

曇点法によって作成された極性アルコール-塩または糖系水性二相の相図

衣笠 巧 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, t.kinugasa@niihama-nct.ac.jp)

菊池 彩花 (新居浜工業高等専門学校 専攻科 生物応用化学専攻, c1401714@niihama.kosen-ac.jp)

山内 美咲 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, c1401838@niihama.kosen-ac.jp)

藤田 莉緒 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, c1401930@niihama.kosen-ac.jp)

西井 靖博 (新居浜工業高等専門学校 生物応用化学科, y.nishii@niihama-nct.ac.jp)

Phase diagram of a polar alcohol-salt or sugar aqueous two-phase system by cloud point method

Takumi Kinugasa (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Niihama, Japan)

Ayaka Kikuchi (Advanced Engineering Course Applied Chemistry and Biotechnology Program, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Japan)

Misaki Yamauchi (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Niihama, Japan)

Rio Fujita (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Niihama, Japan)

Yasuhiro Nishii (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Niihama, Japan)

要約

極性有機溶媒-塩または糖系の水性二相抽出は、低コスト、高操作性、環境適合性などの点で他のタンパク質分離法に比べて有利である。しかし、どのような条件でどのような性質の二相を形成するかという基本的な研究データがまだ不足している。本研究では、曇点法によってこの系の二相形成挙動を調べ、相図を作成した。曇点法の結果は、以前に報告した成分分析法の結果とよく一致した。塩の種類を変えたときの水性二相の形成しやすさの順序は Hofmeister 系列とほぼ一致したが、リン酸二水素イオンは例外であり、必ずしも Hofmeister 系列だけでは説明できないことが示された。極性アルコールの疎水性が高いほど、水性二相を形成しやすいことが示された。また、糖系は塩系よりも水性二相を形成しにくく、塩と糖の混合系では、糖の比率が高くなるほど水性二相形成が困難になることが明らかになった。

Abstract

A polar organic solvent-salt/sugar aqueous two-phase system is advantageous due to low cost, high operability, and environmental friendliness. However, there is still a lack of basic research data on the conditions and properties of two-phase formation. The aqueous two-phase formation behavior was investigated and a phase diagram was constructed by the cloud point method. The results of the cloud point method were almost in agreement with those of the component analysis method. The order of aqueous two-phase formation ability was almost consistent with the Hofmeister series, but dihydrogen phosphate ions were an exception, and it was shown that the order cannot necessarily be explained by the Hofmeister series alone. It was shown that the more hydrophobic the polar alcohol is, the more likely it is to form aqueous two-phases. Furthermore, the sugar system was less likely to form two aqueous phases than the salt system, and in mixed systems of salt and sugar, aqueous two-phase formation becomes more difficult as the mole fraction of sugar increases.

キーワード

水性二相, 相図, 曇点法, 塩析, 疎水性

1. 緒言

地球温暖化などの環境問題、石油価格の高騰に起因する資源・エネルギー問題などが山積する中、石油に依存したオイルファイナリー社会から脱却し、再生可能資源から化学品や燃料を製造するバイオリファイナリー社会に転換することが求められている (石井他, 2013)。バイオマスには廃棄物系、未利用系および資源作物があり、大半を廃棄物系が占めていて、その内訳は家畜排せつ物、下水汚泥、紙、食品廃棄物などである。これらのバイオマスはカーボンニュートラルであり、微生物によって生産したバイオマスケミカルやバイオ燃料を有効利用することによって、二酸化炭素の排出削減に貢献することが期待されている。しかし、バイオリファイナリーの普及には課題も多い。廃棄物系や未利用系バイオマスを原料とする場合、安価で大量に、

しかも安定に調達しなければならないし、効率的な変換プロセスの確立も求められる (中崎, 2021)。また、資源作物の場合は、食料生産と競合して食糧価格の高騰を招いたことから、新たな原料開発が必要とされている (松田・高橋, 2008)。さらに、微生物処理されたバイオマスの発酵液は組成が複雑で有用成分の濃度が低いため、分離精製のために多段階の手順が必要となり、エネルギー消費やコストの面で課題がある (Fu et al., 2021)。そのため新しい分離精製法の構築が求められている。

