[農化 第 42 卷, 第 1 号, p. 49~54, 1968]

Carbonyl Philic Resin に対するカルボニル化合物の 吸着と溶出条件について

——とくにレブリン酸の場合を中心として——

田中武治, 副島正美, 青山虎彦*, 八木 晃**

(茨城大学農学部農芸化学科, *相模女子大学食物学科, **東洋醸造株式会社研究室)

昭和 42 年 5 月 30 日 受 理

Adsorption and Elution of Carbonyl Compounds on C.P. Resin

By Takeharu TANAKA, Masami SOEJIMA, Torahiko AOYAMA and Noboru YAGI

Department of Agricultural Chemistry, Ibaraki University

For the purpose of separation of carbonyl compounds, the adsorption of various carbonyl compounds such as levulinate, pyruvate, α -ketoglutarate and acetone on the Carbonyl Philic Resin [C.P. Resin-S. Emoto, K. Namiki and M. Ando : *Sci. Pap. I. P. C. R.*, **53**, 256 (1959)] was studied.

It was found that considerable amounts of carbonyl compounds were quantitatively adsorbed on the resin and separated by elution with solvents of different hydrogen ion strengths. The adsorption of carbonyl compounds on the resin was significantly affected by pH milieu, that is, pH optima of adsorption of levulinate, acetone, α -ketoglutarate and pyruvate were at pH 5, pH 3~pH 8, pH 3 and pH 7, respectively. 0.95 mmoles of levulinate was adsorbed on 1 g of C.P. Resin at pH 4.4 for 60 min incubation with stirring. By column chromatographic method of C.P. Resin, levulinate in the protein hydrolysate was completely separated from amino acids under the conditions experimented and levulinate adsorbed on the resin was eluted 100 per cent by 0.5 N HCl, and 80 per cent by 0.5 N NaOH.

(Received May 30, 1967)

はじめに

さきに江本らは酸ヒドラチッド基を有するアクリル酸系の C.P. 樹脂, すなわち Carbonyl Philic Resin を合成し⁽¹⁾, この樹脂がアセトン, D-グルコースなどのカルボニル化合物を選択的に吸着することを見出し, 吸着反応の基礎的な検討を行なっている^(2~5).

一方, 各種発酵液など糖を多量に含む蛋白質原料を酸加水分解して, アミノ酸を調製する場合によく知られているように多量のレブリン酸が蓄積する^(6~14). このレブリン酸を選択的に除去することは, 製品の品質向上の面からも望ましい。

本報では, 著者らはこの樹脂を用いて, レブリン酸をはじめとする各種カルボニル化合物の吸着条件ならびに樹脂に吸着したカルボニル化合物の溶出条件を検討した結果, ケト酸は一般のカルボニル化合物と同様に, この樹脂によく吸着された。しかし吸着反応は用いるカルボ

ニル化合物の種類によって, また水素イオン濃度などによっていちじるしく相異なることが明らかとなり, この性質を利用して, 各種ケト酸を選択的に分離する可能性が示唆された。さらに, C.P. 樹脂とカルボニル化合物の吸着反応の機構について若干の知見を得ることができたので報告する。

実験方法および材料

1. C.P. 樹脂 : C.P. 樹脂は理化学研究所の江本, 並木両氏より分与された。この樹脂は crosslinkage 10 %, meshsize 30, 100 の 2 種で緩衝液中で 15 時間室温で膨潤した後に使用した。

2. カルボニル化合物とその定量法 : アセトン (特級, 純正化学製), ピルビン酸 (特級, 純正化学製), α -ケトグルタル酸 (特級, 東京化成製), グリオキシール酸 (特級, 東京化成製), レブリン酸 (特級, 東京化成製), D-グルコース (特級, 東京化成製), D-フラクトース (特

級, 東京化成製), *p*-ハイドロオキシフェニルピルビン酸 (特級, 東京化成製), またレブリン酸を多量に含む試料として蛋白質加水分解液 (味の素製) を試料とした. 各カルボニル化合物の定量法は次のごとくである. 1) アセトン; Iodoform 法⁽¹⁵⁾, 2) レブリン酸, ピルビン酸, α -ケトグルタル酸, グリオキシル酸; Friedman-Haugen 法⁽¹⁶⁾, 3) D-グルコース; Tauber-Kleiner 法⁽¹⁷⁾, 4) D-フラクトース; Bertrand 法⁽¹⁸⁾, 5) *p*-ハイドロオキシフェニルピルビン酸; 2,4-dinitrophenylhydrazine を用いた比色法⁽¹⁹⁾.

