

低温生物工学会誌〔Cryobiology and Cryotechnology〕, Vol.52, No.2, 77~81, 2006

[原著論文]

L-フェニルアラニンの界面前進凍結濃縮晶析

¹東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科, ²石川県立大学生物資源環境学科
顧 暁曄¹, 鈴木 徹¹, 渡辺 学¹, 宮脇 長人²

Progressive freeze-concentration-crystallization of L-phenylalanine

Xiaoye GU¹, Toru SUZUKI¹, Manabu WATANABE¹, Osato MIYAWAKI²

¹*Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology,
4-5-7kounan, Minato-ku, Tokyo 108-0075, Japan*

²*Department of Food Science, Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa
Prefectural University, Suematsu 1-308, Nonoichi, Ishikawa 921-8836, Japan*

Freeze-concentration-crystallization of L-phenylalanine was carried out by applying progressive freeze-concentration crystallization. Concentration effectiveness was affected by the advance rate of ice front and the stirring rate at the ice-liquid interface as expected by the concentration polarization model. When the concentration of L-phenylalanine reached the saturation concentration, it began to crystallize proving the feasibility of the simultaneous process of freeze concentration and crystallization. Crystals of L-phenylalanine thus obtained were needle-shaped and easily separable from the concentrated mother solution. The present method seems to be the best method for purification of such thermally unstable materials as medicines and food components. (Received Sept.17, 2006; Accepted Nov.9, 2006)

結 言

われわれはこれまで溶液内に1個の大きな氷結晶を成長させて凍結濃縮を行う界面前進凍結濃縮法 (progressive freeze-concentration) ^{1,2)}を提案してきた。

[Key words: Progressive freeze-concentration-crystallization, Concentration polarization model, ice crystals, L-Phenylalanine; 界面前進凍結濃縮晶析, 濃度分極理論, 氷結晶, L-フェニルアラニン]

この方法では、従来法である、系内に多数の氷結晶を生成することにより凍結濃縮を行う方法である懸濁結晶法(suspension crystallization)³⁾に比較して、システムの単純化・コスト低減化により凍結濃縮法の適用範囲を大きく拡大させることが期待されている。さらにこの新しい凍結濃縮法では、濃縮液相部分と氷結晶部分が完全に分離されるため、濃縮液相内で同時に溶質の晶析を行うことも可能であり、これにより新しい低温晶析法としての界面前進凍結濃縮晶析が可能となる。このような操作は、濃縮溶液中に氷結晶が混在する懸濁結晶法では原理的に不

(2)

可能である。

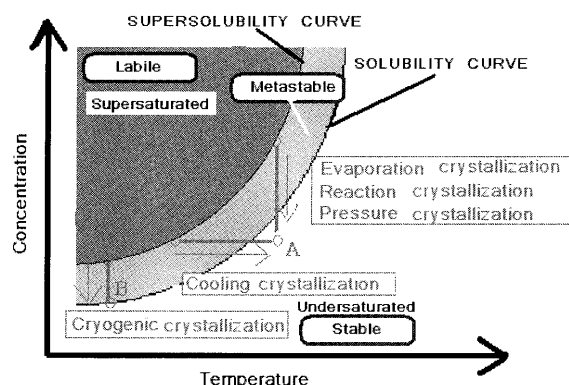


Fig. 1. Principles of crystallization.

晶析法には蒸発晶析，冷却晶析，反応晶析，圧力晶析，低温晶析などが知られている．それぞれの原理を Fig. 1 にまとめて示す．蒸発晶析は溶媒を気化することによる飽和度の変化を利用して晶析する方法で，晶析法の代表的手段であり，熱エネルギーを消費する⁴⁾．圧力晶析は圧力上昇によって系の溶解度を小さくして晶析するもので，必要な熱エネルギーは比較的小さいが，機械エネルギーが大きいことや，短時間に平衡に到達するため，系内の組成が不均一になる傾向がある^{5,6,10)}．反応晶析は反応により粒子を生成する操作であるが，反応速度により核発生や粒径分布が大きく変化するため操作制御が複雑である^{7,8)}．冷却晶析は溶解度の温度依存性を利用する方法であり単純であるが，熱エネルギー，機械エネルギーなどを多く消費するうえ，対象物質の溶解度の温度依存性による制約を受ける難点がある

