

超臨界・亜臨界水マイクロリアクションによるアルギン酸の選択的分解反応

松嶋景一郎, 蓑嶋 裕典, 西澤 信*, 川向 敦**, 原 耕三**

Selective Decomposition of Alginic Acid Using Subcritical and Supercritical Water Microreactionsystem

Keiichiro MATSUSHIMA, Hironori MINOSHIMA, Makoto NISHIZAWA*
Atsushi KAWAMUKAI**, Kozo HARA**

抄 録

アルギン酸はD-マンヌロン酸(M)およびL-グルロン酸(G)から構成される直鎖の複合多糖である。従来より食品や医薬品等の分野で幅広く利用されているが、近年ではコレステロール値低下作用等の生理活性作用の研究により、特定保健用食品として健康食品市場においても重要な素材となっている。アルギン酸の物性は分子量およびMとGの比率(M/G)により決定されることから、工業の利用には、それら物性値の制御可能な選択的低分子化が必要とされる。しかしながら、現在に至るまで満足な方法は開発されていない。

本研究では、アルギン酸の新規低分子化方法の開発を目的に、環境に優しいだけでなく、高効率高選択反応システムとして注目されている超臨界・亜臨界水マイクロリアクションシステムを用いて、アルギン酸の低分子化反応を検討した。

その結果、超臨界域において、アルギン酸は単位糖をつなぐグルコシド結合だけでなく、単位糖のヘキソース環まで分解された。しかし、亜臨界域では、250 , 25 MPa, 0.088秒の反応条件において、G - MおよびM - G結合が選択的に分解され、Gを多く含んだ(G-rich)低分子アルギン酸およびMを多く含んだ(M-rich)水溶性低分子アルギン酸を得ることができた。

キーワード：アルギン酸，超臨界水，亜臨界水，マイクロリアクション，選択的低分子化

Abstract

Alginic acid is a liner hetero-polysaccharide consists of D-mannuronic acid(M)and L-guluronic acid(G). The alginate, whose molecular weight and the mannuronic acid / guluronic acid ratio (M/G) are adjusted, are used extensively in food, pharmaceutical industries and so on.

In this study, we developed the rapid decomposition of sodium alginate (Alg-Na) using subcritical and supercritical water (abbreviated as subH₂O and scH₂O, respectively) microreaction system, and investigated controllability of the molecular weight and the ratio of M/G by varying temperature and pressure.

In scH₂O, glucosidic linkages and hexose rings of Alg-Na were completely cleaved by hydrolysis to form unknown complex mixture. Whereas in the subH₂O (250 , 25MPa), G-M and M-G linkages were hydrolyzed selectively. As the result, we successfully obtained the almost pure guluronic acid homopolymer and the mannuronic acid rich water-soluble hetero-polymer selectively.

KEY-WORDS : alginic acid, subcritical water, supercritical water, microreaction system, depolymerization

* 東京農業大学

* Tokyo University of Agriculture

** 共成製薬㈱

** Kyosei Pharmaceutical Co. Ltd.

事業名：一般試験研究

課題名：超臨界流体の利用技術に関する研究

1. はじめに

アルギン酸は昆布・ワカメなど北海道に広く分布する褐藻類の細胞間充填物質として含有されている多糖類の一種である。従来より、増粘剤やゲル化剤、創傷被覆剤や胃壁保護薬など、食品や医薬品等の様々な分野で利用されているが、近年の研究で、有害金属吸収阻害、コレステロール値低下や血圧上昇抑制などの生理活性機能を有することが分かり、現在急速に拡大している健康食品市場においても重要な素材となっている。