3. 吸着方法と吸着速度の測定: 吸着はカラム法とパッチ法で行なった. パッチ法の場合には, C.P. 樹脂 1 g を 50 ml の三角フラスコにとり pH 2~8 の 0.25~1.0 M の各種濃度のカルボニル化合物 (溶液 10 ml) と混合し, 恒温槽中で攪拌しながら反応を行なわせ, 反応開始後 30 分および 60 分におけるカルボニル化合物の吸着量を測定した. 吸着速度の測定は江本らの方法に準じて行なった. すなわち, C.P. 樹脂 1 g に一定量のカルボニル化合物を加え, この加えた時間から所定の時間毎に上澄液のカルボニル化合物を定量し, 原液からこの値を差し引いたものをその時間での吸着量とした.

4. 吸着量は 1 g C.P. 樹脂当り吸着したカルボニル化合物の mg 分子量 (mmole) で表わした.

実験結果および考察

1. C.P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着量に及ぼす pH の影響

緩衝液を用いて pH を変え, レブリン酸の吸着量に及ぼす影響を温度 30°C において調べた結果を Fig. 1 に示す. この実験では C.P. 樹脂 1 g に 0.5 M レブリン酸溶液 10 ml を加えてパッチ法で反応させた. 図に明らかなように, 60 分で C.P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着は pH 4.4 で 0.95 mmole, pH 2.7 で 0.7 mmole, pH 8.0 で 0.3 mmole であり, 反応液が弱酸性の場合が最もよく吸着され, 酸性側, あるいはアルカリ性側のいずれかにかたよると吸着量が低下し, とくにアルカリ性では著しく少なくなっている傾向があった. この傾向は樹脂表面の荷電およびカルボニル化合物の活性化によるものと推定され, 酵素反応における pH-活性曲線と類似した機作によるように思われる.

2. C.P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着に及ぼす温度の影響

C.P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着は pH 4.4 が最

Fig. 1. Effect of pH on the Adsorption Rate of Levulinate on C.P. Resin.

Reaction mixture consisted of 10 ml of 2 M buffer solution containing 0.5 M of levulinate and 1 g of C.P. Resin (30 mesh) equilibrated with the same buffer solution. Total volume was 12.2 ml.

Adsorption was carried out by incubating the above reaction mixture at 30°C with stirring.

pH 1.2, 2.7, 4.4: 2 M citrate buffer.

pH 8.0: 2 M phosphate buffer.

Fig. 2. Effect of Reaction Temperature on the Adsorption of Levulinate on C.P. Resin at pH 4.4.

Reaction mixture consisted of 10 ml of 2 M citrate buffer (pH 4.4) containing 0.5 M of levulinate and 1 g of C.P. Resin (30 mesh) equilibrated with the same buffer solution. Total volume was 12.2 ml.

Adsorption was carried out by incubating the above reaction mixture for 60 min with stirring.

適であったことから、この pH におけるレブリン酸の吸着に及ぼす温度の影響を調べた結果が Fig. 2 である。この実験では C. P. 樹脂 1 g を 0.5 M レブリン酸溶液 10 ml に加え温度 30°C, pH 4.4 (2 M クエン酸緩衝液), パッチ法で 60 分間反応させた。図に示すごとく、レブリン酸の吸着量は温度が上昇するに従って増大し、30°C では 0.95 mmole が吸着されたのに対して 0°C ではわずか 0.2 mmole であった。このことは、この反応の活性化エネルギーが比較的大きく、カルボニル化合物と C. P. 樹脂の酸ヒドラチッド基との化学的親和力によるものであると考えられる。

