

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06559

研究課題名(和文) Development of Reactive Separation Technology Employing the Synergy of Sub/Supercritical H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub> System研究課題名(英文) Development of Reactive Separation Technology Employing the Synergy of Sub/Supercritical H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub> System

研究代表者

キタイン アルマンド (QUITAIN, ARMANDO)

熊本大学・グローバル教育カレッジ・教授

研究者番号：50504693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：超臨界CO<sub>2</sub>と亜臨界H<sub>2</sub>Oの相乗効果を利用したプロセスを用いてヘスペリジン(HPD)からヘスペレチン(HPT)を加水分解することが成功した。提案された新しい反応分離を用いた従来の方法と比較して約2倍の収率が得られた。HPTの同時かつ選択的な分離は、単に反応生成物にSCCO<sub>2</sub>を通すことによって達成された。ラマン分光法の使用に関するバリャドリッド大学を含む国際的な協力が始まった。また、ASEAN大学と協力し、バイオマスからプラットフォーム化学物質および燃料への変換を含むようにさらに拡張された。今後、量子計算技術と分子動力学シミュレーションを用いて反応メカニズムを詳しく解明したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in hydrolyzing hesperidin (HPD) to hesperetin (HPT) in the temperature range of 150 to 200 °C, and pressures of 15 to 25 MPa obtaining about 2-fold increase in yield compared to the conventional method using our proposed novel reactive separation process utilizing the synergy of SCCO<sub>2</sub> and subcritical H<sub>2</sub>O. Simultaneous and selective separation of HPT was achieved by simply passing SCCO<sub>2</sub> through the reaction products. International collaboration has started which includes Valladolid University on the use of visual cell and Raman spectroscopy. The application of this novel approach was further extended to include conversion of biomass to platform chemicals and fuels in collaboration with Universiti Teknologi PETRONAS, University of the Philippines and De La Salle University. Our future studies will include elucidating the reaction mechanism taking place in the proposed system using quantum calculation techniques and molecular dynamic simulations.

研究分野：超臨界流体工学及びマイクロ波技術

キーワード：supercritical CO<sub>2</sub> subcritical water hydrolysis bioflavonoids aglycone green solvent reactive separation synergy

### 1. 研究開始当初の背景

柑橘類の果皮には様々な成分が含まれており、その成分の1つであるフラボノイド類は様々な生理活性を有することが知られている。柑橘類の種類によって含まれるフラボノイドは異なるが、本研究では摘果ミカンに多く含まれるヘスペリジンに着目した。摘果ミカンとは、栽培の過程で、より大きくおいしい果実を作るため、間引きされてしまう未熟なミカンのことである。ヘスペリジンは摘果ミカン等の柑橘果皮に含まれているフラボノイドであり、抗癌作用、抗アレルギー作用、毛細血管強化・拡張作用、中性脂肪分解作用など様々な生理活性を有しているが、体内吸収率が少ないという欠点がある。このヘスペリジン中にある糖鎖を加水分解によって取り除いた物質であるヘスペレチンはヘスペリジンと同様の生理活性を有しつつ、体内吸収率が高い。そのため、ヘスペレチンの方が医薬品や健康食品への応用に適しているといえる。

従来のヘスペリジンの加水分解 (Fig. 1) は触媒として硫酸を用いて行われてきたが、硫酸による環境負荷や反応後の処理にかかる費用が大きい等の問題点がある。これらの問題を解決するために当研究室では、超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を用いた手法を提案している。本手法は、高温高压条件下(超臨界状態)で二酸化炭素と水を反応させることで触媒となる炭酸が生成し、ヘスペリジンの加水分解反応が行われる。人体に無害な二酸化炭素と水のみを反応に用いるため、従来の硫酸を用いた加水分解法よりも安全性やコストの面で優れた手法である。さらに、目的のヘスペレチンの方が超臨界二酸化炭素に溶解しやすいという、超臨界二酸化炭素へのそれぞれの物質の溶解度を利用して、加水分解反応と同時に目的物質の選択的な分離を行うことができるため、分離に必要なコストの削減も達成できる。また、本研究は年間100万トンもの量が廃棄される摘果ミカン等の未利用バイオマスの有効活用法としても期待される。

