

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870296

研究課題名(和文) 亜臨界含水アルコール中における糖の異性化機構の解明

研究課題名(英文) Kinetic analysis for the isomerization of saccharides in subcritical aqueous alcohols

研究代表者

小林 敬 (KOBAYASHI, Takashi)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：70416311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖類をモデル物質として亜臨界含水アルコール中での反応挙動を測定した。含水エタノールを用いてグルコースを亜臨界処理するとフルクトースの収率が改善し、ごく少量のマンノースも生成した。その理由は明らかではないため、エタノール添加の影響を速度論的に検証した。含水エタノール濃度が上がるほど速度定数は増大した。特に、マンノースからフルクトースへの変換は顕著に加速した。一方、糖の分解の速度定数も増大したが、異性化のそれに比較して顕著ではなかった。ガラクトースなどの他の単糖にも亜臨界処理の適用を試みた。その結果、対応する希少糖が生成し、特にケト形の希少糖が顕著に生成した。

研究成果の概要(英文)：Reaction behavior of monosaccharides was evaluated in subcritical aqueous alcohols. Yield of fructose from glucose was higher in subcritical aqueous ethanol than in subcritical water, and a small amount of mannose was also formed. Because its reasons were not clear, effects of the ethanol addition were kinetically analyzed. Rate constants for the isomerization between the monosaccharides increased with increasing ethanol concentration. Rate constants for the decomposition of saccharides also increased; however, they were not more remarkable than those for the isomerization. Subcritical treatment in aqueous alcohols, including methanol, 1-propanol, and 2-propanol, also increased the yield of fructose. The subcritical treatment was applied to other saccharides. As a result, corresponding rare saccharides, especially for keto-type ones, such as D-tagatose, were formed. This treatment was also applicable to produce rare keto-disaccharides, such as maltulose.

研究分野：食品工学

キーワード：亜臨界流体処理 異性化 希少糖 動力学

1. 研究開始当初の背景

常圧での沸点以上の温度で、加圧することにより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、常温の水と比較して、イオン積が大きい、比誘電率が低い、などの特徴を有する。そのため、種々の反応の触媒や抽出溶媒としての利用が広く検討されている。水は最も安全な溶媒であるため、農産加工残渣などのバイオマスを亜臨界水処理することで抽出物を得て、それを食品原料として利用する検討が広くなされている。また、近年、食品加工にも利用可能なエタノールを水と混合した後、亜臨界状態でバイオマスを処理する研究(亜臨界含水エタノール処理)もなされるようになってきた。

臨界水や亜臨界含水エタノールによる処理の際には、抽出と同時に触媒作用に起因する反応も起こる。しかし、従来の検討では、「温度が上がれば抽出効率が上がる」や「高温では抽出物が分解してしまう」など、結果の現象論的解釈のみに終始していた。そして、「なぜ、抽出効率が上昇するのか」についてや「詳細な反応機構」については、ほとんど解明されていない。これは、バイオマスが多成分系であり、解析が困難であることに起因している。

2. 研究の目的

バイオマスの主成分をモデルとした亜臨界水処理が実施されてきたが、その速度解析は不十分である。そこで、我々は対象物質を1つに絞り、その物質がどのように変化するのかを検証することとした。本研究では、3大栄養素の1つである糖を対象とした。一般に、亜臨界水中では糖類の異性化や分解が起こる。そして、これらの反応はいくつかの反応ステップから構成されている。そして、この反応ステップには分解や異性化が含まれている。

我々は、亜臨界含水エタノール中でグルコースなどを処理すると、異性化は加速するが、過分解は大幅に抑制され、最大で80%程度がフルクトースに変換されることを独自に見いだした。しかし、その速度解析や応用的知見は得られていなかった。そこで、本研究では、各反応ステップの詳細な速度解析を実施するとともに、異性化を利用した希少糖の製造に関する検討も併せて実施した。

3. 研究の方法

(1) 亜臨界含水エタノール中でのグルコース、フルクトースおよびマンノースの異性化動力学解析

各々の単糖を蒸留水中に溶解した。そして、エタノールを所定量添加し、糖の終濃度が0.5% (w/v) となるように糖の含水エタノール溶液を調製した。この溶液を亜臨界処理する前に減圧下で超音波により脱気した。さらに、空気中の酸素の再溶解による反応への関与を避けるために、原料溶液タンクにヘリウ

