

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25420813

研究課題名(和文)水性2相法を利用したバイオ産物の新規な分離

研究課題名(英文) Novel separation of bioproducts with aqueous two-phase system

研究代表者

松本 道明 (Matsumoto, Michiaki)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号：10157381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 溶質を含む均一相に相分離剤を添加して、新たな相を形成させ溶質を分配させる分離技術は、従来の液液抽出に代わるものとして注目されている。本研究では相分離剤としてエタノールなどの水混和性有機溶媒もしくは水溶性イオン液体および塩を用いる。高濃度の塩と水分子の相互作用により水混和性有機溶媒(イオン液体)が相分離する。この現象を用いて、有機酸、ジオール、アミノ酸などバイオ産物の分離を定量的に行うことができた。また相分離剤としての塩に代わり糖を用いた新規の水性2相抽出も行い、糖を用いた新しい水性2相抽出により有機酸の抽出に成功した。抽出にpHが大きく影響していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： The aqueous two phase system (ATPS) has been well known as one extraction technique for biomolecules. In this study, water-miscible alcohol/salt and ionic liquid/salt ATPSs for the extraction of bioproducts such as organic acids amino acids, diols and so on were examined. Succinic acid was quantitatively extracted by ATPS compsed of water-miscible alcohol/salt.

The water-miscible alcohol/sugar and ionic liquid/sugar ATPSs were also examined for the extarction of succinic acid. Succinic acid was successfully extracted with ATPS using sugar to extract using alcohol and ionic liquid. The pH condition of ATPS technique was really important in order to get high extractability.

研究分野：分離工学

キーワード：水性2相抽出 イオン液体 有機酸 アミノ酸 ジオール

1. 研究開始当初の背景

持続可能な発展のために化石燃料ベースの化成品から再生可能資源に基づく化成品製造への転換が求められている。これらの原料となる乳酸、1,3-プロパンジオールなどはバイオマスを原料とする発酵法により生産されている。最近の遺伝子組み換え技術などを利用した発酵技術の進展は著しいが、これらのプロセスの問題点は発酵そのものよりも、希薄で複雑な組成を持つ発酵液からの経済的な分離精製が行われていない点にある。たとえば、発酵生産された乳酸の精製法は古くはカルシウムに塩による沈殿法、現在は電気透析を中心にした方法で行われており、全コストの50%以上を分離精製段階が占めるといわれている。そこで化成品原料の生産を発酵法に切り替えたとすれば、きわめて経済的な分離法の確立が望まれている。本研究ではこれまでにない新しい観点から水溶性有機溶媒もしくはイオン液体を含む新規な水性2相法を利用した分離法を提案する。

研究代表者らはイオン液体を用いて有機酸の抽出(Matsumoto *et al.*, *Separ. Purif. Technol.*, 40, 97(2004))、乳酸菌へのイオン液体の毒性の検討(Matsumoto *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 98, 344(2004))、イオン液体含浸膜を利用した炭化水素の分離(Matsumoto *et al.*, *J. Membr. Sci.*, 246, 77(2005)) およびペニシリンGの分離(Matsumoto *et al.*, *J. Membr. Sci.*, 289, 92(2007))など、先駆的にイオン液体を分離場として用いる研究を行ってきた。最近でもイオン液体含浸膜の応用範囲を広げるために、乳酸、ブタノール、有機窒素化合物、糖などの透過に関する研究、また従来用いられてきた支持高分子はP V D Fなどの合成高分子であったが、著者らはナタデココを構成するバクテリアセルロースが良い支持担体となることを見出している。さらに研究代表者は従来から糖や有機酸などの生体関連物質の溶媒抽出に関する研究を行い、その抽出機構の解明等を行ってきた。以上まとめると研究代表者らはイオン液体は高価であるために、溶媒抽出法に比べその使用量を飛躍的に削減できるイオン液体含浸液膜法に着目して研究を行ってきた。さらに最近ではバイオ産物の抽出にイオン液体を用いた水性2相抽出系が多く研究されるようになってきた。しかしイオン液体は依然高価で、溶媒として用いるには経済的ではない。またイオン液体相に抽出されたバイオ産物の回収法にも問題がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は水性2相を利用したイオン液体含浸法ならびに水溶性有機溶媒を利用した次のような新しい水性2相抽出分離法(以下ATPS)を開発することである。