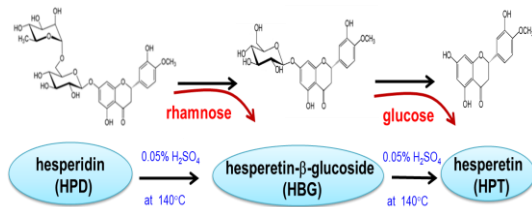


Fig. 1. Conventional method for hydrolysis of hesperidin

### 2. 研究の目的

本研究は超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を組み合わせた手法によって、ヘスペリジンの加水分解及びヘスペレチンの選択的な分離を行うことができるシステムの確立を目的とした。そこで、本手法において、温度や圧力が反応及び分離に及ぼす影響の検討や、

反応が起きるメカニズムの解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を用いたヘスペリジンの加水分解

ヘスペリジンは現在までに超臨界二酸化炭素-亜臨界水条件下で加水分解できることが確認されている。しかし、中間生成物の生成によってヘスペレチンの収率が低くなることが問題である。そこで、ヘスペレチンの収率向上を目的としてバッチ式の反応装置を用いて加水分解実験を行った。

(2) 超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を用いたヘスペリジンの反応分離実験

(1)により、本手法によるヘスペリジンの加水分解は可能であることが示された。超臨界二酸化炭素は新たな抽出技術として幅広く研究されているだけでなく、近年では水熱と組み合わせた分離技術も研究されている。これは物質の極性を活かした手法である。極性を持つ水は極性の大きい物質を溶かしやすく、非極性の二酸化炭素は極性の小さい物質を溶解しやすい。そのため、異なる極性を

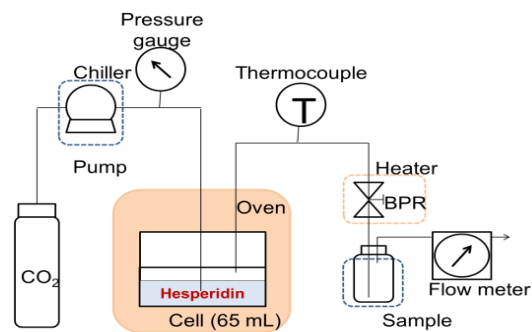


Fig. 2. Schematic diagram of the reactive-separation apparatus

持つ物質は水と超臨界二酸化炭素への溶解度によって分離され、それぞれを別々に取り出すことができる。本手法はこの原理を応用し、ヘスペリジンの加水分解及びヘスペレチンの分離を行う。

(3) メカニズムの解析

(2)により、半回分式装置 (Fig. 2) を用いて、超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を用いて、ヘスペリジンの加水分解反応と同時に生成したヘスペレチンを分離できることや、温度条件を調節することで高いヘスペレチンの総収率を得ることが判明した。そこで、本手法のメカニズムを解析するために、糖鎖の結合強度を調査するための計算化学実験と、残渣に残る糖の分析、ヘスペリジンの反応速度解析である。これらの実験の結果を示し、反応のメカニズムを考察した。

(4) バイオマス有効利用への応用の検討

本手法により、様々なバイオマス資源の有効利用の応用について検討した。

### 4. 研究成果

(1) 超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を用い

たヘスペリジンの加水分解

超臨界二酸化炭素と亜臨界水を利用したヘスペリジンの加水分解の実験を行った。結果として、回分式反応装置を用いて加水分解をすることに成功し、ヘスペレチンを生成することができた。さらに、分析結果から中間生成物を経由せずに加水分解されているヘスペリジンがあると推測された。ヘスペレチンは高圧になるにつれて収率が向上していき、15 MPaにおいて最も高い収率が得られた。20 MPaによる収率の減少は、同じ温度では圧力が増加するにつれて pH は低くなり酸性度が増すが、それは次第に落ち着きやがては一定になるということから、実験誤差であると考えられる。また、温度と時間には密接な関係が見出され、ヘスペレチンの収率に大きな影響を与える。高温になると反応速度が非常に速くなり、200 °C を超えると 45min で反応した。しかし、最大収率は温度が上昇するにつれて減少し、160 °C では 40.0 % あった収率が 220 °C では 21.5 % まで下がった。したがって、温度や反応時間が収率に大きく作用することが判明した。