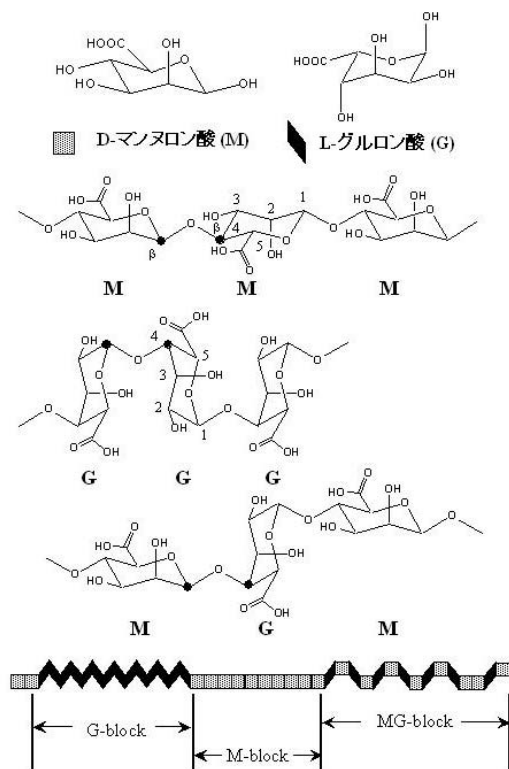


図1 アルギン酸の構造

アルギン酸はL-グルロン酸(G)とD-マンヌロン酸(M)の2種類の単位糖からなる複合多糖で、図1に示すようにGのみの部位(G-block)、Mのみの部位(M-block)およびGとMの比がほぼ1:1の部位(MG-block)がランダムに結合した直鎖構造を持つ。アルギン酸の粘性、溶解性や金属イオンとの相互作用力といった物性は、分子量およびMとGの比率(M/G)により決定される。天然物から抽出されたアルギン酸は、水に対する溶解性が低く、得られる水溶液も高粘性であるため、通常、工業的取り扱いが容易となるように低分子化を行う。このとき、製品の目的に応じた物性を持つ低分子化アルギン酸を調製する必要がある。すなわち、分子量およびM/Gを制御しながら低分子化を行うことが要求されるが、現在のところ工業的に利用できる満足な方法は開発されていない。選択的低分子化方法として酵素分解法が盛んに研究されているが、コストが高く反応に長時間を有するた

め、選択性が高いものの工業化には至っていない。現状では、分子量に関してある程度の制御力を持つオートクレーブ法が工業的に採用されているが、G/M制御能力は低い。

一方、近年グリーンケミストリーの観点から、超臨界水を利用した環境調和型プロセス技術が注目されている。水は超臨界状態において、常温常圧下と比べ誘電率が著しく減少し、極性の低い有機物質を溶解させることができる。また、イオン積は亜臨界域で最大となり、超臨界域では極端に減少する。しかし、水素結合が臨界点を極大として特異的に減少するため、プロトンの活性化が起こる。この特性を利用し、超臨界水を反応場とする無触媒高速有機反応が報告されている。さらに、これらの特異性を生かした環境調和型マイクロリアクションシステムの開発が注目されている。超臨界水マイクロリアクションシステムは連続流通型的高速反応装置で、所定の温度まで急速昇温し、反応後速やかに冷却を行う。このシステムは、超臨界域から亜臨界域まで適用可能であり、精密な反応温度制御により、副反応が抑えられ反応の選択性向上が期待できる。

本研究では、アルギン酸の新規低分子化方法開発を目的に、超臨界水および亜臨界水マイクロリアクションによるアルギン酸ナトリウムの分解を行い、反応生成物の構造について検討した。

2. 実験

2.1 超臨界・亜臨界水マイクロリアクション

2.1.1 アルギン酸ナトリウム水溶液の調製

アルギン酸は難水溶性であるため、市販のナトリウム塩(ソルギン、共成製薬株、以下Alg-Na)を原料基質として使用した。原料水溶液は、基質を室置換により脱気した蒸留水に溶解させ、濃度を2 wt%に調製した。

2.1.2 マイクロリアクションシステム

超臨界・亜臨界水マイクロリアクションシステムを図2に示す。

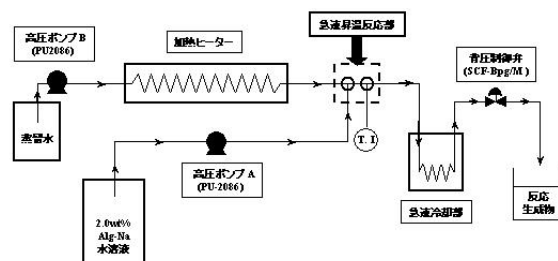


図2 超臨界・亜臨界水マイクロリアクションシステム

所定の操作により調製した原料水溶液を高圧ポンプA(PU-2080、日本分光株)にて連続的に急速昇温反応部(ハステロイ-C製、0.5mm×30mm、5.9mm³)に送液した。同様に、脱気

