応用糖質科学シンポジウム

Extraction of Intact Heteroxylan by Ionic Liquid and Its Structural Characterization*

イオン液体を用いた天然型キシランの抽出とその構造的特徴*

(2020年2月14日受付; 2020年2月27日受理)

高 相昊¹, 水野正浩^{1,2,*}, 河本啓太², 三森 亮²,
早川源矢², 天野良彦^{1,2}

(こさんほ, みずの まさひろ, こうもと けいた, みつもり りょう,
はやかわ げんや, あまの よしひこ)

Sangho Koh,¹ Masahiro Mizuno,^{1,2,*} Keita Koumoto,² Ryo Mitsumori,²
Genya Hayakawa,² and Yoshihiko Amano^{1,2}

¹ 信州大学大学院総合工学系研究科
380-8553 長野県長野市若里 4-17-1

² 信州大学工学部物質化学科
380-8553 長野県長野市若里 4-17-1

¹ Interdisciplinary Graduate School of Science and Technology, Shinshu University
4-17-1 Wakasato, Nagano, Nagano 380-8553, Japan

² Department of Materials Chemistry, Faculty of Engineering, Shinshu University
4-17-1 Wakasato, Nagano, Nagano 380-8553, Japan

要旨: 植物細胞壁中のキシランは、キシロースを構成単糖とする主鎖に対して、種々の側鎖や修飾基が付加された不均一な構造を有する分岐鎖多糖である。このような不均一な構造は、セルロースやリグニンなどの細胞壁中の他の成分との相互作用に重要な役割を担っているものと考えられている。一方、キシランは一般的にアルカリで抽出されることが多く、本来キシランにエステル結合を介して結合している修飾基などが脱離していることが多い。こうしたことから、植物細胞壁分解酵素の天然状態でのキシランの作用を考える際、本来の酵素活性を適切に評価できていない可能性がある。筆者らは、植物バイオマスがイオン液体 (IL) に溶けていく様子を偏光顕微鏡によって観察した際、セルロース繊維を被覆していたリグニンやキシランが溶解される現象を見出し、これをキシラン抽出及び分離法として応用した。IL 抽出法によって、アセチル基、フェルロイル基、クマロイル基などのエステル結合を介した修飾基、また、リグニンとの複合構造が残存した天然に近いキシランを抽出することに成功した。

キーワード: 植物細胞壁, イオン液体, 抽出, キシラン, リグニン-糖複合体***

1. はじめに

植物細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの主要成分から構成され、地球上で最大の炭素貯蓄源であり、植物バイオマスと呼ばれている。人類は、植物バイオマスを直接的な燃料や建築材料、紙パルプなどの資源として利用してきた。しかし、化石資源の枯渇が懸念される中、これまで以上に、植物バイオマスをより多様な用途に活用していくための技術革新が求められている。自然界の

循環系に目を向けてみると、光合成によって生産された植物細胞壁の大部分が、担子菌をはじめとする森林の微生物によって資化されており、この際に大きな役割を果たすが、菌体外に分泌される酵素である。このことを考えると、我々が植物細胞壁をバイオマス資源として上手く利用していくためには、酵素による細胞壁分解をより本質的に理解することが重要だと言える。筆者らの研究室では、植物細胞壁中の多糖類の利用を目的に、木材腐朽力が高い菌として単離された白色腐朽菌ウスバタケ (*Irpex lacteus*) が

* 本原稿は、日本応用糖質科学会 2019 年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

** 連絡先 (Tel. 026-269-5402, Fax. 026-269-5394, E-mail: m-mizuno@shinshu-u.ac.jp)

*** Key words: plant cell wall, ionic liquid, extraction, xylan, lignin-carbohydrate complexes

略記: IL, ionic liquid; [Emim][Cl], 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride; [Emim][OAc], 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate; [Emim][DEP], 1-ethyl-3-methylimidazolium diethyl phosphate; [Bmim][Cl], 1-butyl-3-methylimidazolium chloride; DMSO, dimethyl sulfoxide; FT-IR, Fourier-transform infrared spectroscopy; HPLC, high performance liquid chromatography; ASL, acid-soluble lignin; AIL, acid-insoluble lignin; Glc, glucose; Xyl, xylose; Ara, arabinose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; Fuc, Fucose; AcOH, acetic acid; CouA, *p*-coumaric acid; FerA, ferulic acid; SEC, size exclusion chromatography; Mw, molecular weight; GH, glycoside hydrolase; NMR, nuclear magnetic resonance.