(2) 超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を用いたヘスペリジンの反応分離実験

超臨界二酸化炭素と亜臨界水を利用したヘスペリジンの反応分離実験として、半回分式反応装置 (Fig. 2) を用いてヘスペリジンの加水分解と同時に生成されたヘスペレチンを分離する実験を行った。温度と圧力の条件を変更して、抽出物及び残渣の分析を行うことで反応分離プロセスの可能性を検討した。結果として、どの条件でも加水分解と同時にヘスペレチンの分離を行うことに成功した。また分離された物質には中間生成物が極めて少なかったことや、抽出物にヘスペレチン、残渣にヘスペリジンが多く含まれていたことから選択的に分離が出来ていることも確認できた。また、定量分析の結果より、温度

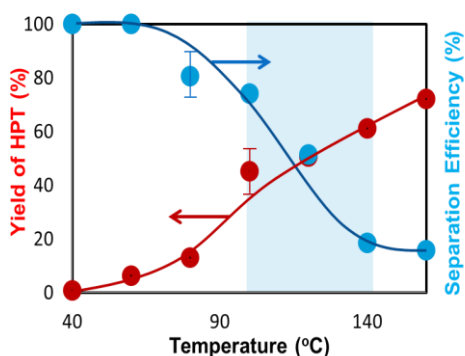


Fig. 3. HPLC analyses of the sugars showing the presence of rutinose in the products (residues)

上昇に伴い生成されるヘスペレチンの収率は増加するが、二酸化炭素によって分離されるヘスペレチンの割合 (分離率) は低下することが確認された。収率の増加は、炭酸イオ

ンの pH や、亜臨界水の酸化力が増加したことや、反応に必要なエネルギーが増加することに起因すると考えられる。分離率の低下は、超臨界二酸化炭素の密度が高温条件下では減少するため、ヘスペレチンの超臨界二酸化炭素への溶解度が下がったのだと考えられる (Fig. 3)。

(3) メカニズムの解析

本手法のメカニズムを解析するために、大きく分けて3種類の実験を行った。まず、糖鎖の結合強度を調査するために計算化学実験を行い、ヘスペリジンから中間生成物のヘスペリジン-β-グルコサイドを生成する際に切れる結合とヘスペリジンからヘスペレチンを直接生成する際に切断される結合の強度が等しいということが判明した。この結果と超臨界二酸化炭素の持つ内部浸透力が強いことから、本反応ではヘスペリジンから直接ヘスペレチンを生成する反応は起きる可能性が高いことが分かった。次に、反応で生成された物質の濃度を用いてヘスペリジン、ヘスペリジン-β-グルコサイド、ヘスペレチ

#### 反応分離実験の反応残渣の糖分析

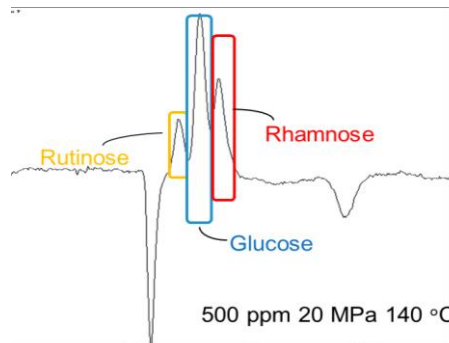


Fig. 4. HPLC analyses of the sugars showing the presence of rutinose in the products (residues)

ンの反応速度解析を行った。今回用いた反応速度式が回分式の実験で得られたものであった点や抽出物のヘスペレチンの濃度を反応速度式に加味することができなかったことから正しい反応速度定数を得ることができなかった。最後に、反応器内の残渣に含まれる糖の分析も行った。回分式と半回分式のどちらでもルチノースのピークを得ることができたため、本反応ではヘスペリジンから

#### 本反応で予測される反応メカニズム

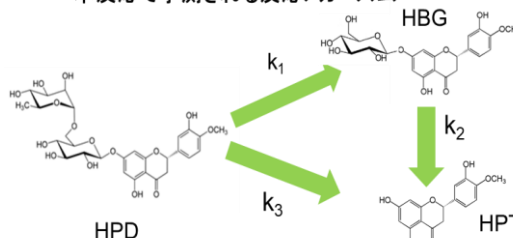


Fig. 5. Speculated reaction mechanism for the reaction of HPD under the proposed system