した蒸留水をヒーターで加熱しながら高圧ポンプB(PU-2086, 日本分光(株))により連続送液し, 急速昇温反応部で Alg-Na水溶液と混合・反応させた。このとき, 反応部の混合液温度を一定にするため, 蒸留水の流量をAlg-Na水溶液の3倍とした。圧力は背圧弁(SCF-Bpg/M, 日本分光(株))により調整した。反応後の水溶液を凍結乾燥し, 固形物として生成物を得た。

2.2 超臨界・亜臨界水マイクロリアクション生成物の構造解析

2.2.1 ¹H NMRによる構造解析

¹H NMR(GX-270, 日本電子(株))により, 反応生成物の構造解析を行った。内部標準液としてアセトニトリルを0.1%添加した重水に, 15~17mgの反応生成物を溶解させ測定サンプルとした。

2.2.2 ゲル濾過クロマトグラフィーによる重量平均分子量測定

反応生成物の重量平均分子量(WAMW)をゲル濾過クロマトグラフィー(GPC)により測定した。0.3Mの硝酸ナトリウム水溶液を溶離液として用い, 60 1.0mL/minの条件で Ashahipak GS-520(6 mm x 250mm, 昭和電工(株))を使用した。アセトンによりキャリブレーションを行い, プランを標準物質としてWAMWを計算した。

3. 結果および考察

3.1 分解反応生成物の重量平均分子量および¹H NMRスペクトル解析

超臨界・亜臨界水マイクロリアクション(以下, scH₂O-MR, subH₂O-MRと略す)の反応条件と, 分解反応生成物のWAMWを表1に示す。超臨界域において, Alg-Naは

表1 超臨界・亜臨界水マイクロリアクションの反応条件および生成物の重量平均分子量

Run no.	反応域	反応時間 (ms)	圧力 (MPa)	温度 (°C)	重量平均分子量
0	原料	—	—	—	57200
1	超臨界	17	25	375	770
2		21	25	375	760
3		24	25	375	760
4		44	25	375	700
5		88	25	375	690
6		88	30	375	680
7		88	35	375	680
8		88	40	375	670
9	亜臨界	88	25	250	11400
10		88	25	275	5800
11		88	25	300	4400
12		88	25	325	3800
13		88	25	350	3600

WAMW 1000以下まで分解され, 反応時間の増加(No.1-5)および反応圧力の上昇(No.5-8)に伴い, WAMWは減少した。一方, 亜臨界域では, 反応温度を上げることにより, 原料 Alg-Naの1/10以下のWAMWまで分解することができた。以上より, 亜臨界水に比べ超臨界水の方がAlg-Naの分解を促進することが分かった。

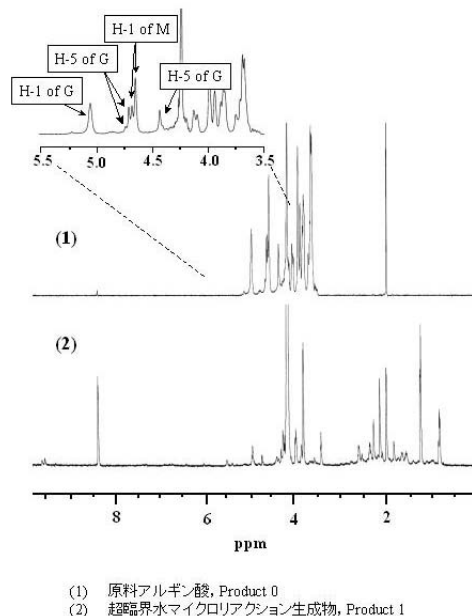


図3 原料アルギン酸および超臨界水マイクロリアクション生成物の¹H NMRスペクトル

原料Alg-Na(Product 0)とscH₂O-MR(17ms, 25MPa, 375)により得られた生成物(Product 1)の¹H NMRスペクトルを図3に示す。図3(2)のProduct 2のスペクトルにおいて, 図3(1)に示したアルギン酸由来のピークが観測されなかった¹⁾。しかし, 8.5ppm付近にアルデヒド由来のピークが明確に観測された。つまり, 超臨界水マイクロリアクションでは, 単糖をつなぐグルコシド結合だけでなく, 単糖のヘキソース環まで分解されると考えられた。