液液抽出は、溶質を含む原料液にそれと混和しない溶媒を加えて溶質を溶媒に分配させて分離する方法で、蒸留に次いで重要な物質分離操作であり、装置が簡便、操作が容易、省エネルギー、大規模連続操作が可能などの利点がある。液液抽出では、水溶液と容易に二相を形成する無極性有機溶媒の使用が便利であり、これに抽出剤を加えることで抽出性能を高める方法が一般的である。しかし、無極性有機溶媒や抽出剤が微生物に対して毒性を有することが多

く、バイオマスの発酵液への応用は限定的である (Gao et al., 2009)。また、無極性有機溶媒は環境負荷が大きく、環境、安全、健康の観点から環境調和型溶媒 (グリーン溶媒) への転換が望まれている (Prat et al., 2014)。環境調和型溶媒を用いた液液抽出の例として、水性二相抽出が注目されてきた (Phong et al., 2018; Varadavenkatesan et al., 2021)。これには水溶性高分子系と極性有機溶媒系がある。水溶性高分子系には水溶性高分子-水溶性高分子系と水溶性高分子-塩系があって、主にタンパク質などの生体関連物質の分離精製への適用が期待されて多くの研究がされてきた。一方、極性有機溶媒系には、極性有機溶媒-塩系と極性有機溶媒-糖系があり、水溶性高分子系に比べてコストや操作性の面で有利である。極性有機溶媒-塩系としては、コハク酸 (Pratiwi et al., 2015) やバイオブタノール (Xie et al., 2017) などを対象として水性二相抽出に適切な塩の選択などが研究されてきた。極性有機溶媒-糖系としては、アセトン-ブタノール-エタノール発酵液からのバイオブタノール抽出 (Xie et al., 2015) などが試みられている。しかし、いずれも研究は少なく、まず二相形成が生じる条件から調査する必要がある。

本研究室では、極性有機溶媒として環境調和型の極性アルコールを用いて、成分分析法によって極性アルコール-塩系および極性アルコール-糖系の相図を作成し、極性アルコールや塩の種類の影響を調べた (衣笠他, 2024)。成分分析法では、二相間の平衡関係を明らかにすることができるが、測定は煩雑で誤差が大きいという課題があった。これに対して曇点法は、極性アルコールに塩や糖の水溶液を滴下し、液が濁った点を二相形成した組成と判定する方法であり、操作が簡易で再現性も高い (Matsumoto et al., 2019; 2022)。そこで本研究では、曇点法を用いて極性アルコール-塩系および極性アルコール-糖系の相図を作成することで、水性二相抽出のための基礎データとする。

2. 実験

極性アルコールとして1-プロパノール、2-プロパノール、エタノール、塩として硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硝酸ナトリウム、クエン酸三ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、糖としてグルコースを用いた。ビーカーに所定濃度の塩水溶液または糖水溶液を20 mL入れ、マグネティックスターラーで攪拌する。ビュレットで極性アルコールを滴下し、目視で透明溶液が濁った時の滴下量を記録する。このとき溶液は相分離が起こり、二相を形成している。次にビュレットで脱イオン水を溶液が透明になるまで滴下する。このとき溶液は一相になっている。これを繰り返すことで、溶液が二相を形成するときの組成を滴下量から求める。塩または糖水溶液の濃度は極性アルコールの滴下によって相分離が起こる範囲とし、飽和溶解度の半分程度の濃度を目安とする。なお、一般に水性二相の相図は質量組成で表すが、本研究では塩の種類などの影響を検討するため、モル組成を採用した。

3. 結果と考察

3.1 曇点法と成分分析法の比較

図1に1-プロパノール-硫酸アンモニウム系および1-プロパノール-グルコース系の相図を、横軸にアルコール分濃度、縦軸に塩または糖分濃度のプロットとして示している。白抜記号が本研究の曇点法の結果であり、黒塗記号は前報の成分分析法の結果である (衣笠他, 2024)。成分分析法の結果は、相分離して平衡関係にある上相 (右下のプロット) と下相 (左上のプロット) の組成をタイラインで結んでいる。曇点法ではタイラインを求めることができない。双曲線状のプロットを結んで表される曲線をバイノーダル曲線あるいは溶解度曲線と呼ぶ。ただし、ここでは図が複雑になるのでバイノーダル曲線は表示していない。バイノーダル曲線より左下の原点に近い範囲が一相領域、右上の範囲が二相領域であり、バイノーダル曲線が原点に近いほど二相領域が広く、水性二相を形成しやすいことを意味する。