直接ヘスペレチンが生成されていることが確認された (Fig. 5)。

(4) バイオマス有効利用への応用の検討

本手法により、様々なバイオマス資源の有効利用の応用について確認できた。本手法のは酸や有機溶媒を必要としないため、環境に優しいプロセスであり、バイオマス有効利用にポジティブな効果も確認された (Fig. 6)。

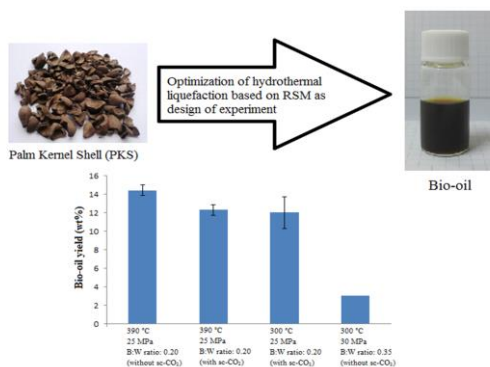


Fig. 6. Hydrothermal conversion of palm kernel shell to bio-oil showing positive effect of using supercritical CO<sub>2</sub>

本研究を通して、超臨界二酸化炭素及び亜臨界水を用いた反応分離システムのエビデンスが示された。本手法は酸や有機溶媒を必要としないため、医薬品や健康食品に使用される柑橘系フラボノイドの反応分離システムとして非常に有望であると考えられる。今後は、反応分離条件を確立させた後にスケールアップを行い、実用化されることが期待される。また、量子計算技術と分子動力学シミュレーションを用いて提案されたシステムで起こる反応メカニズムを解明していくと考えている。今後とも、バリアドリッド大学にあるラマン分光法 (Fig. 7) の使用によって、反応メカニズムの解明も行いたいと

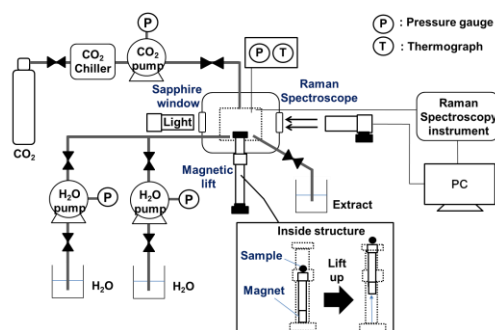


Fig. 7. Schematic diagram of the Raman spectroscopy apparatus at Valladolid University

<引き用文献>

① K. Grohmann, J. A. Manthey, R. G. Cameron, “Acid-catalyzed hydrolysis

of hesperidin at elevated temperatures”, *Carbohydrate Research*, 328 (2), 141-146 (2000).

② Shin. K. -U, Nam. H. -K, Oh. D. -K, “Hydrolysis of Flavanone Glycosides by  $\beta$ -Glucosidase from *Pyrococcus furiosus* and Its Application to the Production of Flavanone Aglycones from Citrus Extract”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (47), 11532-11540 (2013).

③ D. Ruen-ngam, A. T. Quitain, M. Sasaki, M. Goto, “Hydrothermal hydrolysis of hesperidin into more valuable compounds under supercritical carbon dioxide condition”, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51 (42), 13545-13551

④ D. Ruen-ngam, A. T. Quitain, M. Tanaka, M. Sasaki, M. Goto, “Reaction kinetics of hydrothermal hydrolysis of hesperidin into more valuable compounds under supercritical carbon dioxide conditions”, *Journal of Supercritical Fluids*, 66, 215-220 (2012).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件) (全部査読有)

① Armando T. Quitain, “Development of Reactive Separation Technologies Utilizing the Synergy of Supercritical Carbon Dioxide and Subcritical Water,” *Chemical Engineering*, 62, 2017, 494~499