(1) 水溶性有機溶媒/無機塩系の水性2相抽出: 親水性物質の分離に効果的で、有機溶媒を蒸発除去することで溶媒相から簡単に基

質を回収できる。

(2) イオン液体/無機塩系の水性2相を利用した新しい液膜含浸法: 従来含浸が困難であった水溶性イオン液体をイオン液体/無機塩を用いて膜上に水性2相を形成させてイオン液体を含浸させる。

3. 研究の方法

本研究では発酵液からバイオベース化成品原料、すなわち乳酸、ジオールなどの選択的な分離可能な新しい水性2相系および水相2相を利用した新たなイオン液体含浸法を開発する。これら対象物質が1) 水溶性有機溶媒/無機塩系の水性2相抽出で効率的に抽出される条件(親水性有機溶媒の種類、塩の種類)を検討した。水相2相形成や抽出と溶媒、塩の物性との関係を明らかにする。またイオン液体/無機塩系の水性2相を利用した新しい液膜含浸法については、従来報告されているイオン液体を含む水性2相を用い、種々の支持高分子担体(親水性および疎水性P V D F, テフロン, バクテリアセルロース膜など)への含浸の程度を検討し、支持担体とイオン液体の適合性を明らかにしていく。

4. 研究成果

(1) 塩析を利用したATPSによる2,3-ブタンジオールの抽出分離

2,3-ブタンジオール(2,3-BD)は合成ゴムの中間体として利用されるほか、航空燃料や医薬品への利用も期待されている。2,3-BDの高い親水性のために、発酵法による2,3-BDの生産プロセスでは、生産コストの半分以上が分離プロセスにかかるコストであると考えられており、発酵液からの効率的かつ経済的な分離、回収法の開発が望まれている。そこで本研究では2,3-BDの抽出相からの分離が容易な塩/アルコールからなるATPSを用いた2,3-BDの抽出分離を検討した。

溶解度曲線

25 において白濁法により溶解度曲線を作成し、任意の組成で混合した K_2HPO_4 -親水性有機溶媒(*t*-BuOH, THF, 1-ProOH, 2-ProOH, EtOH, MeOH)-水の混合物の平衡後の上層、下層の各組成をHPLCおよびカールフィッシャー法を用いて測定し、タイラインを作成した。

Figure 1 に各親水性有機溶媒の溶解度曲線を示した。メタノールおよびエタノールを用いた場合では2相を形成する領域がせまく、2相を形成させるためにより多くの塩が必要であるため抽出溶媒として適さないと考えられる。1-プロパノールと2-プロパノールを比較した場合、2相を形成する領域は1-プロパノールの方がわずかに広がったが1-プロパノールは沸点が97.12 であるのに対し2-プロパノール、*t*-ブタノールおよびTHFは沸点がそれぞれ82.4, 82.4 および65.4 であり、2,3-BDの抽出相からの分離を考え、以後の抽