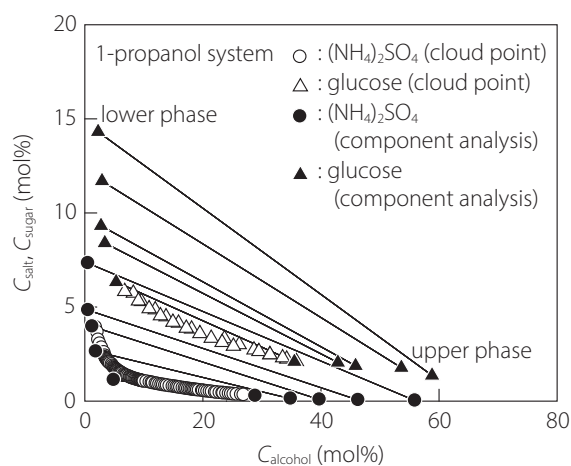


図1：曇点法 (白抜記号) および成分分析法 (黒塗記号) で求めた1-プロパノール-塩または糖系水性二相の相図の比較 (実線はタイライン)

曇点法によって求められるバイノーダル曲線は、若干のずれは見られるが、成分分析法の結果とほぼ一致した。なお、目視による曇点の判断の個人差は無視できるほど小さいことを確認した。曇点法と成分分析法では、測定可能な範囲にはかなりの違いが見られた。成分分析法では、バイノーダル曲線の両端に近い範囲が測定できたのに対して、曇点法ではバイノーダル曲線の真ん中付近の測定が可能であった。成分分析法では塩または糖水溶液と極性アルコールを等量ずつ混合し、形成された二相の組成を分析して相図を作成する。このとき、塩または糖濃度が高いときは相図のプロットは離れて長いタイラインの関係を示し、濃度が低くなるとバイノーダル曲線の真ん中に近いプロットが得られる。しかし、ある濃度以下では二相を形成しなくなり、バイノーダル曲線の真ん中付近のデータを得るには濃度設定が難しい。一方、曇点法では初期の塩または糖濃度の設定によって測定可能な範囲が異なり、濃度が高いほどバイノーダル曲線の上端のデータを得ることができるが、初期濃度が高すぎると塩や糖の析出が起こるなどの問題が発生

して曇点が決定できない。また、曇点法ではプロットの間隔が細かく得られ、バイノーダル曲線を表示しやすかったのに対して、成分分析法では測定が煩雑なためプロットがまばらになった。曇点法と成分分析法はそれぞれに一長一短があり、目的によって使い分ける必要があることが判明した。

3.2 1-プロパノール-塩系の相図

極性アルコールとして1-プロパノールを用い、様々な塩水溶液との相図を作成した結果を図2、3に示す。図2は陽イオン種の影響を比較している。バイノーダル曲線は、硫酸塩、硝酸塩ともにアンモニウム塩よりもナトリウム塩の方が原点に近く、ナトリウムイオンの方が水性二相を形成させやすいことが判明した。

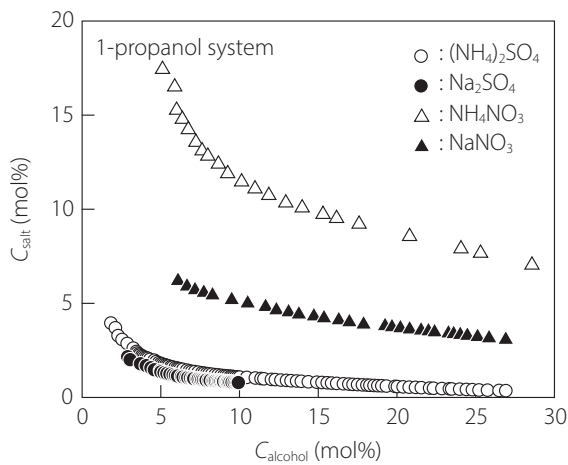


図2：1-プロパノール-塩系水性二相の相図に及ぼす陽イオン種の影響

図3では陰イオン種の影響を比較した。ナトリウム塩においては、原点に近い順にクエン酸三ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、硝酸ナトリウムであった。ただし、クエン酸三ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸ナトリウムのバイノーダル曲