3. 各種カルボニル化合物の C. P. 樹脂に対する吸着
レブリン酸の C. P. 樹脂に対する吸着が pH 4.4 で最適であったことから、各種カルボニル化合物の C. P. 樹脂に対する吸着量 (mmole) を pH 4.4 で比較した結果が Fig. 3 である。すなわち、0.5 M 各種カルボニル化合物溶液 10 ml と C. P. 樹脂 1 g とを 30°C および 60 分間パッチ法で反応させた。図にみられるごとく、カルボニル化合物のうち最もよく吸着したのはアセトンであり、吸着量は 60 分で 2.82 mmole であった。一方、同じ条件で、グリオキシル酸は 2.5 mmole、ピルビン酸は 2.42 mmole、レブリン酸は 0.95 mmole、D-グルコースは 0.85 mmole で相当吸着されたのに対し、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸は 0.1 mmole で吸着が最も少なかった。この順序は分子容の小さい順序と平行しており、小さいものほど早く吸着される傾向を示している。*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸など側鎖の大きいものは立体的に C. P. 樹脂の酸ヒドラチッド基と

Fig. 3. Adsorption Rate of Various Carbonyl Compounds on C. P. Resin at pH 4.4.

- (1) Acetone, (2) Glyoxylate, (3) Pyruvate, (4) Fructose, (5) Levulinate, (6) Xylose, (7) Glucose, (8) α -Ketoglutarate, (9) *p*-Hydroxy phenyl pyruvate.

Fig. 4. Effect of pH on the Adsorption of Carbonyl compounds on C. P. Resin.

- Acetone ×—× α -Ketoglutarate
●—● Levulinate △—△ Pyruvate

Reaction mixture consisted of 10 ml of 2 M buffer solution containing 1 M of carbonyl compounds to be tested and 1 g of C. P. Resin (100 mesh) equilibrated with the same buffer solution. Total volume was 12.2 ml.

Adsorption was carried out by incubating the above reaction mixture at 30°C for 60 min with stirring. pH 2~6; citrate buffer, pH 7~8; phosphate buffer.

の反応が妨げられるものと考えられる。

4. 各種カルボニル化合物の C. P. 樹脂に対する pH 吸着曲線

上述のように C. P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着は反応液の pH によって大きな影響を受ける。そこで、各種カルボニル化合物の吸着に及ぼす pH の影響を検討した。この実験では α -ケトグルタル酸のみは 0.25 M 溶液 10 ml に樹脂 0.5 g を用い、ピルビン酸、アセトン、レブリン酸は 1 M 溶液 10 ml に樹脂 1 g を用いて、温度 30°C, パッチ法で反応させた。その結果が Fig. 4 で、江本ら⁽²⁾の報告と同様に、多くのカルボニル化合物の吸着に至適 pH を有した。その際、アセトンは pH 4~8 でほぼ同

Table I. Separation of Levulinate and Acetone by C. P. Resin Column Chromatography at pH 8

Fractions	Levulinate (mmole)	Acetone (mmole)
Original sample	3.44	6.9
Passing solution through C. P. Resin column	2.70	0

30 ml of sample solution containing 3.44 mmole levulinate and 6.9 mmole acetone in 2 M phosphate buffer solution (pH 8) was applied to a column (1×11 cm) of C. P. Resin (100 mesh) equilibrated with the same buffer solution at a flow rate of 10 ml per hour.

様に 8.0 mmole が吸着された。これに対してレブリン酸は pH 5 で 5.0 mmole, ビルビン酸は pH 7 で 6.0 mmole の最大吸着容量を示した。一方, α -ケトグルター酸はビルビン酸と異なり, pH 3 に至適 pH を有した。このように用いられるカルボニル化合物の種類によって C. P. 樹脂に対する吸着はそれぞれ固有の至適 pH を有することが明らかになった。