出溶媒には 2-プロパノール, *t*-ブタノールおよび THF を検討した。

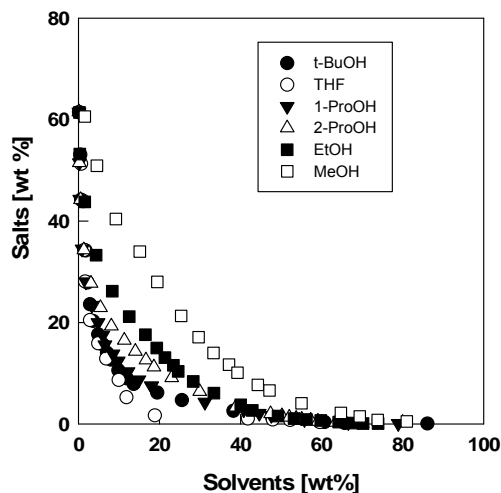


Figure 1 Effect of solvents on the binodal curves at 298 K

2,3-BD の塩析

50 g/L の 2,3-BD 水溶液 18 mL に塩(K_2HPO_4 , K_3PO_4 , K_2CO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, $K_3C_6H_5O_7$, KF) を 50.0, 100.0 g/100g-water になるように添加し, 目盛り付き試験管中で混合した。平衡後, 上層および下層の 2,3-BD 濃度を HPLC, 含水率をカールフィッシャー法により測定した。

2,3-BD の塩析に及ぼす塩の影響を示した。 K_2HPO_4 , K_2CO_3 , KF を 100.0 g/100g-water 加えた場合のみ, 2,3-BD の塩析が生じ, その他の塩では塩析は生じなかった。塩析が生じた場合でも, 2,3-BD の回収率は高くなかった。

ATPS による 2,3-BD の抽出

50 g/L の 2,3-BD 水溶液 4 mL に塩(K_2HPO_4 , K_3PO_4 , K_2CO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, KF, $K_3C_6H_5O_7$) を 50.0, 100.0 g/100g-water になるように添加し, 2-プロパノール 4 mL と目盛り付き試験管中で混合した。1 分間激しく混合した後, 25, 100 rpm で 6 時間撹拌した。平衡後, 上層および下層の 2,3-BD 濃度を HPLC, 含水率をカールフィッシャー法により測定した。

2,3-BD の ATPS に及ぼす塩の影響を 2-プロパノールの場合について検討した。いずれの塩を用いた場合においても塩濃度の増加に伴い 2,3-BD の回収率が増加し, 上層に含まれる水分量は減少した。抽出実験において $(NH_4)_2SO_4$ 及び $K_3C_6H_5O_7$ を用いた場合では他の塩と比較して回収率が低く, 上層の含水量が高いことから, これらの塩は水分子との相互作用が弱いと考えられる。 KF , K_2HPO_4 , K_3PO_4 , K_2CO_3 を用いた場合ではいずれの塩を用いた場合においても, ほぼ同程度の高い回収率が得られたが, 上層の 2,3-BD 濃度には

違いが見られた。抽出相の含水率が低い塩ほど高い 2,3-BD 濃度が得られたことから, K_2CO_3 , KF などの塩は水分子と強く相互作用しているため, 抽出相側への水の分配が起こりにくかったと考えられる。そのためこれらの塩が 2,3-BD の水性 2 相抽出に適していると考えられる。

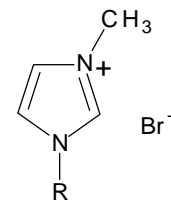
以上, 親水有機溶媒 / 塩系 ATPS を用いることにより, 溶媒抽出や塩析では困難であった定量的な 2,3-BD の回収が可能となった。

(2) 水溶性有機溶媒およびイオン液体を利用した ATPS によるコハク酸の抽出分離

コハク酸はバイオポリマーの原料として近年注目されている。石油資源の枯渇に伴い, コハク酸の発酵生産が注目され, 最近工業的な規模で行われるようになってきた。しかし, 2,3-BD 同様コハク酸も親水性が極めて高いことから, これらのプロセスにおいて, 発酵液からのコハク酸の効率的な分離精製が望まれている。そこで本研究では, イオン液体および水溶性有機溶媒を用いた水性二相法によるコハク酸の抽出について検討した。