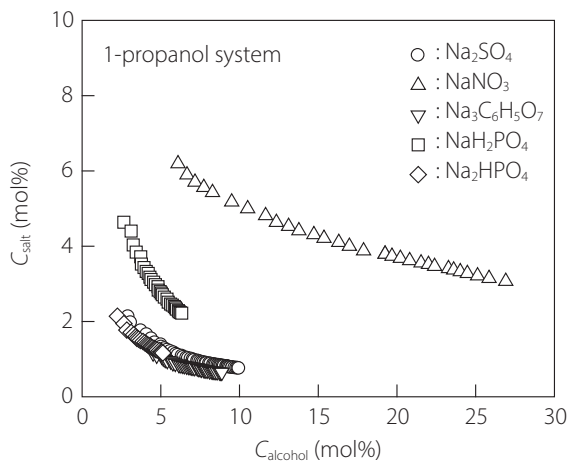


図3：1-プロパノール-塩系水性二相の相図に及ぼす陰イオン種の影響

線は互いに非常に近接した位置にあった。また、図2ではアンモニウム塩においても、硝酸塩よりも硫酸塩の方がバイノーダル曲線が原点に近く、硫酸イオンの方が水性二相を形成させやすいことが示された。

極性有機溶媒-塩系の水性二相形成は、塩による極性有機溶媒の塩析効果によって引き起こされると考えられている（松本, 2016）。そこで二相形成の起こりやすさと Hofmeister 系列との関係を考察する。Hofmeister 系列とはタンパク質を塩析させる能力の大きい順番にイオンを並べた順列である。Mazzini and Craig (2017) はさまざまな文献から種々の陽イオンと陰イオンの Hofmeister 系列をまとめた結果を報告している。これによると Hofmeister 系列は、本研究で使用した陽イオンに対して $\text{Na}^+ > \text{NH}_4^+$ 、陰イオンに対して $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{HPO}_4^{2-} \approx \text{SO}_4^{2-} \gg \text{NO}_3^-$ の順である。ナトリウムイオンとアンモニウムイオンを比較すると、Hofmeister 系列の順位が高いナトリウムイオンの方が二相形成しやすいことが判明した。また、硝酸イオンは他の陰イオンに比べて極端に Hofmeister 系列の順位が低く、他のイオンに比べてかなり二相形成しにくかった結果と一致する。また、クエン酸イオン、リン酸水素イオン、硫酸イオンはよく似たバイノーダル曲線であったが、これも Hofmeister 系列の順位と矛盾がない。しかし、リン酸二水素イオンの Hofmeister 系列の順位はクエン酸イオンとリン酸水素イオンと間であるのに、二相形成のしやすさは硫酸イオンと硝酸イオンの間になった。Hofmeister 系列には未知なことが多く、条件によって逆転することがあることも報告されており（Mazzini and Craig, 2017）、二相形成の起こりやすさは Hofmeister 系列からおよその予測はできるが、必ずしも一致しないことがわかった。しかし、陽イオン、陰イオンともに塩析効果の強さが二相形成の起こりやすさに大きな影響を持つことは確認できた。

リン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムは、安価で生体反応を阻害しにくいことから酵素活性測定や培養細胞の洗浄・懸濁などに広く用いられているリン酸緩衝液の成