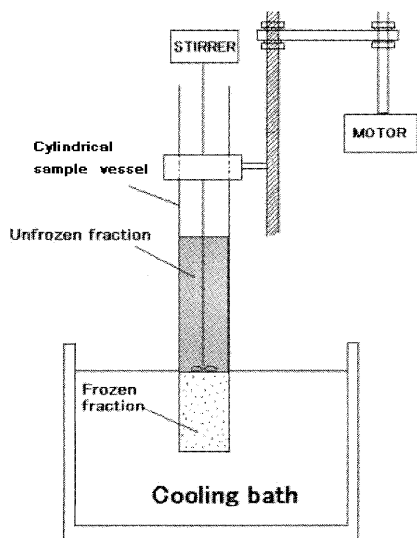


Fig. 2. Test apparatus for progressive freeze-concentration.

9,10)

これに対し今回提案する界面前進凍結濃縮晶析法は低温晶析法であるが，凍結濃縮することによって，対象物質を析出させる方法である．この方法では操作温度が晶析法の中で一番低く，濃縮段階での加熱の必要がなく，低温のまま濃縮ができるため，熱に不安定な医薬品，食品などの濃縮・精製への応用が考えられる．また凍結濃縮速度の制御によって過飽和度を維持し，晶析速度をコントロールすることも可能で，必要なエネルギーも小さく，生成した氷を氷蓄熱利用することもできる極めてユニークな晶析法である．

本研究においては L-フェニルアラニン を濃縮モデル物質とし，界面前進凍結濃縮晶析法における基礎的検討を加えることを目的とする．すなわちこの方法によって凍結濃縮液相から溶質の析出が起こりうるか否かの確認，また，得られた析出物の結晶形態と晶析操作条件との関連性について解析を加えることを目的とする．一般に，アミノ酸は合成法，抽出法，また発酵法等により工業的に生産されるが，いずれの製造方法においても，目的物質の単離精製のための晶析工程は，製品の品質に直接結びつくため最も重要な工程の一つである．本研究で用いる L-フェニルアラニンはアミノ酸の中でも溶解度が適当な範囲にあることから，これを試料として用いることとした．

材料および方法

晶析対象試料としては L-フェニルアラニン（関東化学(株)，特級）をそのまま室温で蒸留イオン交換水に溶解し， 0°C での飽和度（ $1.983\% \text{ g/g}$ ）¹¹⁾以下の水溶液を調製し，これを試料とした．実験には，これまでわれわれが凍結濃縮を目的として用いてきた Fig. 2 に示すような円筒形試料容器底面冷却方式の小型界面前進凍結濃縮実験装置^{1,2)}を用いた．本装置は底部がステンレス製の円筒状アクリル容器（内径 5cm，高さ 20cm）を試料容器とし，その中に試料溶液を入れ試料容器全体を冷却槽内の冷媒中に一定速度で徐々に降下させて，容器底面より氷結晶を成長させる．試料は底面からのほぼ次元伝熱により冷却されて凍結が進行する．また，凍結界面付近を攪

拌プロペラで攪拌することによって、固液界面における物質移動を制御できる構造となっている。

上記装置によって L-フェニルアラニン溶液試料 100ml を入れた円筒状試料容器を 0.5cm/h から 2.0cm/h の速度で -15°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) に制御された冷媒中に落とし込むことによって、容器底面から氷結晶を成長させた。また、凍結界面近傍での溶液相の攪拌は 216rpm, 370rpm, または 833rpm とした。適当な操作時間の後、装置の運転を止めて、氷相部と濃縮液相部を分離し、それぞれの相の L-フェニルアラニン濃度を分光光度計 (Hitachi 1100) により波長 260nm の吸光度において測定した。氷相部内の L-フェニルアラニン濃度は氷融解の後に測定した。一方、液相濃度測定において、濃縮溶液相内に晶析物がある場合、溶液相内の晶析物を濾過分離し、残りの溶液相の濃度を測定した。また晶析物を含む懸濁液全体の濃度は、サンプルに一定量の純水を加えて希釈、結晶を溶かしてから濃度を測定し、希釈前の凍結濃縮相の見かけ上の濃度、すなわち L-フェニルアラニン結晶が溶解していると見なした場合の溶液相の全濃度を算出した。