塩析を用いた ATPS

イオン液体として 1-butyl, 1-hexyl, 1-octyl-3-methylimidazolium bromide, 可溶性の親水性有機溶媒と



してエタノール, 1-プロパノール, 2-プロパノールおよび *t*-ブタノールを用い, 溶解度曲線を前節と同様に得た。また塩として K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, K_3PO_4 , K_2CO_3 , KF, NH_4NO_3 , NaCl, $C_6H_5Na_3O_7$, Na_2CO_3 を用いた。イオン液体もしくは水溶性有機溶媒 5 mL および塩を含む水相 5 mL を目盛り付き試験管にとり 12 時間浸漬し, 平衡に至らしめた後, 両相の体積を測定した。その後両相を取り出し, それぞれのコハク酸濃度を HPLC によりまた有機相の水相含量をカールフィッシャー法により測定した。

Figure 2 に用いた有機溶媒およびイオン液体 K_2HPO_4 系の溶解度曲線を示した。イオン液体 HmimBr, OmimBr は 2-プロパノールと同等の優れた相分離剤であることがわかった。

Figures 3 および 4 に 1-プロパノールおよびイオン液体から形成される ATPS によるコハク酸の抽出の結果を示した。両図とも横軸は塩水溶液の平衡時 pH を示している。イオン液体 / $(NH_4)_2SO_4$ 系 ATPS を用いることで高い抽出率を達成できた。Figure 3 からわかるように水溶性有機溶媒を用いた ATPS では抽出率は, 用いる塩ではなくその pH に依存している。コハク酸の pKa 値は 4.17 および 5.64 であることから, コハク酸の未解離種が抽出されていることがわかった。一方イオン液体を用いた Fig. 4 では, 抽出率は pH に依

存せず，用いる塩に依存すると推察される．Table 3 に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用いた場合の親水性有機溶媒およびイオン液体中の平衡含水量を示している．表からイオン液体中の含水量は水溶性有機溶媒に比べ高い．以上の点から水溶性有機溶媒からなる ATPS ではコハク酸はアルコール相中のアルコールクラスター内に分配され，一方イオン液体からなる ATPS では，イオン液体相中の水クラスター内に分配されているのではないかと推察される．

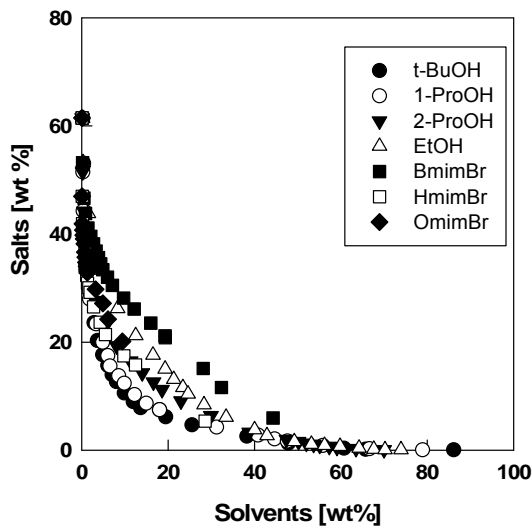


Figure 2 Binodal curves of solvent (alcohol and ionic liquid) + K_2HPO_4 aqueous two phase system

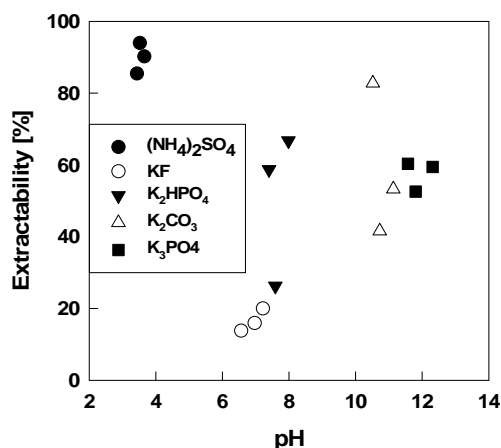
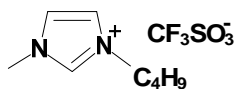