しかしながら, subH₂O-MR(88ms, 25MPa, 250)より得られた生成物(Product 2)の¹H NMRスペクトルからは, アルギン酸に帰属されるピークを確認することができた(図4)。

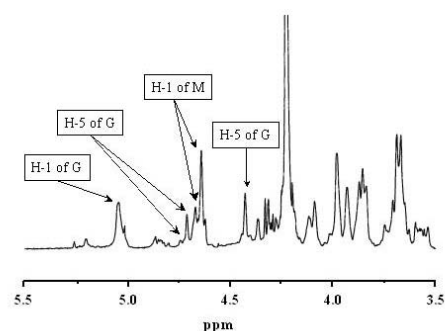


図4 亜臨界水マイクロリアクション生成物の¹H NMRスペクトル

すなわち、ヘキソース環構造が保たれているため、単位糖間のグルコシド結合が分解される低分子化反応が主反応であることが示された。

3.2 亜臨界水マイクロリアクション生成物の構造解析

亜臨界水マイクロリアクション(subH₂O-MR)反応機構の詳細な解析を行うため、反応生成物(Product 2)の分画・精製を行った(図5)。Product 2を再溶解した水溶液に、1 M

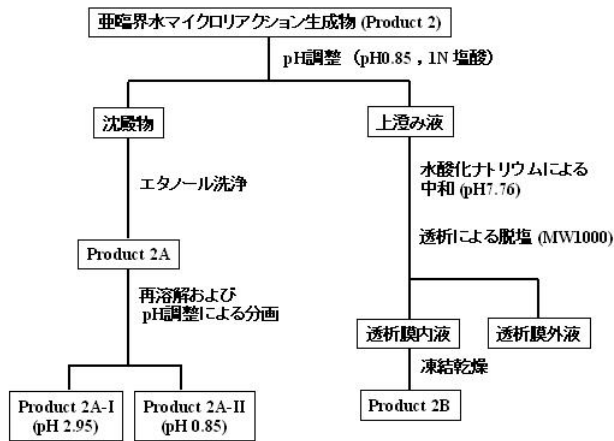
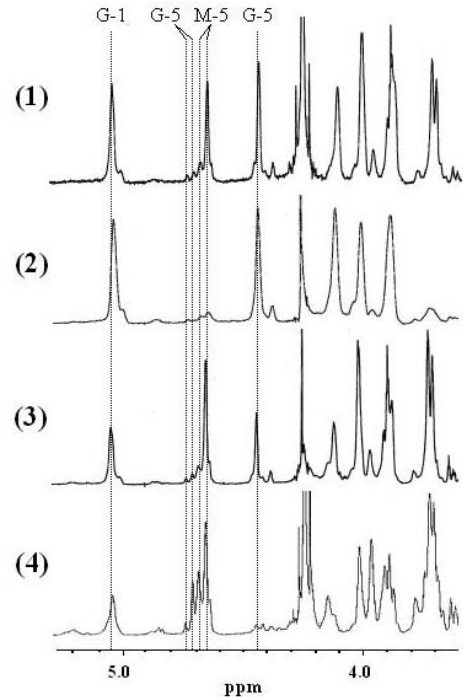


図5 亜臨界水マイクロリアクション生成物の分画・精製フロー

塩酸水溶液を添加しpH 1に調整した。このときAlg-Naは脱塩され、水に難溶性のアルギン酸となり沈殿する。得られた沈殿物をエタノールで洗浄し、精製物Product 2 Aとした。また、アルギン酸は低分子化が進むと水に可溶となることも知られている。そこで、上澄み液を水酸化ナトリウムで中和し、透析(MW1000)により塩化ナトリウムを除いた後、凍結乾燥により固形物を得た(Product 2 B)。一方、Gを多く含んだAlg-NaはpH 3付近で脱塩することが報告されている¹⁾。この知見を基に、Product 2 Aを水に再溶解させ、pH調整により分画を行った。pH 3付近で得られたGを多く含んだアルギン酸(G-rich)をProduct 2 A-₁、pH 1付近で得られたアルギン酸をProduct 2 A-₂とした。

