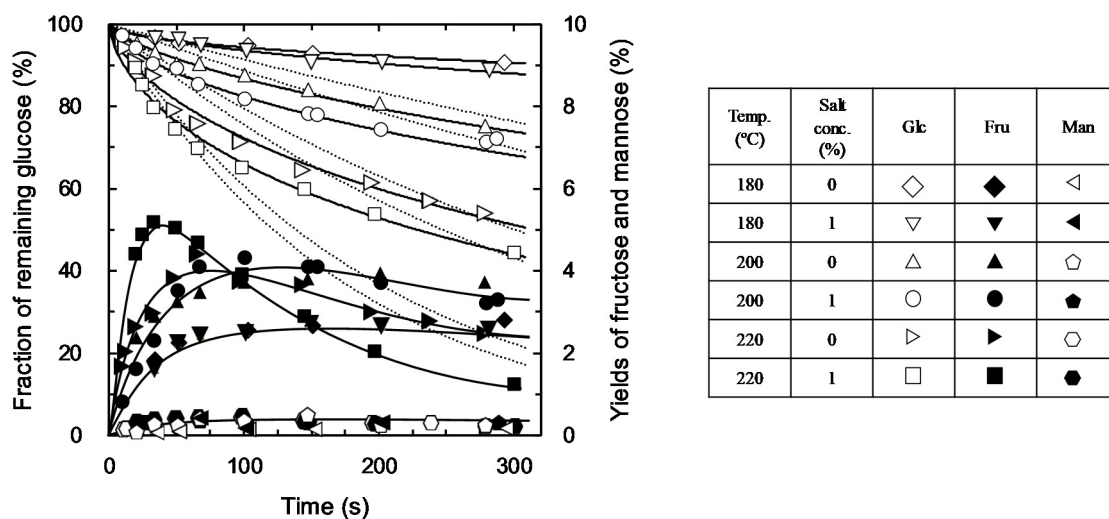


図1. グルコースの分解における処理温度の影響。図中の実線は計算線を示す。また、点線は一次反応を仮定した場合の計算線である。

考えられる。

含塩亜臨界水中でのグルコースの処理により、少量のマンノースも生成した(収率<0.5%)。しかし、塩化ナトリウムの添加がマンノースの収率に及ぼす影響は小さかった。我々は、含水アルコールを亜臨界状態に保持した亜臨界含水アルコール中でグルコースからマンノースへの異性化が促進することを報告した⁽¹¹⁾。亜臨界含水アルコール中とは異なり、含塩亜臨界水中ではマンノースの生成は促進されなかったことから、アルドースであるグルコースとマンノースの間の異性化には塩化ナトリウムの影響はほとんどないと言える。また、亜臨界水中でグルコースなどの糖が分解されると、有機酸が生じることも知られている。これらの結果より、グルコースの反応は、他の糖への異性化と有機酸などへの分解の組み合わせからなると考えられる。

グルコースやマンノースはアルドースであるが、ケトースであるフルクトースも亜臨界処理の対象となりうる。そこで、含塩亜臨界水中でのフルクトースの反応についても同様に検討した。図2に、180~220°Cにおけるフルクトースの減少の経時変化を示す。塩化ナトリウムの存在により、いずれの処理温度においても、フルクトースの減少が加速した。そして、高温で処理するほど反応は速くなり、塩化ナトリウムを添加することでさらに加速した。また、塩化ナトリウ