Figure 3 Extraction of succinic acid with ATPS formed by salts (20 g/100mL-water) and 1-propanol

糖析を用いた ATPS

イオン液体として $\text{C}_4\text{mimCF}_3\text{SO}_3$ ，可溶性の親水性有機溶媒として 1-プロパノールを用いた．また糖としてスクロースとマルトースを用いた．イオン液体 4 g もしくは水



溶性有機溶媒 5 mL および糖を含む水相 5 mL を目盛付き試験管にとり 12 時間浸漬し，平衡に至らしめた後，両相の体積を測定した．その後両相を取り出し，それぞれのコハク酸濃度を HPLC によりまた有機相の水相含量をカールフィッシャー法により測定した．

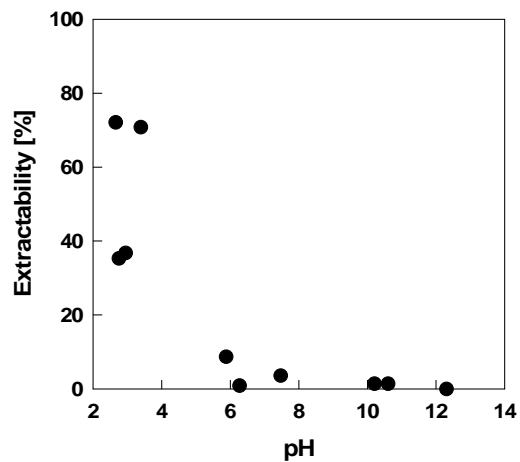


Figure 4 Extraction of succinic acid with ATPS formed by salts and ionic liquids

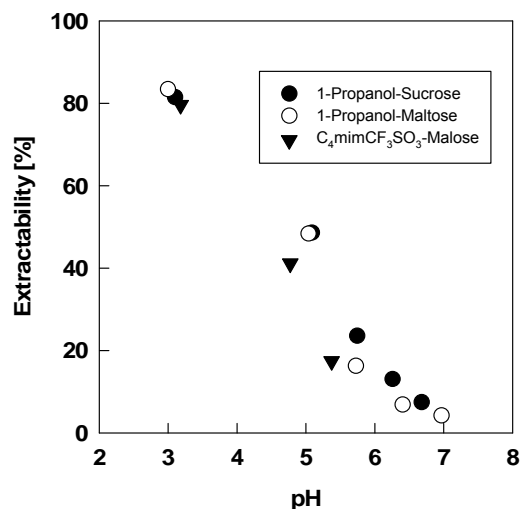


Figure 5 Extraction of succinic acid with ATPS formed by sugar (60 g/100 mL-water) and 1-propanol or $\text{C}_4\text{mimCF}_3\text{SO}_3$

Figure 5 に 1-プロパノールおよびイオン液体から形成される ATPS によるコハク酸の抽出に及ぼす平衡 pH の結果を示した．図からわかるように水溶性有機溶媒 / 糖およびイオン液体 / 糖を用いた ATPS では抽出率は，その pH に依存していた．コハク酸の pKa 値はそれぞれ 4.17 および 5.64 であることから，コハク酸の未解離種が抽出されていることがわかった．これはイオン液体 / 塩から構成される ATPS とは異なっていた．Table 2 に親水性有機溶媒およびイオン液体中の平衡含水量を示している．表からイオン液体中の含水量は水溶性有機溶媒に比べ高く，また糖濃度の増加に伴って減少していない．塩系の

ATPS においてアルコール系ではコハク酸は水-アルコール水素結合のネットワークに組み入れられており、またイオン液体系では水相ドメインに抽出されているのではないかと推察していたが、塩系では、pH の高い領域でイオン液体とのイオン交換による抽出も生じているのかもしれない。