5. レブリン酸とアセトンの分別

カルボニル化合物の種類により吸着の至適 pH が著しく異なることを利用して, レブリン酸とアセトンの分別を検討した結果が Table I である。この実験ではアセトンとレブリン酸の混合液 30 ml (レブリン酸含量; 3.44 mmole, アセトン; 6.9 mmole) を温度 30°C, 2 M クエン酸緩衝液 (pH 8) で緩衝化した樹脂 5 g を充てんしたカラム (1×11 cm) に通し, 1 時間に 10 ml の流速で流下せしめた。この表のごとく, 通過液中に初めのレブリン酸の 80% が回収された。それに対してアセトンは通過液中には検出されず, この条件では全部樹脂に吸着された状態であるとみとめられた。

6. C. P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着状況の吸着等温曲線への適合性 (Freundlich)

Fig. 5 はレブリン酸の C. P. 樹脂に対する吸着状況を調べた結果である。この実験では C. P. 樹脂 1 g にそれぞれ 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 M のレブリン酸溶液を各 10 ml ずつ pH 4.4 (2 M クエン酸緩衝液), 温度 30°C, バッチ法で反応させた。図に示

Fig. 5. Freundlich's Adsorption Curve.

w ; Amount of levulinate adsorbed on C. P. Resin.
 m ; Amount of C. P. Resin.
 c ; Equilibrium concentration of levulinate on C. P. Resin.

Reaction mixture consisted of 10 ml of 2 M citrate buffer containing 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 M of levulinate and 1 g of C. P. Resin (100 mesh) equilibrated with the same buffer solution. Total volume was 12.2 ml.

Adsorption was carried out by incubating the above reaction mixture at 30°C for 60 min with stirring.

すように, 江本らが D-グルコース, アセトンを用いた実験結果⁽²⁾と同じように Freundlich の吸着等温曲線によくのることが明らかである。このことから反応は可逆的に進行していると推定される。

7. C. P. 樹脂に吸着されたレブリン酸の溶出について

C. P. 樹脂に吸着されたレブリン酸を回収する目的で 0.5 M 塩酸, 0.5 M 重ソウ (pH 8.4), 0.1 M カセイソーダを用いて溶出した結果が Table II である。この実験ではあらかじめ 2.75, 2.45, 2.88 M レブリン酸を吸着させた C. P. 樹脂 1 g に 0.5 M 塩酸, 0.1 M カセイソー

Table II. Elution of Levulinate Adsorbed on C. P. Resin by 0.5 M HCl, 0.1 M NaOH and 0.5 M NaHCO₃

Solvents	15 min		30 min		60 min	
	Levulinate eluted (mmole)	Recovery (%)	Levulinate eluted (mmole)	Recovery (%)	Levulinate eluted (mmole)	Recovery (%)
0.5 M HCl*	2.14	76	2.2	80	2.8	100
0.1 M NaOH**	—	—	1.96	80	1.96	80
0.5 M NaHCO ₃ ***	—	—	1.39	48	1.39	48

Sample ;

* 2.75 mmole of levulinate adsorbed on 1 g of C. P. Resin (100 mesh).

** 2.45 mmole of levulinate adsorbed on 1 g of C. P. Resin (100 mesh).

*** 2.88 mmole of levulinate adsorbed on 1 g of C. P. Resin (100 mesh).

Solvent ; 20 ml of 0.5 M HCl, 0.5 M NaHCO₃ and 0.1 M NaOH.

Temp. ; 30°C.

ダ, 0.5 M 重ソウ溶液 20 ml を加えて温度 30°C, パッチ法で溶出させた. 表に示すように, 塩酸で溶出すると 60 分で 100% 溶出し, アルカリ性では 60 分で 80% が回収された. 以上の結果から C.P. 樹脂に対して吸着されたレブリン酸は比較的温和な条件で回収できることが明らかである.