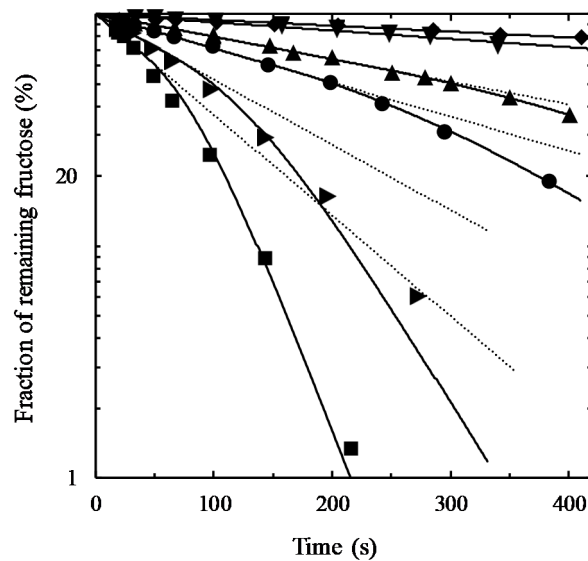


図2. 温度および塩化ナトリウムの存在がフルクトースの分解挙動に及ぼす影響。図中のシンボルは図1と同様。実線は計算線を示す。点線は一次反応を仮定した計算線。

ムの存在の有無にかかわらず、グルコースおよびマンノースの生成は確認されなかった。

このように、グルコースからのフルクトースとマンノースの生成が確認されたが(図1)、フルクトースからは他の糖が生成しなかったことから、フルクトースの減少は主に有機酸などへの分解に起因すると考えられる(図3)。そして、

グルコースからフルクトースへの変換は実質的に不可逆であると見なせた。また、グルコースからマンノースの生成が確認されたが、生成したマンノースも分解され、有機酸などに変化している可能性も示唆された。

3.2 グルコースとフルクトースの亜臨界処理に及ぼす塩濃度の影響

前節では、180~220°Cの範囲で、グルコースとフルクトースの変化の挙動を測定した。その結果、塩化ナトリウムの存在がいずれの糖の反応挙動にも影響を与えることが示唆されたため、本節では、塩化ナトリウムの濃度の影響を検討した。ここでは、より有意で信頼性の高い結果を得るために、200°Cで検討を実施した。

グルコースの減少挙動を測定したところ、塩化ナトリウムの濃度はグルコースの分解挙動にやや影響を及ぼすこと

が示唆された(図4)。しかし、その影響は限定的なものであり、20%の塩化ナトリウム存在下でも分解速度の顕著な増大は認められなかった。一方、グルコースの異性化に伴うフルクトースの生成は塩濃度の影響を受けた。塩化ナトリウム濃度が0~5%の範囲では、フルクトースの収率は最大で約4%程度に到達し、反応の後半で徐々に分解されていった。しかし、10~20%の塩化ナトリウム濃度ではフルクトースの生成が速く制され、最大でも2%程度しか生成しなかった。また、反応の後半では、フルクトースの分解が起こり、最終的に1%以下の生成率になった。これらの結果より、塩化ナトリウム濃度が高い場合には、フルクトースの選択率が低くなる可能性が示唆された。マンノースの収率は、全反応期間を通じて低く(<0.5%)、20%の塩化ナトリウム存在下では、その生成は確認されなかった。