全ての分画精製物(Product 2 A - 2 B)について¹H NMRスペクトル分析を行ったところ、いずれもアルギン酸であることが確認された(図6)。また、¹H NMRスペクトルからは、アルギン酸の詳細な構造情報として、グルロン酸とマンヌロン酸の含有率(G%, M%)およびG-G結合の割合(GG%)を求めることができる²⁾。Gのアノメリックの位置にある1位のプロトン(G-1)とMのアノメリックの位置にある1位のプロトン(M-1)の相対ピーク面積は、それぞれGとMのモル分率に相当する。Gの5位のプロトンの共鳴(G-5)に帰属されるピークの面積から、代数的にG-blockとMG-blockに含まれるグルロン酸の割合を求めることができる。すなわち、G-1とG-5の相対ピーク面積は等しくなる。しか



(1) Product 2A :エタノール洗浄・精製物
(2) Product 2A-I : pH調整分画物 (pH 2.95)
(3) Product 2A-II : pH調整分画物 (pH 0.85)
(4) Product 2B :透析分画物

図6 亜臨界水マイクロリアクション・分画・精製物の¹H NMRスペクトル

し、MG-blockのG-5とM-1のピークが重なるため、G-5とM-1の相対ピーク面積を個々に計算することはできない。以上より、G-1に相当するピーク面積をA(4.95 - 5.17), MG-block中のG-5とM-1に相当するピーク面積をB(4.55 - 4.82), G-block中のG-5に相当するピーク面積をC(4.40 - 4.50)とすると、次に示す(1)式よりG%, (2)式よりGG%をそれぞれ

$$G(\%) = \frac{A}{B+C} \times 100 \quad \dots\dots(1)$$

$$GG(\%) = \frac{B}{B+C} \times 100 \quad \dots\dots(2)$$

表2 超臨界・亜臨界水マイクロリアクション生成物の構造

Product	反応・分画条件	アルギン酸収率 (%)	重量平均分子量	G (%)	M (%)	GG (%)	M/G
0	原料	-	57200	41.6	58.4	16.1	1.40
1	超臨界水マイクロリアクション	0	770	-	-	-	-
2	亜臨界水マイクロリアクション	88.1	11400	40.3	59.6	19.2	1.48
2A-I	-pH調整(2.95)	15.9	14200	98.0	2.0	84.0	0.02
2A-II	-pH調整(0.85)	37.2	14200	42.9	57.1	28.6	1.36
2B	-透析	31.5	9200	28.6	71.4	5.5	2.50

れ求めることができる。それぞれの分画生成物について、計算したG%, M%, GG%とM/Gの結果と測定したWAMWを表2に示す。

subH₂O-MRで、アルギン酸は1/5程度の分子量まで低分子化された。分画により得られた水溶性のアルギン酸であるProduct 2Bは1万以下の分子量であった。

scH₂O-MRでは、低分子アルギン酸を得ることができなかったが、subH₂O-MRにより88.1%の収率で低分子化されたアルギン酸を得ることができた(Product 2)。さらに、Product 2から、Gの含有率が98%のG-richアルギン酸とMの含有率が71.4%の水溶性M-richアルギン酸を得ることができた。

原料アルギン酸(Product 0)のG%, M%とM/Gの値は、Product 2の値はほぼ等しいが、GG%はProduct 2の方が大きい。この結果と上述のsubH₂O-MRにより得られた低分子アルギン酸の構造解析より、subH₂O-MRでは、G-MおよびM-G結合が選択的に分解されると考えられた(図7)。G-MおよびM-G結合は、マンヌロン酸のカルボキシル基とグルロン酸の2位および3位の水酸基とが、エクアトリアル-アキシャルおよびアキシャル-エクアトリアル配位している。それ故、3次元の左巻らせん構造を持つM-M結合および強固な2次元のねじ状直鎖構造を持つG-G結合に比べ結合部位に自由度があるため、subH₂O-MRで、G-MおよびM-G結合が最も分解されやすい部位になると考えられた。