8. 蛋白質加水分解液中のレブリン酸の C.P. 樹脂に対する吸着について

次に蛋白質加水分解液中に含まれているレブリン酸を選択的に除去する可能性, および蛋白質分解液中に含まれているアミノ酸がレブリン酸の吸着に及ぼす影響について検討した. その結果が Table III である. この実験では蛋白質分解液 2 ml (レブリン酸含量; 0.44 mmole, アミノ酸含量; 0.22 mmole, pH 5.0) を温度 30°C, 2 M クエン酸緩衝液 (pH 5) で緩衝化した C.P. 樹脂 3 g を充てんしたカラム (1×6.6 cm) に, 1 時間に 10 ml の流速で流下せしめた. その結果, 表に示すように, カラム通過液中にはレブリン酸が検出されず, レブリン酸全部が C.P. 樹脂に吸着している. 一方, アミノ酸態-N はほとんど通過液中に回収された. このことから, この実験条件 (pH 5) では蛋白質分解液中のアミノ酸がこの樹脂に吸着されず, かつレブリン酸の吸着を全く妨げないことが明らかである.

Table III. Adsorption of Levulinate in a Protein Hydrolysate on C.P. Resin at pH 5.0

Fractions	Levulinate (mmole)	Amino-N* (mmole)
Original sample	0.44	0.2
Passing solution through C.P. Resin column	0	0.19

2 ml of sample solution containing 0.44 mmole levulinate and 0.2 mmole of amino-N in a protein hydrolysate was applied to a column (1×6.6 cm) of C.P. Resin (100 mesh) equilibrated with the same buffer solution at a flow rate of 10 ml per hour.

* Estimated as L-glutamate by means of ninhydrin method.

9. レブリン酸, およびビルビン酸の C.P. 樹脂に対する吸着に及ぼす酢酸塩およびグリシンの影響について

前の実験で, pH 5.0 ではアミノ酸の共存により, C.P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着は全く影響を受けなかった. そこで中性ないしアルカリ性での影響を検討した. すなわち Table IV にその結果を示してあるが, 明らか

Table IV. Effect of Acetone and Glycine on the Adsorption of Levulinate and Pyruvate on C.P. Resin at pH 7.0

Experiment	Amount of keto acid adsorbed		Percentage of keto acid adsorbed	
	Levulinate (mmole)	Pyruvate (mmole)	Levulinate (%)	Pyruvate (%)
Control*	2.9	6.2	100	100
+Acetate** (2 M)	1.77	4.25	61	68.6
+Acetate (1 M) +Glycine (1 M)	—	1.65	—	37.8

* Reaction mixture consisted of 10 ml of 2 M phosphate buffer solution (pH 7) containing 1 M carbonyl compounds and 1 g of C.P. Resin (100 mesh) equilibrated with the same buffer solution, pH 7 and adsorption was carried out by incubating the above reaction mixture at 30°C for 60 min with stirring.

** Reaction mixture consisted of 10 ml of 2 M phosphate buffer solution containing 1 M carbonyl compounds and 2 M acetate and 1 g of C.P. Resin.

*** Reaction mixture consisted of 10 ml of 2 M phosphate buffer solution containing 1 M carbonyl compounds, 1 M acetate and 1 M glycine and 1 g of C.P. Resin.

に阻害的な影響があらわれた. この実験では対照としてレブリン酸, ビルビン酸各 1 M 溶液 10 ml を C.P. 樹脂 1 g に加え, さらに, それぞれ酢酸ナトリウム, グリシン (ビルビン酸に対してのみ) の終濃度が 2 M ないし 1 M になるように加えて温度 30°C, pH 7 (2 M-クエン酸緩衝液), パッチ法で反応させた. この表の示すように, レブリン酸, ビルビン酸各 1 M 溶液を C.P. 樹脂 1 g に対して吸着させる場合に, 2 M 酢酸ナトリウム共存下では共存しないときに比べて吸着がそれぞれ 40%, 30% 低下した. またグリシン, 酢酸ナトリウムが共存するとビルビン酸の C.P. 樹脂に対する吸着量は 60% 低下した.

この現象からアルカリ性ないし中性においては, 共存するカルボキシル基が C.P. 樹脂の酸ヒドラチッド基とイオンの反応してカルボニル基の吸着を妨げるものと思われる. また, ケト酸の pH-吸着曲線にみられるような特異的な傾向にも, おそらくカルボキシル基の影響が関係するものと考えられる. したがってアミノ酸と共存するレブリン酸の選択的吸着条件としては一般に弱酸性で行なう必要があろう.