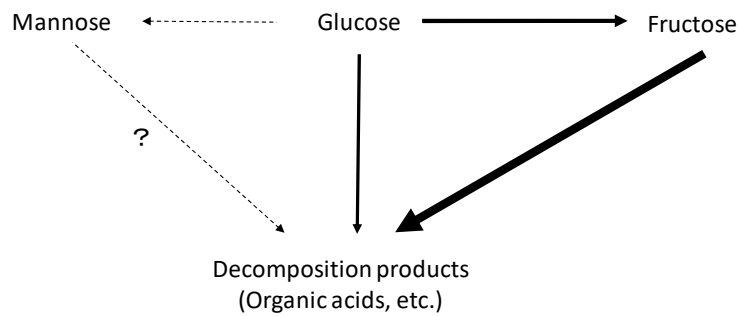


図3. 想定する反応経路

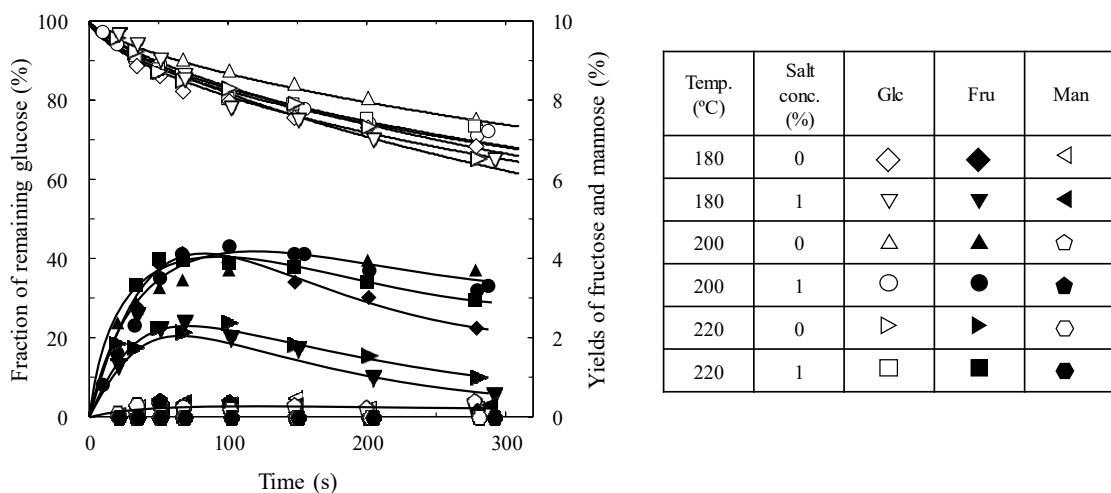


図4. 塩化ナトリウム濃度がグルコースの分解と異性化に及ぼす影響。グルコースの実線は計算線を表す。フルクトースおよびマンノースに関する実線はフリーハンドによる。

図 5 に、200°Cにおけるフルクトースの減少と異性化の経時変化に及ぼす塩化ナトリウム濃度の影響を示す。フルクトースの分解は塩濃度の上昇とともに加速された。このことから、塩化ナトリウムが何らかの触媒作用を示していることが考えられる。なお、この反応において、グルコースとマンノースは検出できず、ケトースからアルドースへの変換は起こりにくいと考えられる。

図 3 において、グルコースの亜臨界水処理の際に、塩濃度が高まるほどフルクトースの生成率が低下した。これも、生成したフルクトースが塩化ナトリウムの影響を受け、速やかに分解した結果、低収率の反応となることが考えられる。

3.3 グルコースとフルクトースの分解動力学

図 1 および 4 で得られた結果を、片対数プロットしたところ、いずれの経時変化についても直線は得られなかった。このことは、反応が一次反応ではないことを示している。そして、グルコースの分解は反応の後半で、一次反応と比較すると減速することも明らかになった。亜臨界水中では、糖類の分解が経験的に Weibull 型の式(1)で表現できることが知られており^(12,13)、ここでも当該式の適用を試みた。

$$\frac{d(C_G/C_{G0})}{dt} = -(k_G t)^n \quad (1)$$

ここで、 C_G はグルコース濃度、 C_{G0} はグルコースの初濃度、 k_G はグルコース減少の速度定数、 t は時間、 n は形状定数である。Microsoft® Excel 2013 の Solver 機能を用いて、速度式からの計算結果と実測値が一致するように速度定数および形状定数を算出した。その結果、グルコースの減少の経時変化は、すべての条件において Weibull 式によって良好に表現できた。Weibull 式のみからは反応機構を解明することはできないが、少なくともグルコースの分解挙動を予測することができ、含塩亜臨界水中での糖類の分解挙動を知る上で、参考となる。

図 6 に速度定数および形状定数と塩濃度の関係を示す。形状定数はややばらつきが認められるものの、0.7 程度であり、塩濃度には依存しなかった。一方、反応速度定数 k_G は塩濃度の上昇とともに増大した。