② Chan Yi Herng, Quitain Armando T, Yusup Suzan, Uemura, Yoshimitsu, Sasaki Mitsuru, Kida Tetsuya, “Optimization of hydrothermal liquefaction of palm kernel shell and consideration of supercritical carbon dioxide mediation effect,” *The Journal of Supercritical Fluids*, 133, 2018, 640~646  
DOI: 10.1016/j.supflu.2017.06.007

③ Quitain Armando T., Mission Elaine G., Sumigawa Yoshifumi, Sasaki Mitsuru, “Supercritical carbon dioxide-mediated esterification in a microfluidic reactor,” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 123, 2018, 168-173  
DOI:10.1016/j.cep.2017.11.002

④ Chan Yi Herng, Yusup Suzana, Quitain Armando T., Uemura Yoshimitsu, Loh Soh Kheang, “Fractionation of pyrolysis oil via supercritical carbon dioxide extraction: Optimization study using response surface methodology (RSM),”



*Biomass and Bioenergy* 107, 2017, 155  
~163

DOI: 10.1016/j.biombioe.2017.10.005

- ⑤ Kimthet Chhouk, Armando T Quitain, Gaspillo Pag-asa, Julius B Maridable, Mitsuru Sasaki, Yusuke Shimoyama, Motonobu Goto, " Supercritical carbon dioxide-mediated hydrothermal extraction of bioactive compounds from *Garcinia Mangostana* pericarp," *The Journal of Supercritical Fluids* 110, 2016, 167-175  
DOI: 10.1016/j.supflu.2015.11.016

[学会発表] (計 5 件)

- ① Armando T Quitain, "Bioreactive Separation with H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub> Hybrid Synergy," 9th Asian Federation of Biotechnology Regional Symposium 2017 (招待講演), February 9-11, 2017, Manila, Philippines
- ② Akito Hashimoto, Armando T. Quitain, Saya Yamafuku, Angel D. Martin, Maria Jose Cocero, Mitsuru Sasaki, Tetsuya Kida, Elucidating Reaction Mechanism and Kinetics of Hydrolysis of Hesperidin Under the Combined Supercritical Carbon Dioxide Subcritical Water Conditions, World Congress on Chemical Engineering, October 1-5, 2017, Barcelona, Spain.
- ③ Armando T. Quitain, Akito Hashimoto, Saya Yamafuku, Mitsuru Sasaki, Tetsuya Kida, " Intensified Hydrolysis by Employing the Synergy of Mixed Subcritical H<sub>2</sub>O and Supercritical CO<sub>2</sub>," AIChE Annual Meeting, November 13-18, 2016, San Francisco CA
- ④ Armando T. Quitain, Akito Hashimoto, Saya Yamafuku, Mitsuru Sasaki, Tetsuya Kida, " Reactive Separation for Conversion of Citrus Bioflavonoids by Synergistic Effect of Subcritical H<sub>2</sub>O and Supercritical CO<sub>2</sub>," 1<sup>st</sup> International Conference on Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts and Environmental Sustainability, October 23-26, 2016, Sitges, Spain
- ⑤ Armando T. Quitain, Akito Hashimoto, Saya Yamafuku, Mitsuru Sasaki, Tetsuya Kida, " Reactive Separation Approaches Based on the Synergy of Sub/Supercritical H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>," 48<sup>th</sup> SCEJ Autumn Meeting, September 6 -8, 2016 Tokushima University, Tokushima Japan

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

キタイン アルマンド (QUITAIN, Armando)  
熊本大学・グローバル教育カレッジ・教授  
研究者番号: 50504693

### (2) 連携研究者

1. 木田 徹也 (KIDA Tetsuya)  
熊本大学・大学院先端科学研究部・教授  
研究者番号: 70363421

2. 佐々木 満 (SASAKI, Mitsuru)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・准教授  
研究者番号: 40363519

### (3) 研究協力者

1. Maria Jose COCERO  
Valladolid University/Department of Chemical Engineering and Environmental Technology/Professor

2. Suzana YUSUP  
Universiti Teknologi PETRONAS/  
Department of Chemical Engineering/Professor

3. Navadol Laosiripojana  
King Mongkut's University of Technology Thonburi/ The Joint Graduate School of Energy and Environment (JGSEE)/Professor

4. Joseph Auresenia/Nathaniel Dugos  
De La Salle University/Department of Chemical Engineering/Professor