図1. 植物細胞壁のキシランのモデル構造

キシラン主鎖に対する側鎖や修飾基の種類や頻度は植物起源によって大きく異なる。ここでは、イネ科植物に見出されるフェルロイルアラビノキシランを示した。

生産する糖質関連酵素の研究を進めてきた¹⁻⁷⁾。

ヘミセルロースの一つであるキシランは、主鎖を構成するキシロース残基に様々な側鎖や修飾基が付加された分岐鎖多糖である。例えば、キシロース残基の2位, 3位の水酸基には、アラビノースあるいは4-O-メチルグルクロン酸の側鎖付加や、アセチル基の付加が起こる。また、イネ科の植物などには、アラビノース側鎖にフェルラ酸やクマル酸がエステル結合している (図1)。これらの側鎖や修飾基の種類、置換頻度は植物の起源や組織によって大きく異なり、また、キシラン主鎖におけるこれらの分岐頻度は不均一であると考えられている^{8,9)}。分岐の少ない領域ではセルロースと相互作用し¹⁰⁾、分岐を多く含む領域ではリグニンとの共有結合によって直接的に架橋したリグニン-糖複合体 (lignin-carbohydrate complexes) を形成している^{11,12)}。これまで、キシランの側鎖や修飾基に作用する個々の酵素に関する多くの報告がなされており、純粋な合成基質や市販ベースでの多糖基質を用いた酵素学的な解析が中心に進められている。一方、自然界で起こる植物細胞壁の酵素分解では、多くの酵素の協奏的な作用によって、複雑な構造を有するキシランが効率的に分解されていると考えられるが、現時点では不明な点が多い。この理由の一つとして、解析に適した基質の選定が難しいことが挙げられる。例えば、キシランは一般的にアルカリ溶液で抽出されることが多いが、抽出過程で天然キシランに含まれるアセチル基やエステル結合によって複合化したリグニンは、エステル結合の加水分解によって脱離してしまう。このような基質では、天然のキシラン構造に対する本来の酵素活性を適切に評価できていない可能性がある。筆者らは植物細胞壁分解酵素の反応解析に用いる基質調製の重要性を認識し、これまでに、亜臨界状態の水を溶媒として用いた水熱処理によるヘミセルロース抽出法とその酵素分解性について報告してきた¹³⁻¹⁶⁾。本稿では、イオン液体 (IL) を用いたキシランの抽出方法と、得られた成分の構造的特徴について紹介する。

2. 植物バイオマス溶解性の高いイオン液体の選定

IL は、100 °C 以下で液体のカチオンとアニオンから構成される塩の総称である。2002 年に Rogers ら¹⁷⁾がセルロースの溶解性を示す IL を報告してからは、汎用有機溶媒に難溶なセルロースの化学分析や、化学修飾のための反

応溶媒として用いられるようになった。セルロースの溶解性を示す IL として、イミダゾリウムカチオンを有する 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ([Emim][Cl]) や 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim][OAc]) などが知られている。微結晶性セルロースの加熱処理では、IL に対する質量分率にして 8~14 wt% と高濃度にセルロースを溶解させることが可能であり¹⁸⁾、マイクロ波を照射すると最大で 25 wt% にまで達する¹⁷⁾。IL によるセルロースの溶解は、セルロース繊維が束となり形成される階層構造の解消によって引き起こされ、IL のアニオンがセルロース繊維間の相互作用の解離に重要であると考えられている¹⁹⁾。一方、IL に可溶化したセルロースは、水などの貧溶媒を添加することによって容易に再析出物として回収することが可能である。また、再析出した再生セルロースは、結晶形が I 型から II 型へと変化し、セルラーゼによる酵素分解性が顕著に向上することが報告されている²⁰⁾。こうしたことから、イミダゾリウム系 IL は、純粋なセルロースだけでなく、植物バイオマスの効率的な酵素糖化に向けた前処理溶剤としての利用も試みられている。