ムガスバッグを接続した。オイルバスに浸したステンレス製チューブ(0.8 mm I.D. × 1.0 m)で構成された流通式亜臨界反応装置に原料溶液をHPLCポンプで送液し、チューブの温度および溶液の流速を調整することで、反応条件を変化させた。HPLCポンプには島津製作所製 LC-10AD VP を用い、滞留時間が30-500s となるようにした。なお、反応温度は180~200 とした。また、チューブの内圧は、バックプレッシャーバルブ(Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA)を使って、約10 MPaに維持した。そして、反応器より出た反応液をHPLCで分析した。

なお、HPLCの分析条件は以下の通りである。島津製作所製 LC-10ADVP HPLCポンプと RI-101 屈折計(昭和電工)および SUPELCOGEL Ca²⁺カラム(7.8 mm I.D. × 300 mm, Sigma-Aldrich Japan)を接続し、未反応の原料糖と生成した単糖の濃度を測定した。移動相には蒸留水を用い、流速は0.25 mL/min とした。

(2) 亜臨界含水アルコール中での糖類の異性化に及ぼすアルコールの種類の影響

各々の単糖を蒸留水中に溶解した。そして、アルコール(メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールまたはt-ブチルアルコール)を所定量添加し、糖の終濃度が0.5% (v/v) となるように糖の含水アルコール溶液を調製した。この溶液を前節と同様に亜臨界処理した。なお、処理温度は180 とした。

得られた反応液の組成はHPLCで測定した。HPLCの分析条件は以下の通りとした。LC-10ADVP HPLCポンプと RI-101 屈折計および Cosmosil Sugar-D カラム(4.6 mm I.D. × 250 mm, ナカライテスク)を接続した。移動相には80%アセトニトリルを用い、流速は1 mL/min とした。

(3) 亜臨界含水エタノール中での希少単糖の合成

20~80%の含水エタノールに過剰量のガラクトースまたはタガトース、タロースを添加し、懸濁液を調製した。懸濁液を-30~20の範囲の恒温槽中で24時間保温した。その後、上清を回収し、含水エタノールで希釈して、等濃度をHPLCで測定した。測定におけるHPLCの条件は(2)と同様とした。

(4) 含水エタノールへの単糖の溶解度

20~80%の含水エタノールに過剰量のガラクトースまたはタガトース、タロースを添加し、懸濁液を調製した。懸濁液を-30~20の範囲の恒温槽中で24時間保温した。その後、上清を回収し、含水エタノールで希釈して、等濃度をHPLCで測定した。測定におけるHPLCの条件は(2)と同様とした。

(5) 亜臨界含水アルコール中での希少二

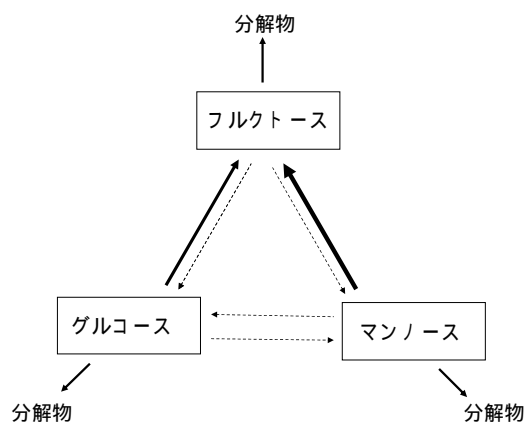


図1. 各糖の異性化および分解のモデル

糖の合成

二糖として、マルトース、メリビオース、ラクトース、スクロース、セロビオース、パラチノース、イソマルトースおよびトレハロースを用いた。各二糖を蒸留水に溶解した。そして、エタノールを所定量添加し、糖の終濃度が0.5~5%(v/v)となるように糖の含水エタノール溶液を調製した。この溶液を流通式処理装置で亜臨界処理した。なお、処理温度は180~220とした。

得られた反応液の組成はHPLCで測定した。HPLCの分析条件は以下の通りとした。LC-10ADVP HPLCポンプとRI-101屈折計からなるシステムに、Cosmosil Sugar-Dカラム(4.6 mm I.D. × 250 mm)またはAsahipak NH2P-50 4Eカラム(4.6 mm I.D. × 250 mm)を接続した。移動相には80% acetonitrileを用い、流速は1 mL/minとした。