さらに、濃縮液から分離した直後の結晶析出物、さらにそれを室温で 24 時間乾燥したもの、および 105°C で 48 時間乾燥した試料の結晶状態を実体顕微鏡で観察した。

結果および考察

1. 析出の確認

Fig. 3 には 1.7% L-フェニルアラニン溶液を冷媒温度 -15°C 、容器降下速度 1cm/h、攪拌速度 833rpm の条件下で凍結濃縮晶析を行った際の溶液相、および氷相内の L-フェニルアラニンの濃度の推移を示す。氷結晶の成長に伴い凍結濃縮が進行しながら液相の溶質濃度は徐々に増加していることがわかる。凍結濃縮された L-フェニルアラニン溶液が飽和濃度 (液相の温度、 0°C で 1.98%) に到達すると、晶析を始め、その後、液相濃度は飽和濃度を維持することがわかった。破線上の白丸点は晶析で生成した結晶を溶解しているものと見なして計算した仮想溶液相内の溶質全濃度値である。また、全過程において、氷相内の溶質濃度は溶質の晶析に関わりなく低い値を示しており、氷相に取り込まれる L-フェニルアラニ

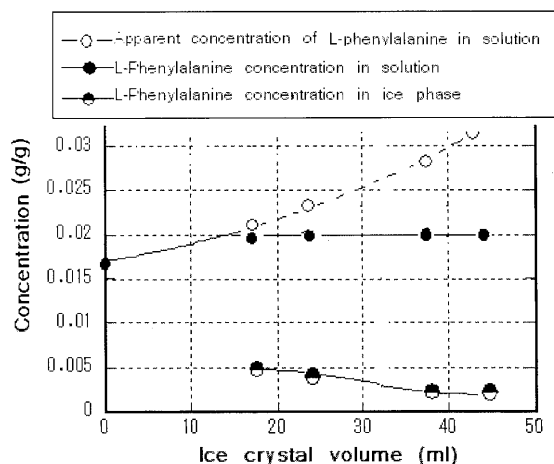


Fig. 3. Time course in the progressive freeze-concentration-crystallization of 1.7% L-phenylalanine solution.

ンの割合は低いことがわかった。

濃縮液から分離した直後の L-フェニルアラニン結晶は Fig. 4B に示すように、針状であり、液相からの分離性は良好であった。L-フェニルアラニンは、結晶多形を示すことが知られており、一水和物結晶の場合は針状の結晶形態をとるとされる¹²⁾。したがって、本装置で得られた結晶は L-フェニルアラニン一水和物結晶であると推察される。その析出結晶を室温で 24 時間乾燥すると、針状の一水和物の微結晶の集合体となり見かけ上粉末状を呈していた。

また、ろ過分離した直後の L-フェニルアラニン結晶を脱水せずにオープンで 105°C 、48 時間乾燥すると、Fig. 4C に示すように板状結晶となった。L-フェ

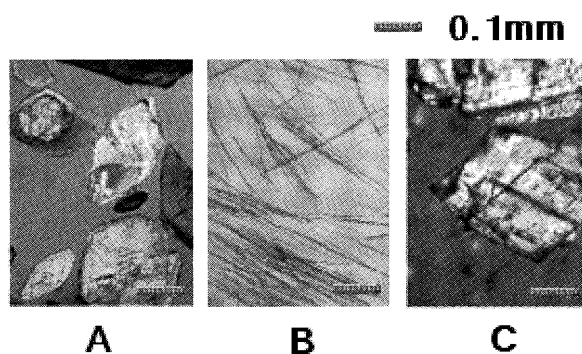


Fig. 4. Comparison of crystal form of L-phenylalanine (Phe).

- A, Commercial Phe of reagent grade;
- B, Phe just after freeze-concentration- crystallization;
- C, Phe dried for 48h at 105°C after freeze-concentration-crystallization.