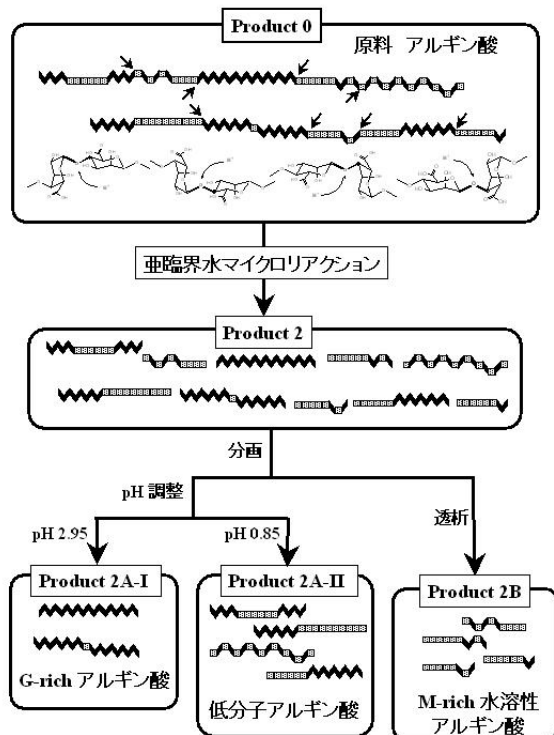


図7 亜臨界水マイクロリアクションによるアルギン酸の分解反応モデル

4. まとめ

超臨界・亜臨界水マイクロリアクションによるアルギン酸の分解反応を検討し以下の知見を得た。

- (1) 超臨界水マイクロリアクションでは、ヘキサース環構造まで分解されたため低分子アルギン酸を得ることができなかった。
- (2) 亜臨界水マイクロリアクションでは、250℃, 25MPa, 0.088秒の条件で、G-MとM-G結合が選択的に分解され、G-richアルギン酸およびM-rich水溶性アルギン酸が得られた。
- (3) 本法は、G/M制御分解法として盛んに研究されている酵素法に比べ極めて短い時間(< 1s)で、さらには現在の工業的手法であるオートクレーブ法に無いG/M制御能力を持った新規アルギン酸低分子化法として期待できる。

引用文献

- 1) Gacesa, P. Alginates. Carbohydr. Polym. 1998, 8, 161.
- 2) Renn, D. Biotechnology and the Red Seaweed Polysaccharide Industry. Trends Biotechnol. 1997, 15, 9.
- 3) Hesp, R.; Rambotton, B. Effect of Sodium Alginate in Inhibiting Uptake of Radiostrontium by the Human Body. Nature 1965, 208, 458.
- 4) Sutton, A. Reduction of Strontium Absorption in Man by the Addition of Alginate to the Diet. Nature 1967, 216, 1005.
- 5) Kimura, Y.; Watanabe, K.; Okuda, H. Effects of Soluble Sodium Alginate on Cholesterol Excretion and Glucose Tolerance in Rats. J. Home Ethnopharmacol. 1996, 54, 47.
- 6) Nishizawa, M.; Kuda, T.; Yamagishi, T.; Tsuji, K. Effect of Depolymerised Sodium Alginate on the Excretion of Cholesterol from Rats. J. Home Econ. Jpn. 1997, 48, 689.
- 7) Kuda, T.; Goto, H.; Yokoyama, M.; Fujii, T. Effects of Dietary Concentration of Laminaran and Depolymerised Alginate on Rat Cecal Microflora and Plasma Lipids. Fish. Sci. 1998, 64, 589.
- 8) Huag, A.; Larsen, B.; Smidsorød, O. Uronic Acid Sequence in Alginate from Different Sources. Carbohydr. Res. 1974, 32, 217.
- 9) Huag, A.; Mykestad, S.; Larsen, B.; Smidsorød, O. Correlation between Chemical Structure and Physical Properties of Alginate. Acta Chem. Scand. 1967, 21, 768.