Table 2 Water contents in upper phase

Solvent	Sugar(g/100mL-water)	含水量 (wt%)
1-ProOH	Sucrose (60)	31.3
1-ProOH	Sucrose (80)	24.8
1-ProOH	Sucrose (100)	21.6
C ₄ mimCF ₃ SO ₃	Maltose (80)	45.9
C ₄ mimCF ₃ SO ₃	Maltose (100)	48.6

(3) まとめ

本報告では塩析、糖析を用いる ATPS とし、2,3-ブタンジオールおよびコハク酸をとりあげたが、そのほか抗生物質やアミノ酸の ATPS にも取り組んでいる。ここで示した方法は基本的には親水性の高い有機物の抽出には極めて有効であることがわかった。しかしまた体系的な研究は十分ではなく、その抽出機構も、まだ不明な点が多く今後の課題となっている。さらにこの方法を、実際の発酵液からの目的物の抽出に応用するには、選択性など克服しなければならない課題もある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 20 件)

M. Matsumoto, T. Nakagawa, Y. Uchida, K. Seki, M. Ohba, K. Kondo, Effect of modification of citraconic anhydrides on catalytic activity and thermostability of enzymes Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 91, 59-64 (2016) 査読有, DOI: 10.1002/jctb.4556

M. Matsumoto, K. Nagai, K. Kondo, Reactive extraction of 1,3-propanediol with aldehydes in the presence of a hydrophobic acidic ionic liquid as a catalyst, Solvent Extraction Research and Development, Japan, 22, 209-213 (2015) 査読有 DOI: 10.15261/serdj.22.209

A. I. Pratiwi, T. Yokouchi, M. Matsumoto, K. Kondo, Extraction of succinic acid by aqueous two-phase system using alcohols/salts and ionic liquids/salts, Separation and Purification Technology, 155, 127-132 (2015), 査読有 DOI:10.1016/j.seppur.2015.07.039

M. Matsumoto, R. Okuno, K. Kondo, Extraction of 2,3-butanediol with aqueous two-phase systems formed by water-miscible organic solvents and inorganic salts, Solvent Extraction Research and Development, Japan, 21, 181-190(2014) 査読有, DOI: 10.15261/serdj.21.

181

M. Matsumoto, T. Sugimoto, Y. Ishiguro, H. Yamaguchi, K. Kondo, Effect of organic solvents and ionic liquids on resolution of 2-epoxyhexane by whole cells of *Rhodotorula glutinis* in a two-liquid phase system, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 89, 522-527(2014) 査読有, DOI: 10.1002/jctb.4148

A. I. Pratiwi, T. Sato, M. Matsumoto, K. Kondo, Permeation mechanism of succinic acid through polymer inclusion membranes with ionic liquid Aliquat 336, Journal of Chemical Engineering of Japan, 47, 314-318(2014) 査読有 DOI: 10.1252/jcej.13we194

M. Matsumoto, D. Kawabata, T. Takatani, Y. Yoshida, K. Kondo, Selective adsorption of oxometallic and gold ions on filter paper containing cedar bark, Solvent Extraction and Ion Exchange, 32, 111-118(2014) 査読有, DOI: 10.1080/07366299.2013.850005

M. Matsumoto, N. Oku, K. Kondo, Permeation of saccharides through supported ionic liquid membranes containing calixarenes as carriers, Solvent Extraction Research and Development, Japan, 20, 219-224 (2013) 査読有 DOI: 10.15261/serdj.20.219

A. I. Pratiwi, M. Matsumoto, K. Kondo, Permeation of succinic acid through supported ionic liquid membranes, Journal of Chemical Engineering of Japan, 46, 383-388 (2013) 査読有, DOI:10.1252/jcej.13we008

〔学会発表〕(計 39 件)

喜多宏介, 松本道明, 近藤和生, イオン液体含有 PVA ゼラチン膜によるエタノールの分離, 化学工学会第 81 年会 2016 年 3 月 13 日, 関西大学千里山キャンパス(大阪府吹田市)