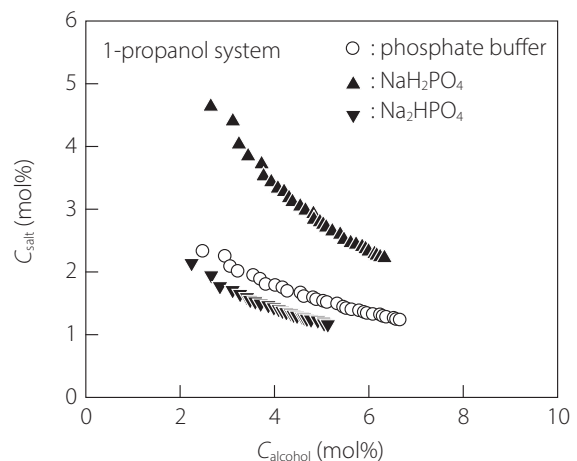


図4：1-プロパノール-リン酸緩衝液系水性二相の相図

分であり、その有効緩衝範囲は5.8～8.0であることが知られている(加藤, 2017)。そこでバイオマスの発酵液への応用を想定して、塩としてリン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、およびそのモル比1:1混合物を用いたときの相図を作成した。その結果を図4に示す。混合物のバイノーダル曲線は、リン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムの間ではあるが、かなりリン酸水素二ナトリウムに近い位置になった。極性有機溶媒-塩系でバイオマスの発酵液の抽出を行う場合、pH調整をしなければならないことが多いと考えられる。その際に適切なpHに調節するための緩衝液の濃度比が、二相形成の起こりやすさに影響し、pHとは別の要因として抽出率に影響する可能性があることが示唆された。

3.3 極性アルコール-硫酸アンモニウム系の相図

塩として硫酸アンモニウムを用い、様々な極性アルコールとの相図を作成した結果を図5に示す。これより水性二相を形成しやすい順番は、1-プロパノール>2-プロパノール>エタノールであることがわかった。前報(衣笠他, 2024)で成分分析法による相図の結果を、極性アルコールの1-オクタノール/水分配係数の対数値 $\log P$ で評価したが、本研究の結果も同様であった。すなわち、極性アルコールの $\log P$ は、1-プロパノールが0.25、2-プロパノールが0.05、エタノールが-0.32であり、 $\log P$ が大きき疎水性の高い極性アルコールほど二相形成しやすいことが示された。疎水性が高いアルコールは水和力が小さく、塩析効果を受けやすいことが原因と考えられる。Matsumotoら(2019)は、種々の水混和性有機溶媒-リン酸水素二カリウム系で曇点法による相図作成を行い、テトラヒドロフラン>1-プロパノール>アセトン>1,4-ジオキサン>ジメチルスルホキシド>メタノールの順になり、ジメチルスルホキシドを除いて疎水性の順番と一致することを報告し、疎水性の高いテトラヒドロフランが水性二相抽出に有利であるとした。しかし、テトラヒドロフランは環境調和型溶媒とはいえず(Prat et al., 2014; Tobiszewski et al., 2017)、本研究の結果もあわせて考えると、極性有機溶媒-塩系水性

二相抽出のためには1-プロパノールが最も適切であると考えられる。

3.4 1-プロパノール-硫酸アンモニウム-グルコース系の相図

図1、2から、グルコースは二相形成しにくい系であり、そのバイノーダル曲線はほぼ硝酸ナトリウムと重なる。これはグルコースの糖析能力が小さいためと考えられる。糖析とは、塩析と同様に、水に溶けている有機化合物に高濃度を糖を加えると、有機化合物の水和水が糖によって奪われ、溶解度が低下する現象である。塩に比べて糖の方が水分子との相互作用が小さいため塩析よりも糖析の方が起こりにくいとされる。塩には装置を腐食させる欠点があるので、代わりに糖を使いたい、糖の二相形成しにくい点が課題となる。そこで、塩と糖の混合系の相図がどのような挙動を示すかを調べた。極性アルコールとして1-プロパノール、塩として硫酸アンモニウム、糖としてグルコースを用いて、塩と糖の比率を変えて相図を作成した結果を図6に示す。糖の比率 x_{sugar} は塩と糖の混合系における糖のモル分率である。糖のモル分率が増えるにつれてバイノーダル曲線は硫酸アンモニウムからグルコースに近づき、徐々に二相形成しにくくなることが明らかになった。また、バイノーダル曲線は糖の比率を増やしてもあまり変化せず、モル分率0.89においても硫酸アンモニウムとグルコースの中間程度までにしかなかった。これには二通りの解釈が考えられる。ひとつはバイノーダル曲線にはグルコースよりも硫酸アンモニウムの影響が強く表れるという考え方である。すなわち、硫酸アンモニウムの塩析能力がグルコースの糖析能力よりも強いため、糖の比率が大きくなっても二相形成しやすい状態が続く可能性がある。もうひとつは、変化に対するバイノーダル曲線の敏感さが相図の位置によって異なるという考え方である。塩析能力や糖析能力が同じように変化しても、バイノーダル曲線が原点に近いときは鈍感であり、原点から離れると敏感に変化するようになる可能性があると考えられる。これは図2において、硫酸塩の