- 10) Stokke, B. T. ; Smidsorød, O. ; Bruheim, P. Skjåk-Bræk, G. Distribution of Uronic Acid Residues in Alginate Chain in Relation to Alginate Gelling Properties. *Macromolecules* 1991, 24, 4637.
- 11) Steginsky C. A. ; Beale, J. M. ; Floss, H. G. ; Mayer, R. M. Structure Determination of Alginic Acid and the Effects of Calcium Binding as Determined by High-field NMR. *Carbohydr. Res.* 1992, 225, 11.
- 12) Skjak-Bræk, G. Alginate : Biosyntheses and Some Structure-Function Relationship Relevant to Biological and Biotechnological Application. *Biochem. Soc. Trans.* 1992, 20, 27.
- 13) Clementi, F. ; Crudele, M. A. ; Parente, E. ; Mancini, M. ; Moresi, M. Production and Characterization of Alginate from *Azotobacter vinelandii*. *J. Sci. Food Agric.* 1999, 79, 602.
- 14) Doubert, R. S. ; Quatranno, R. S. Properties of Alginate Lyases from Marine Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 47, 699.
- 15) Dunne, W. M. ; Buckmire, F.L.A. Partial-Purification and Characterization of a Polymannuronic Acid Depolymerase Produced by a Mucoid Strain of a *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Patient with Cystic-Fibrosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 50, 562.
- 16) Romeo, T. ; Preston, J. F. Purification and Structural Properties of an extra-cellular (1,4)- β -Mannuronan Specific Alginate Lyase from a Marine Bacterium. *Biochemistry* 1986, 25, 8385.
- 17) Yonemoto, Y. ; Murata, K. ; Kimura, A. ; Yamaguchi, H. ; Okayama, K. Bacterial Alginate Lyase : Characterization of Alginate - Producing Bacteria and Purification of the Enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 1991, 72, 152.
- 18) Gacesa, P. Enzymatic Degradation of Alginates. *Int. J. Biochem.* 1992, 24, 545.
- 19) Murata, K. ; Yamaguchi, H. ; Yonemoto, Y. ; Sakauchi, K. ; Okayama, K. Effect of Depolymerization of Alginate by a Non-Support Bioreactor System Containing Flocculated Bacteria Cells. *J. Ferment. Bioeng.* 1992, 73, 225.
- 20) Heyraud, A. ; Colin-Morel, P. ; Gey, C. ; Chavagnat, F. ; Guinand, M. ; Wallach, J. An Enzymatic Method for Preparation of Homopolymannuronate Blocks and Strictly Alternating Sequences of Mannuronic and Guluronic Units. *Carbohydr. Res.* 1998, 308, 417.
- 21) Hashimoto, W. ; Okamoto, M. ; Hisano, T. ; Monma, K. ; Murata, K. Sphingomonas sp. A 1 Lyase active on both Poly- β -D-Mannuronate and Heteropolymeric Region in Alginate. *J. Ferment. Bioeng.* 1998, 86, 236.
- 22) Jpn. Kokai Tokkyo Koho H06007093, 1994.
- 23) Archer, D. G. ; Wang, P. The Dielectric Constant of Water and Debye-Huckel Limiting Law Slopes. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1990, 19, 371.
- 24) Ikushima, Y. ; Hatakeda, K. ; Sato, O. ; Arai, M. Acceleration on Synthetic Organic Reactions using Supercritical Water : Noncatalytic Beckman and Pinacol Rearrangements. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 1908.
- 25) Ikushima, Y. ; Hatakeda, K. ; Sato, M. ; Sato, O. ; Arai, M. Innovation in a Chemical Reaction Process using a Supercritical Water Microreaction System : Environmentally Friendly Production of ϵ -Caprolactam. *Chem. Commun.* 2002, 19, 2208.
- 26) Grasdalen, H. High-field $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy of Alginate : Sequential Structure and Linkage Conformations. *Carbohydr. Res.* 1983, 118, 255.
- 27) Penman, A. ; Sanderson, G. R. A Method of Uronic Acid Sequence in Alginates. *Carbohydr. Res.* 1972, 25, 273.
- 28) Grasdalen, H. ; Larsen, B. ; Smidsorød, O. A P. M. R. Study of the Composition and Sequence of Uronate Residues in Alginate. *Carbohydr. Res.* 1979, 68, 23.
- 29) Shinohara, M. ; Kamono, H. ; Aoyama, T. ; Bando, H. ; Nishizawa, M. Relationship between Guluronate Content in Alginates Determined by $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy and Their Average Molecular Weight. *Fish. Sci.* 1999, 65, 909.
- 30) Kuda, T. ; Taniguchi, E. ; Nishizawa, M. ; Arai Y. Fate of Water-Soluble Polysaccharides in Dried Chorda filum a Brown Alga Drug Water Washing. *J. Food Composition and Analysis.* 2002, 15, 3.
- 31) Blackwood, A. D. ; Chaplin, M. F. Oligosaccharide and Polysaccharide Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry.* John Wiley & Sons : Chichester, 2000, 741.