伊藤可梨, 松本道明, 近藤和生, イオン液体の DPPC ベシクルへの分配特性, 第 18 回化学工学会学生発表会, 2016 年 3 月 5 日, 福岡大学七隈キャンパス(福岡県福岡市)

松本道明, 塩析・糖析を利用した分離技術の新展開, 2015 年度日本海水学会西日本支部秋季講演会, 2015 年 10 月 30 日, (株)トクヤマ徳山製造所本事務所(山口県周南市)

松本道明, 出島侑也, 近藤和生, ボロン酸を用いた多価アルコールの抽出に及ぼす疎水性イオン液体の効果, 化学工学会第 47 回秋季大会, 2015 年 9 月 10 日, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)

松本道明, 佐藤雄大, 近藤和生, 水溶性有機溶媒/塩系水性 2 相を用いたアミノ酸の抽出機構, 日本海水学会第 66 年会, 2015 年 6 月 4 日, 神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県横浜市)

松本道明, 抽出操作の基礎と最新技術, 化学工学会関西支部第 27 回 CES21 講演会 2015 年 1 月 30 日, 大阪市立大学文化交流センター(大阪府大阪市)

A.I. Pratiwi, 松本道明, 近藤和生, 糖析を利用した水性 2 相法によるコハク酸の抽出, 化学工学会新潟大会, 2014 年 11 月 22 日, 新潟大学五十嵐キャンパス (新潟県新潟市)

A.I. Pratiwi, T. Yokouchi, M. Matsumoto, K. Kondo, Sugaring-out of succinic acid through aqueous two-phase system with alcohols and ionic liquids, 6th International Conference of Ion Exchange, 2014 年 11 月 11 日, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

佐藤雄大, 松本道明, 近藤和生, 水溶性有機溶媒 / 塩系水性 2 相を用いたアミノ酸の抽出, 化学工学会第 46 回秋季大会, 2014 年 9 月 18 日, 九州大学伊都キャンパス (福岡県福岡市)

A.I. Pratiwi, M. Matsumoto, K. Kondo, Extraction of succinic acid by aqueous two phase system (ATPS) using ionic liquid and salts, 20th International Solvent Extraction Conference 2014, 2014 年 9 月 10 日, Würzburg (Germany)

A.I. Pratiwi, T. Yokouchi, M. Matsumoto, K. Kondo, Extraction of succinic acid by aqueous two phase system using ionic liquid/salts and alcohol/salts, 2nd International Conference on Ionic Liquids in Separation and Purification Technology, 2014 年 7 月 1 日, Toronto (Canada)

河島大祐, 松本道明, 近藤和生, 菌体から生成したセルロースの液膜支持担体としての利用, 第 32 回溶媒抽出討論会, 2013 年 11 月 22 日, 名古屋大学 ES 総合館 (愛知県名古屋市)

M. Matsumoto, R. Okuno, K. Kondo, Aqueous two phase extraction of 2,3-butanediol using water-miscible organic solvents, Chemeca 2013, 2013 年 9 月 30 日, Brisbane (Australia)

松本道明, 土井貴由, 近藤和生, アルコール - 塩系水性 2 相を利用した乳酸抽出, 2013 年 6 月 6 日, 日本海水学会第 64 年会, 山梨県立図書館 (山梨県甲府市)

松本道明, 奥野良介, 近藤和生, アルコール系水性二相抽出による 2,3-ブタンジオールの分離, 分離技術会年会 2013, 2013 年 5 月 24 日, 日本大学生産工学部 (千葉県習志野市)

〔図書〕(計 1 件)

A. I. Pratiwi, M. Matsumoto, Elsevier, Separation of organic acids through liquid membranes containing ionic liquids in Ionic Liquids in Separation Technology, Chapt. 5, pp. 189- 206 (2014)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 道明 (MATSUMOTO, Michiaki)

同志社大学・理工学部・教授

研究者番号 : 10157381