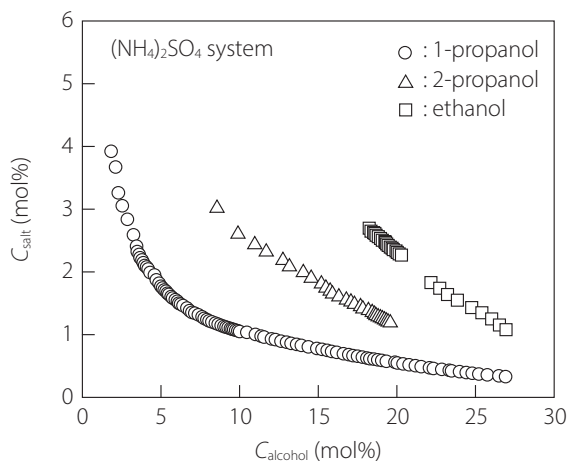


図5：極性アルコール-硫酸アンモニウム系水性二相の相図に及ぼすアルコールの種類の影響

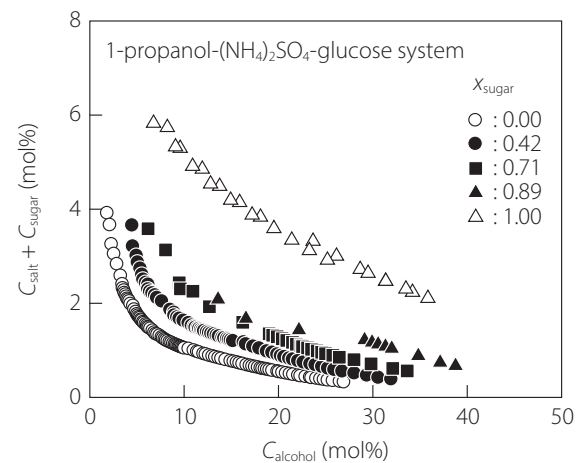


図6：1-プロパノール-硫酸アンモニウム-グルコース系水性二相の相図に及ぼす塩と糖の比率の影響

場合はバイノーダル曲線が原点に近くナトリウム塩とアンモニウム塩の違いがあまりないのに対して、バイノーダル曲線が原点から離れた硝酸塩の場合はナトリウム塩とアンモニウム塩で大きな違いが見られたことから推測される。また、図4で示した通り、リン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムの1:1混合物のバイノーダル曲線が、原点に近いリン酸水素二ナトリウムの方に寄っていることも傍証となる。このように相図からは二相形成しやすさの順番は明らかになったが、その程度を定量的に表すことは困難であった。

4. 結論

極性アルコール-塩/糖系の水性二相形成挙動を調べ、曇点法によって相図を作成した。曇点法の結果は成分分析法の結果とほぼ一致した。曇点法は成分分析法に比べてタイラインが得られないなどの欠点もあるが、測定が容易であり、バイノーダル曲線を描きやすいデータが得られた。水性二相形成の起こりやすさは、陽イオンではナトリウムイオン、アンモニウムイオンの順であり、陰イオンではクエン酸イオン、リン酸水素イオン、硫酸イオン、リン酸二水素イオン、硝酸イオンの順であった。この順はホフマイスター系列とほぼ一致したが、リン酸二水素イオンは例外であり、必ずしもホフマイスター系列だけでは説明できないことが示された。緩衝液ではpH調整のために混合比を変えた結果、水性二相形成の起こりやすさにも影響するため、注意が必要であることが示唆された。極性アルコールは、その疎水性が大きいほど水性二相形成しやすことが示された。また、糖系は塩系に比べて水性二相を形成しにくく、塩と糖の混合系では糖の比率が増えるにつれて二相形成が起こりにくくなった。相図から二相形成に関する定性的な情報は得られたが、定量的に解析するためには熱力学的なアプローチが求められる。

引用文献

Fu, C., Li, Z., Sun, Z. and Xie, S. (2021). A review of salting-out effect and sugaring-out effect: driving forces for novel liquid-liquid extraction of biofuels and biochemicals. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, Vol. 15, 854-871.