次いで、フルクトースの分解の動力学解析について検討した。180°Cにおけるフルクトースの分解は次に示す一

次反応式(2)ですべて表現できた(図 2)。

$$\frac{d(C_F/C_{F0})}{dt} = -k_{F1}(C_F/C_{F0}) \quad (2)$$

ここで、 C_F はフルクトース濃度、 C_{F0} はフルクトースの初濃度、 k_{F1} はフルクトース分解における一次反応速度定数である。

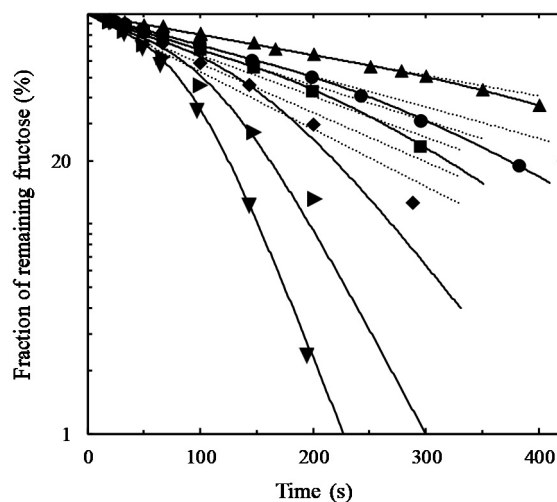


図 5. フルクトースの含塩亜臨界水処理における塩化ナトリウム濃度の影響。シンボルは図 4 と同様である。実線は計算線を示し、点線は一次反応を仮定した計算線。

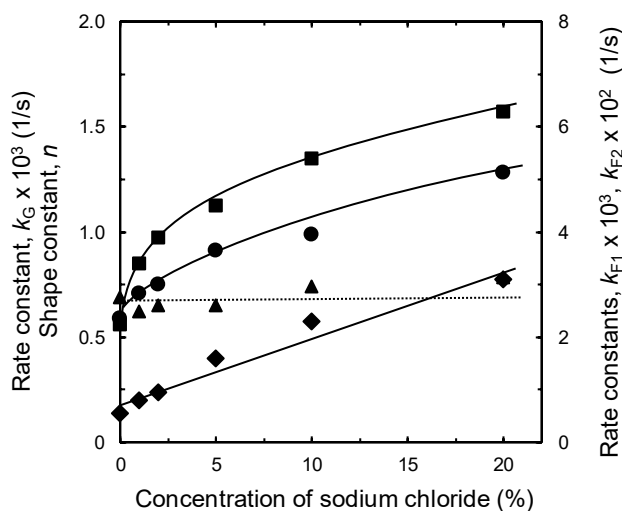


図 6. 速度定数および形状定数と塩濃度の関係。

●, k_G ; ■, k_{F1} ; ◆, k_{F2} ; ▲, 形状定数 n

一方、200～220°Cの範囲では、反応の初期のみ一次反応を適用でき、反応の後半では一次反応よりも反応が加速した。200°Cにおいて塩化ナトリウム濃度の影響を検討した結果においても、いずれの反応でも反応の前半にのみ一次反応を適用でき、高塩濃度では反応の後半に大幅な反応の加速が観測された。ここで、一次反応が適用不可能となるフルクトースの残存率を計算したところ、0～5%の塩濃度では約60%、より高濃度の塩化ナトリウム存在下では約80%と見積もられた。このことから、高濃度の塩化ナトリウムが触媒としての作用を果たしていることが示唆される。

このように、反応の後半に一次反応よりも反応が加速され、フルクトースが減少する原因について考えてみる。亜臨界水中や酸性水溶液中でのフルクトースの分解において、ギ酸やレブリン酸などの有機酸が生成することが知られている⁽¹⁴⁾。本研究においても、酸性物質が生成していることが考えられ、これらの物質が反応の後半における加速減少を惹起していることが考え得る。そこで、この過程を具現しうるモデルである自触媒型反応式(3)の適用を試みた。

$$\frac{d(C_F/C_{F0})}{dt} = -k_{F2}(C_F/C_{F0})(1 - C_F/C_{F0}) \quad (3)$$

ここで、 k_{F2} は自触媒型反応における反応速度定数である。式(2)および(3)を適用し、計算結果と実測値が一致するように速度定数 k_{F1} および k_{F2} を計算した。その結果、実測値を良好に表現しうる速度定数の組が得られた。このことは、反応の後半に自触媒型反応を適用することが合理的かつ妥当であることを示唆している。

図5に、 k_{F1} および k_{F2} の塩化ナトリウム濃度依存性を示す。それぞれの速度定数は塩濃度の上昇とともに増大した。そして、 k_{F2} は塩濃度に対して直線関係を示し、経験的に次の式(4)で表すことができた。

$$k_{F2}(1/s) = 1.27 \times 10^{-3} C_s + 7.45 \times 10^{-3} \quad (r^2 = 0.957) \quad (4)$$