要 約

各種カルボニル化合物を試料として, C.P. 樹脂に対し

する吸着および溶出について実験した。とくにレブリン酸について検討した。

(1) C.P. 樹脂を用いてレブリン酸をはじめとする各種カルボニル化合物の吸着反応を主にバッチ法で検討した。

(2) C.P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着は pH 4~5 が最適で、温度は 30°C ないし 40°C が良好であり、吸着平衡に達する時間は約 60 分であった。

(4) pH 4.4 における各種カルボニル化合物を C.P. 樹脂に対する吸着量の順に記すと次のとおりである。

アセトン>グリオキシール酸>ビルビン酸>>D-フラクトース>キシロース>レブリン酸>D-グルコース>α-ケトグルタル酸>>α-ヒドロキシフェニルビルビン酸。

(4) C.P. 樹脂に対するアセトン, ビルビン酸, α-ケトグルタルの至適 pH は、それぞれ pH 3~8, pH 7, pH 3 であった。

(5) アセトンとレブリン酸は吸着至適 pH の差を利用してカラム (pH 8) で分別するとレブリン酸が 80% 回収された。

(6) C.P. 樹脂に対するレブリン酸の吸着は Freundlich の吸着等温曲線にのった。

(7) C.P. 樹脂に吸着されたレブリン酸は酸およびアルカリによって溶出された。

(8) 蛋白質加水分解液中のレブリン酸 (0.44/2 ml) はカラム法で樹脂 3 g (pH 5) により 100% 吸着された。この際アミノ酸は吸着されなかった。

(9) C.P. 樹脂に対するレブリン酸およびビルビン酸の吸着は pH 7 において酢酸塩, グリシンの共存によって阻害的な影響を受けた。

最後に本実験に種々なる御援助をいただきました理化学研究所江本 栄氏, 並木和子氏, 味の素株式会社川崎工場長河村百合雄氏, 日野哲雄氏に対し深甚なる謝意を表します。また本実験に当り御援助をいただきました本教室高村義親氏に感謝いたします。

(この報告の要約は昭和 41 年度日本農芸化学会関東支部大会において講演した。)

- (1) S. Emoto, K. Namiki and M. Andō : *Sci. Pap. I. P. C. R.*, **53**, 256 (1959).
- (2) 並木和子, 江本 栄 : 農化, **35**, 566, 659, 878 (1961); **37**, 690 (1963).
- (3) 並木和子, 石川すず江, 江本 栄 : 日本農芸化学会昭和 39 年度大会講演要旨集, p. 131.
- (4) 並木和子, 貴志すず江, 江本 栄 : 日本農芸化学会昭和 41 年度講演要旨集, p. 80.
- (5) 並木和子, 江本 栄 : 日本農芸化学会昭和 42 年度講演要旨集, p. 195.
- (6) 黒野勘六 : 農化, **4**, 415 (1929).
- (7) 赤堀四郎 : 日化, **52**, 606 (1931).
- (8) 深井冬史 : 醸協, **30**, 169 (1935).
- (9) 木原 清 : 醸協, **16**, 919 (1938).
- (10) 市川邦介 : 醸工, **33**, 288 (1955).
- (11) 堀 信一, 加藤二郎, 日野哲雄, 溝口直正 : 農化, **31**, 17 (1957).
- (12) 上田隆蔵, 永井史郎, 森口繁弘 : 醸工, **37**, 9499 (1959).
- (13) 奥原 章, 横塚 保 : 農化, **35**, 447 (1961).
- (14) 野村罔夫, 上原潤二郎, 飯倉善二郎, 横塚 保 : 農化, **40**, 331 (1966).
- (15) L. F. Goodwin : *J. Am. Chem. Soc.*, **42**, 39 (1920).
- (16) T. Shimizu : *J. Biochem.*, **37**, 421 (1950).
- (17) H. Tauber and I. S. Kleiner : *Biochem. J.*, **99**, 249 (1932).
- (18) G. Bertrand : *Bull. Soc. Chim. Paris*, **35**, 1285 (1906).
- (19) L. Pentose and J. H. Quetel : *Biochem. J.*, **31**, 266 (1937).