4. 研究成果

亜臨界含水エタノールおよびその他の亜臨界流体を用いることで、亜臨界水中と比べて、アルドースからケトースへの異性化が促進されることが判明した。この事実は、グルコースやマンノースからフルクトースが生成するという事実にとどまらず、広く一般的に起こることが判明した。そして、ガラクトースやマルトースを用いることにより対応する希少糖を得ることができた。これは、本研究で得られた手法が、希少糖生産の実用化に結びつく可能性を示唆している。さらに、エタノールにとどまらず、他のアルコールや有機溶媒を用いた場合にも、一部の例を除いて異性化が促進された。

一方、ガラクトースの含水エタノールへの溶解度が10%以下にとどまったことから、高濃度の希少糖を効率よく製造するための手段の開発が課題として残された。

以下に成果の詳細を示す。

(1) 亜臨界含水エタノール中でのグルコース、フルクトースおよびマンノースの異性化動力学解析

グルコース、フルクトースおよびマンノースを亜臨界水または亜臨界含水エタノールで処理したところ、アルドースであるグルコースおよびマンノースはフルクトースへ異性化しやすかった。その中でも、マンノースはよりフルクトースへの異性化は顕著であり、最大で60%程度のフルクトースが生成した。一方、ケトースであるフルクトースからグルコースまたはマンノースへの異性化は起こりにくく、2種類のアルドースの生成率は10%以下であった。また、アルドース同士(グルコースとマンノース相互間)のエピメリ化も起こりにくく、10%以下の収率でしか生成しなかった。このことから、図1に示すように、亜臨界水または亜臨界含水エタノール中ではアルドースからケトースへの異性化が優位に起こると考えられる。

次いで、エタノール添加率の影響を検討した。その結果、エタノールの添加率が高くなるにつれて、フルクトースの生成率が高くなった。この影響を検証するために、図1のモデルに基づき、亜臨界含水エタノール中でのグルコース、フルクトース、マンノースの異性化および分解を速度解析した。その結果、エタノール濃度が高くなると、アルドースからケトースへの転換の速度定数は大幅に増大した。一方、ケトースからアルドースへの転換および各糖の分解の速度定数もエタノール濃度の上昇に伴い増大したが、増大の程度はアルドースケトースへの変換のそれよりも小さかった。このことから、エタノールの添加により、糖の分解が抑制される結果、異性化が促進されることが推察された。算出した速度定数から図1における各反応ステップの活性化エネルギーを算出したところ、90~130 kJ/molであり、糖の分解と同等の値であった。このことから、アルドースの異性化も糖の分解と同等のエネルギー障壁を有していると考えられる。

(2) 亜臨界含水アルコール中での糖類の異性化に及ぼすアルコールの種類の影響

亜臨界含水アルコール中でのグルコース、フルクトースおよびマンノースの異性化または分解に及ぼすアルコールの影響を検討した。メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールまたはt-ブチルアルコールを用い、アルコールの濃度を0~80%に設定して亜臨界処理を実施し、速度解析を行った。いずれのアルコールを用いた場合にも、フルクトースは異性化されず、ほとんど分解される傾向が観測された。各アルコール中での反応について速度解析を実施し、異性化と分解の速度定数を算出し、t-ブチルアルコール以外のアルコールを添加した場合には、速度定数は大きくなり、異性化の速度定数が特に大きくなった。一方、t-ブチルアルコールを添加した場合には反応速度の低下が観測され、異なる反応機構で糖の異性化または分解が進む可能性が示唆された。得

られた速度定数と溶媒の物理化学的パラメータの関連づけを測ったところ、異性化の速度定数は溶媒の比誘電率と相関があることが判明した。そして、比誘電率が小さいほど、速度定数は増大した。

(3) 亜臨界含水エタノール中での希少単糖の合成

エタノール濃度が増大すると、いずれの糖の溶解度も減少した。また、温度を添加させても溶解度は低下した。しかし、タロースとタガトースの溶解度はいずれの条件においてもガラクトースの溶解度よりも高かった。また、溶解度の温度依存性を van 't Hoff プロットすることで、糖の溶解エンタルピーを算出した。タロースの溶解エンタルピーは、ガラクトースおよびタガトースのそれよりも大きく、タロースの溶解度の温度依存性が大きいことが示唆された。

これらの結果より、ガラクトースの亜臨界含水エタノール処理液を冷却することで、未反応のガラクトースを回収でき、再度亜臨界処理に利用することができることが判明した。これは、本プロセスの実用化の可能性を示唆している。