Gao, M., Shimamura, T., Ishida, N., Nagamori, E., Takahashi, H., Umemoto, S., Omasa, T., and Ohtake, H. (2009). Extractive lactic acid fermentation with tri-*n*-decylamine as the extractant. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 44, 350-354.

石井 純・蓮沼誠久・松田史生・近藤昭彦(2013). バイオリファイナリー社会に向けた燃料・化学品生産. *安全工学*, Vol. 52, No. 4, 249-255.

加藤太一郎(2017). 緩衝液のイロハ. *生物工学会誌*, Vol. 95, No. 8, 476-479.

衣笠巧・仁居茜・アマラー・真鍋緑・伊藤愛菜・西井靖博(2024). 成分分析法による極性アルコール-塩または糖系水性二相の相図作成. *新居浜工業高等専門学校紀要*,

Vol. 60, 9-13.

松田浩敬・高橋大輔(2008). 国際食料需給の現状と環境問題—バイオ燃料生産と水問題を中心に—. *農業経済研究*, Vol. 80, No. 1, 23-35.

松本道明(2016). 塩析・糖析を利用した分離技術の新展開. *日本海水学会誌*, Vol. 70, No. 6, 354-357.

Matsumoto, M. and Ueda, T. (2019). Extraction of cephalosporin antibodies with aqueous two-phase systems composed by water-miscible organic solvents and salts. *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, Vol. 26, 63-68.

Matsumoto, M., Sato, T., Wada, A., and Tahara, Y. (2022). Partition of amino acids in aqueous two-phase systems comprising hydrophilic organic solvents and salts. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, Vol. 55, 344-348.

Mazzini, V. and Craig, V. S. J. (2017). What is the fundamental ion-specific series for anions and cations? Ion specificity in standard partial molar volumes of electrolytes and electrostriction in water and non-aqueous solvents. *Chemical Science*, Vol. 8, 7052-7065.

中崎清彦(2021). バイオリファイナリーの現状と課題—原料調達とその問題点—. *廃棄物資源循環学会誌*, Vol. 32, No. 4, 255-263.

Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H., and Ling, T. C. (2018). Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 126, 273-281.

Prat, D., Hayler, D., and Wells, A. (2014). A survey of solvent selection guides. *Green Chemistry*, Vol. 16, 4546-4551.

Pratiwi, A. I., Yokouchi, T., Matsumoto, M., and Kondo, K. (2015). Extraction of succinic acid by aqueous two-phase system using alcohols/salts and ionic liquids/salts. *Separation and Purification Technology*, Vol. 155, 127-132.

Tobiszewski, M., Namieśnika, J., and Pena-Pereira, F. (2017). Environmental risk-based ranking of solvents using the combination of a multimedia model and multi-criteria decision analysis. *Green Chemistry*, Vol. 19, 1034-1042.

Varadavenkatesan, T., Pai, S., Vinayagam, R., Pugazhendhi, A., and Selvaraj, R. (2021). Recovery of value-added products from wastewater using aqueous two-phase systems: A review. *Science of the Total Environment*, Vol. 778, 146293.

Xie, S., Zhang, S., Qiu, X., Yi, C., Hu, Y., Li, F., and Quan, J. (2015). Sugaring-out effects of sucrose and glucose on the liquid-liquid equilibria for the (water + acetone + 1-butanol + ethanol) system. *Journal of Chemical & Engineering Data*, Vol. 60, 2434-2441.

Xie, S., Zhang, Y., Yi, C., and Qiu, X. (2017). Biobutanol recovery from model solutions using potassium pyrophosphate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 92, 1229-1235.

受稿日：2024年8月9日
受理日：2024年9月13日