この式が得られたことにより、 k_{F2} の値が予測できることになる。

ここまでで得られたすべての速度定数を絶対温度の逆数に対して片対数プロットした(図7, アレニウスプロット)。各プロットから直線が得られ、活性化エネルギーを算出できた。活性化エネルギーは112～144 kJ/molであり、亜臨界流体⁽¹¹⁾やイオン液体中⁽¹⁵⁾での糖類の分解と同程度の活性化エネルギーであり、超臨界流体中でのそれよりも幾分高かった⁽¹⁶⁾。

グルコースやフルクトース、マンノースはアルカリ条件下でLBAE転移を通じて相互に異性化する。本研究におけるフルクトースの分解において、反応の後半では有機酸の生成を示唆する結果が得られた。有機酸の生成によりLBAE転移に必要なアルカリが中和され、転移が起こらないと考えれば、フルクトースからグルコースやマンノースが生成しなかったことを合理的に説明できる。また、グルコースの分解においても、反応中にフルクトースが生成した。このフルクトースがさらに分解すると有機酸を生成するため、同様にアルカリの中和が起こる。このようなアルカリの中和により、グルコースのLBAE転移が抑制されるものと考えられる。このことが、グルコースの亜臨界処理における、後半部分での反応速度の低下(異性化の抑制)につながったものと考えられる。

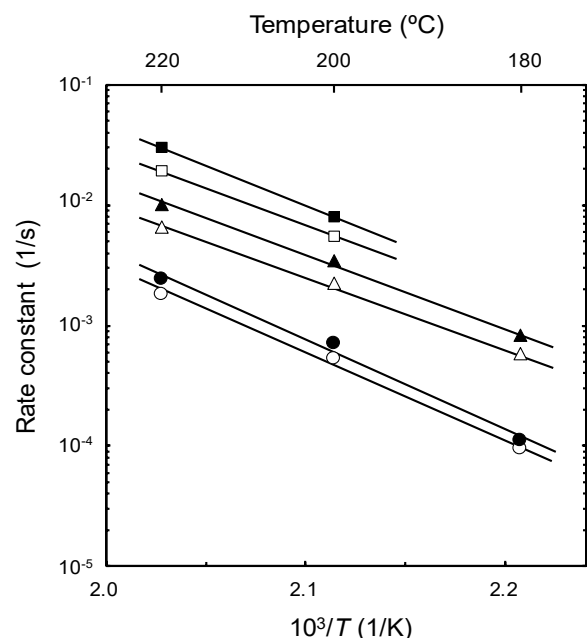


図7. 各反応過程のアレニウスプロット。●, ○ k_G ; ■, □ k_{F2} ; ▲, △ k_{F1} ; 中抜きシンボルは1%塩化ナトリウム添加; 黒塗りのシンボルは塩化ナトリウム無添加

4. 今後の課題

塩化ナトリウムの添加はグルコースおよびフルクトースの分解を促進することが明らかになった。特に、フルクトースの分解は塩濃度の影響を顕著に受け、高塩濃度では、分解が大幅に加速された。一方、グルコースとフルクトースの反応機構の違いについては明らかにできなかった。これらに関する知見がそろえば、含塩亜臨界水中での食品加工を行う際に生起しうる現象を理解することができ、含塩亜臨界水の利用の促進につながると考えられる。