(4)

ニルアラニンの市販試薬は、無水結晶で Fig.4A に示すような、板状結晶である。したがって、析出した一水和物結晶 L-フェニルアラニンは、オーブンで加熱乾燥する際、無水結晶に変化したものと推察される。L-フェニルアラニンの結晶転移温度は 37°C であることが知られている¹²⁾。しかし、結晶状態の詳細については本実験のみからは不明であり、今後 X 線回折などを組み合わせて検討する必要がある。

2. 攪拌条件の影響

Fig.5 は初期濃度 1.7~1.9%の L-フェニルアラニン溶液を攪拌速度 833rpm, 216rpm の2条件で凍結濃縮晶析を行った時の結果である。いずれの場合も冷媒温度は-15°C, 容器降下速度は 1.16cm/h に固定しており、従って攪拌速度のみの影響を比較することができる。凍結濃縮に伴う溶液相内の L-フェニルアラニン濃度の上昇率を比較すると、攪拌速度が大きい方が若干濃度上昇率が大きかった。これは Fig.5 に示すように攪拌速度が大きい方が、氷相に取り込まれた L-フェニルアラニン量が低いことに対応している。

また分離直後の針状結晶を観察すると、Fig.5 に示したように、攪拌速度の速い方の結晶の長さが短い傾向にあり、攪拌による機械的影響が原因であると考えられた。

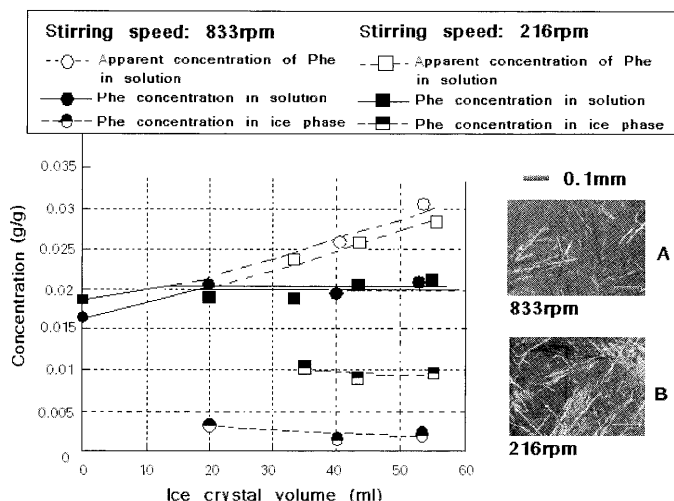


Fig. 5. Effect of stirring rate at the ice liquid interface on progressive freeze-concentration-crystallization of L-phenylalanine.

A: Phe crystals formed at stirring rate of 833rpm.
B: Phe crystals formed at stirring rate of 216rpm.

3. 容器降下速度の影響

Fig.6 は 1.79%の L-フェニルアラニン溶液を冷媒温度-15°C, 攪拌速度は 370rpm と一定条件で、容器降下速度だけを 1.94, 0.64cm/h と変えた場合の結果である。容器降下速度が遅い方が、氷相内の溶質 L-フェニルアラニン取り込み率は低く、従って溶液相内の濃度は高く、濃縮効率が良いことがわかる。また、針状結晶の形状に対しては特に容器降下速度による影響は見られなかった。

界面前進凍結濃縮法における濃縮過程での氷相内への取り込み、すなわち溶質の固液間分配現象に関しては、以下に示す界面濃度分極理論に基づく次式を用いて説明が可能である^{1,2)}。

$$K = K_0 / [K_0 + (1 - K_0) \exp \{-u / (aN^{0.2})\}] \quad (1)$$

ここに、K は溶質の固液間見かけ分配係数(=[氷相内濃度]/[液相内濃度])、u は凍結界面進行速度、N は攪拌速度、a は実験定数である。K₀ は凍結界面進行速度 u が無限小、または固液界面での物質移動係数が無限大のときの固液間見かけ分配係数で極限分配係数と呼ぶ。