(4) 含水エタノールへの単糖の溶解度

エタノール濃度が増大すると、いずれの糖の溶解度も減少した。また、温度を添加させても溶解度は低下した。しかし、タロースとタガトースの溶解度はいずれの条件においてもガラクトースの溶解度よりも高かった。また、溶解度の温度依存性を van't Hoff プロットすることで、糖の溶解エンタルピーを算出した。タロースの溶解エンタルピーは、ガラクトースおよびタガトースのそれよりも大きく、タロースの溶解度の温度依存性が大きいことが示唆された。

これらの結果より、ガラクトースの亜臨界含水エタノール処理液を冷却することで、未反応のガラクトースを回収でき、再度亜臨界処理に利用することができることが判明した。これは、本プロセスの実用化の可能性を示唆している。

(5) 亜臨界含水アルコール中での希少二糖の合成

マルトースおよびメリピオース、ラクトース、セロピオース、パラチノースおよびイソマルトースを亜臨界処理したところ、対応するケト二糖が生成した。一方、スクロースおよびトレハロースは異性化せず、分解のみが観測された。特に、トレハロースは分解しがたく、500s の処理においても、10%以下の分解率であった。

得られた生成物をカラムクロマトグラフィーにより分取し、NMR で分析したところ、市販の標品と同様のピークが認められ、亜臨界処理により、ケト二糖が生成することが判明した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計8件)

- 1) D.-M. Gao, T. Kobayashi, S. Adachi, Promoted isomerization of aldoses to ketoses in subcritical aqueous acetonitrile, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **95**, 359-363 (2017).
- 2) N. Soisangwan, D.-M. Gao, T. Kobayashi, P. Khuwijitjaru, S. Adachi, Kinetic analysis for the isomerization of cellobiose to cellobiulose in subcritical aqueous ethanol. *Carbohydrate Research*, **433**, 67-72 (2016).
- 3) D.-M. Gao, T. Kobayashi, S. Adachi, Production of keto-disaccharides from aldo-disaccharides in subcritical aqueous ethanol, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **80**(5), 998-1005 (2016).
- 4) D.-M. Gao, T. Kobayashi, S. Adachi, Kinetic effect of alcohols on hexose isomerization under subcritical aqueous conditions, *Chemical Engineering Research and Design*, **104**, 723-729 (2015).
- 5) D.-M. Gao, T. Kobayashi, S. Adachi, Solubility of D-galactose, D-talose, and D-tagatose in aqueous ethanol at low temperature, *Food Science and Technology Research*, **21**(6), 801-803 (2015).
- 6) D.-M. Gao, T. Kobayashi, S. Adachi, Production of rare sugars from common sugars in subcritical aqueous ethanol. *Food Chemistry*, **175**, 465-470 (2015).
- 7) D.-M. Gao, T. Kobayashi, S. Adachi, Promotion or suppression of glucose isomerization in subcritical aqueous straight- and branched-chain alcohols, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **79**(3), 470-474 (2015).
- 8) D.-M. Gao, T. Kobayashi, S. Adachi, Kinetic analysis for the isomerization

of glucose, fructose, and mannose in subcritical aqueous ethanol, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(6), 1005-1010 (2015).

〔学会発表〕(計4件)

- 1) Nontanut Soisangwan , Pramote Khuwigitjaru , 小林 敬, 安達 修二、亜臨界含水エタノール中でのラクトースのラクチュロースへの異性化の速度解析、日本農芸化学会平成 28 年度関西支部大会第 496 回講演会)、滋賀県立大学、2016.9.17
- 2) Nontanut Soisangwan, D.-M. Gao, T. Kobayashi, P. Khuwigitjaru, S. Adachi, Production of lactulose from lactose in subcritical aqueous ethanol、東京海洋大学、2016.8.4-5
- 3) 亜臨界含水エタノールを用いた希少糖である単糖の合成、高 大明、小林 敬、安達修 二、2014 年度日本農芸化学会関西支部大会(第 486 回講演会)、奈良先端科学技術大学院大学、2014.9.20
- 4) 亜臨界含水アルコール中での単糖の異性化反応の速度解析、高 大明、小林 敬、安達 修二、化学工学会 第 46 回秋季大会、九州大学糸島キャンパス、2014.9.18

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：タガトースの製造方法
発明者：安達修二、小林敬
権利者：松谷工業株式会社
種類：公開特許公報
番号：2016-020310
出願年月日：2014年7月14日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 敬 (KOBAYASHI, Takashi)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：70416311