5. 文献

- 1) S. Kodama, T. Shoda, W. Wahyudiono, S. Machmudah, H. Kanda, M. Goto: Subcritical water extraction of polysaccharides using a semi-batch extractor, *Mod. Appl. Sci.*, **9**, 220–224 (2015).
- 2) P. Khuwijitjaru, A. Pokpong, K. Klinchongkon, and S. Adachi: Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *Intl. J. Food Sci. Technol.*, **49**, 1946-1952 (2014).
- 3) S.M. Zakaria and S.M.M. Kamal: Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Eng. Rev.*, **8**, 23–34 (2016).
- 4) W. Abdelmoez, S.M. Nage, A. Bastawess, A. Ihab and H. Yoshida: Subcritical water technology for wheat straw hydrolysis to produce value added products, *J. Clean. Prod.*, **70**, 68–77 (2014).
- 5) B. Aliakbarian, A. Fathi, P. Perego and F. Dehghani: Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *J. Supercrit. Fluid.*, **65**, 18-24 (2012).
- 6) K.S. Duba, A.A. Casazza, H.B. Mohamed, P. Perego and L. Fiori: Extraction of polyphenols from grape skins and defatted grape seeds using subcritical water: experiments and modeling. *Food Bioprod. Proc.*, **94**, 29-38 (2015).
- 7) R. Wang, T.L. Neoh, T. Kobayashi, Y. Miyake, A. Hosoda, H. Taniguchi and S. Adachi: Degradation kinetics of glucuronic acid in subcritical water. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 601-605 (2010).
- 8) R. Wang, T. Kobayashi and S. Adachi: Degradation kinetics of D-galacturonic acid and sodium D-galacturonate in subcritical water. *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 181-184 (2009).
- 9) R. Wang, T. Kobayashi and S. Adachi: Degradation of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine in subcritical water and properties of the degradation products. *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 273-278 (2011).
- 10) D.-M. Gao, T. Kobayashi and S. Adachi: Kinetics of sucrose hydrolysis in a subcritical water-ethanol mixture. *J. Appl. Glycosci.*, **61**, 9-13 (2014).
- 11) D.-M. Gao, T. Kobayashi and S. Adachi: Kinetic analysis for the isomerization of glucose, fructose, and mannose in subcritical aqueous ethanol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1005-1010 (2015).
- 12) S. Haghghat-Khajavi, Y. Kimura, T. Oomori, R. Matsuno and S. Adachi: Degradation kinetics of monosaccharides in subcritical water. *J. Food Eng.*, **68**, 309-313 (2005).
- 13) J. Ohshima, S. Haghghat-Khajavi, Y. Kimura and S. Adachi: Effects of sodium chloride on the degradation of hexoses and the hydrolysis of sucrose in subcritical water. *Eur. Food Res. Technol.*, **227**, 799-803 (2008).
- 14) F.S. Asghari and H. Yoshida: Acid-catalyzed production of 5-hydroxymethyl furfural from D-fructose in subcritical water. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **45**, 2163-2173 (2006).
- 15) T. Kobayashi, M. Yoshino, Y. Miyagawa and S. Adachi: Production of 5-hydroxymethylfurfural in a eutectic mixture of citric acid and choline chloride and its extractive recovery. *Sep. Purif. Technol.*, **155**, 26-31 (2015).
- 16) B.M. Kabyemela, T. Adschiri, R.M. Malaluan and A. Kunio: Kinetics of glucose epimerization and decomposition in subcritical and supercritical water. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **36**, 1552-1558 (1997).

Effects of Salts on the Conversion Behavior of Saccharides in Subcritical Water

Takashi Kobayashi

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

Fructose and glucose were treated in salty subcritical water to analyze their decomposition behavior. Fructose and glucose were dissolved in saline solution (NaCl=0~20%), and the solution was treated in a tubular reactor kept at 180–220°C with the residence times of 20–400 s. The resulting mixture was analyzed using HPLC to quantify the products.

When the treatment temperature was higher, decomposition rate of glucose and fructose increased despite the presence of the salt. However, at the latter stage of the reaction, decomposition of glucose became slower. Kinetic analysis for the glucose decomposition was then performed, and the reaction rate could be expressed by the Weibull equation. The formation of fructose and small amount of mannose was observed during the subcritical water treatment of glucose.

In the case of fructose treatment, however, the reaction rate increased at the latter stage compared to that assuming the first-order reaction. This tendency was not remarkable at lower temperature; but became greater at elevated temperature. Kinetic analysis for the fructose decomposition indicated that the first half of the reaction was the first-order reaction, and the latter-stage one was the autocatalytic reaction. The acceleration at the latter stage would be due to the formation of organic acids, such as formic acid and levulinic acid. Formation of glucose and mannose from fructose was not observed, indicating that aldose-to-ketose isomerization only occurred in salty subcritical water and the reverse reaction rarely occurred.

Effects of the salt concentration were evaluated on the decomposition behavior of glucose and fructose during the subcritical water treatment. Glucose decomposition was slightly affected by the difference of the salt concentration; while that for fructose was greatly did.

These results indicate that the presence of sodium chloride greatly affected the decomposition of ketose in subcritical water. This would contribute to advance in the interpretation and application of subcritical water treatment of food-based stuffs.