式(1)より、界面前進凍結濃縮法における溶質の固液間見かけ分配係数 K は凍結界面進行速度 u と界面での攪拌速度 N に依存することが理論的に示される¹⁾。本実験系における界面前進凍結濃縮晶析においても、氷結晶相への溶質の取り込みは、氷結

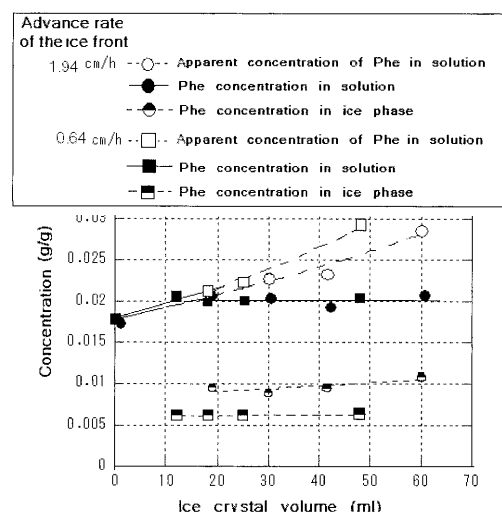


Fig. 6. Effect of advance rate of ice front on progressive freeze-concentration-crystallization of L-phenylalanine.

晶成長速度（容器降下速度）が小さいほど、また固液界面における攪拌速度が大きいほど、低くなることを示しており、このことは界面濃度分極理論による予測と一致している。

結 論

界面前進凍結濃縮法を応用して L-フェニルアラニンの凍結濃縮晶析を行った。L-フェニルアラニンの凍結濃縮効果は界面濃度分極理論に従い、氷結晶生成速度および固液界面における攪拌速度に依存して変化した。濃縮液中の L-フェニルアラニンは飽和濃度に達すると、結晶として析出を開始し、凍結濃縮と晶析を同時に行うことが可能であることが確認された。生成した結晶は針状結晶で濃縮母液との分離性は良好であった。本方式は加熱の必要性がないため、熱的に不安定な医薬品や食品成分の精製法として最適な方法であると思われる。

文 献

- 1) Miyawaki, O., Liu, L. and Nakamura, K.: Effective partition constant of solute between ice and liquid phases in progressive freeze-concentration, *J. Food Sci.*, **63**, 756-758 (1998)
- 2) Gu, X., Suzuki, T. and Miyawaki, O.: Limiting partition coefficient in progressive freeze-concentration, *J. Food Sci.*, **70**, E546-E551 (2005)
- 3) Huige, N. J. J. and Thijssen, H. A. C.: Production of large crystals by continuous ripening in a stirred tank, *J. Crystal, Growth*, **13/14**, 483-487 (1972)
- 4) 松岡正邦：融液晶析—精製晶析, 化学工学, **55**, 287-293 (1991)
- 5) 安田稔：圧力晶析法によるパラクレゾールの製造, 化学工学, **55**, 290-294 (1991)
- 6) 守時正人：短サイクルの圧力晶析法(新プロセスの開発・操作シリーズ-1-), ケミカルエンジニアリング, **25**, 63-66 (1980)
- 7) Garside, J.: Industrial crystallization from solution, *Chem. Eng. Sci.*, **40**, 3-26 (1985)
- 8) 柘植秀樹：反応晶析, 「最近の化学工学 43 晶析」, 化学工学会 編, 化学工業社, 東京, p.40 (1991)
- 9) Yu, K. M. and Douglas, J. M.: Self-generated oscillations in continuous crystallizers, Part I. Analytical prediction of the oscillating output, *AIChE J.*, **21**, 917-924 (1975)
- 10) 安田 稔：圧力晶析と冷却晶析, 「最近の化学工学 43 晶析」, 化学工学会 編, 化学工業社, 東京, p.148 (1991)
- 11) 須田 正己：フェニルアラニン及びチロシンの化学, 「アミノ酸シリーズ 第9集」, アミノ酸シリーズ編集委員会 編, 世界保健通信社, 大阪, p.24 (1968)
- 12) 川喜田 哲哉：食品産業におけるこれからの晶析技術, バイオサイエンスとインダストリー, **54**, 31-35 (1996)