筆者らは、カチオンにイミダゾリウム骨格を有し、アニオンが異なる 5 種類の IL を用い、草本系バイオマスであるエリアンサスが、IL に溶けていく様子を偏光顕微鏡によって観察した (図2)²¹⁾。いずれの IL においても、処理時間とともに結晶性セルロースの露出による偏光面が観察された。中でも、[Emim][OAc] による溶解処理では、偏光面の露出が短時間で観察されることに加え、セルロース繊維が顕著に膨潤し、解繊していく様子が観察された。この特徴的な現象は、[Emim][OAc] がセルロース繊維を覆うように存在するヘミセルロースやリグニンを優先的に溶解させたためであると考えられた。これらの結果から、[Emim][OAc] をヘミセルロースやリグニンなどの細胞壁成分の抽出及び、分離に有効な手段として利用できるのではないかと考えた。

3. 植物細胞壁成分の抽出及び分離方法への応用

まず、エリアンサスの IL 処理によって抽出された細胞壁成分の回収を試みた。[Emim][OAc] への溶解成分の回収方法と、その際に得られた各画分の収率を図3に示した。原料濃度 3 wt%, 140 °C, 3 時間の溶解条件では、エリアンサスの 86.6 % が IL へと溶解した。この際、IL への未溶解物を遠心分離で残渣として回収し、これを R1 画分とした。R1 画分を DMSO によって十分に洗浄した液と IL に溶解した成分の混合液に対して、貧溶媒として脱イオン水を添加した。この際の再析出物を遠心分離で回収することで RE 画分を得た。原料からの RE 画分の収量は、乾燥質量基準で 35.9 % であり、R1 画分と合計しても半分の細胞壁成分が、IL を含む溶液中に未回収のまま溶解していると考えられた。次いで、この貧溶媒添加後の IL 溶解液

図2. イオン液体処理過程におけるエリアンサスの偏光顕微鏡像の観察
水野ら (2017)²¹⁾を一部加工転載.

図3. ILを用いたエリアンサスの溶解処理及び溶解成分の回収方法

図中に記載した収率は、原料の重量に対する回収された各画分の乾燥重量から算出した。

に含まれる細胞壁成分を回収するために、透析膜によってILを十分に取り除いた。この透析によりIL濃度が徐々に低くなっていく過程で、透析膜内に新たな析出物が生じた。これを遠心分離で回収した後、水不溶性の沈澱をD-P画分とし、上清に存在する水溶性成分をD-S画分とした。それぞれの回収率は、D-P画分で11.2%、D-Sで5.8%であった。

各画分に含まれるリグニンと多糖類の成分組成を比較した結果を表1に示した。ILに溶解した画分について着目してみると、RE画分には、リグニンはほとんど含まれて

おらず、多糖類についてはその88.0%がセルロースであったことから、セルロースは貧溶媒の添加によって優先的に析出することが明らかとなった。透析過程で沈澱したD-P画分には、リグニン量が27.0 wt%と多く含まれ、多糖類についてはその91.0%がキシランであった。D-S画分については、リグニンは10.8 wt%と少なく、多糖類についてはその64.6%がキシランであり、更にキシランの側鎖を構成するアラビノースが23.2%と多く含まれていた。これらの結果から、ILによる植物細胞壁成分の抽出では、IL溶解液の中からセルロースのみを少量の貧溶媒の添加に

表 1. IL 抽出法によって分画した各画分の成分組成

画 分	成分組成 (wt%)* ¹			多糖類の単糖割合 (%)** ³					
	ASL* ²	AIL* ²	多糖類* ³	Glc	Xyl	Ara	Gal	Rha	Fuc
エリアンサス	2.9 ± 0.4	17.5 ± 1.8	58.9 ± 0.9	59.1 ± 5.4	35.6 ± 1.9	4.8 ± 1.7	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1
R1	2.9 ± 0.4	47.2 ± 1.1	44.3 ± 0.6	45.2 ± 0.8	41.2 ± 2.4	13.1 ± 2.3	N.D.	N.D.	0.5 ± 0.1
RE	1.7 ± 0.2	3.6 ± 0.7	69.2 ± 0.6	88.0 ± 2.0	10.8 ± 1.0	0.7 ± 0.1	N.D.	N.D.	0.4 ± 0.5
D-P	5.4 ± 0.3	21.6 ± 0.5	57.3 ± 0.1	N.D.	91.0 ± 0.4	8.4 ± 0.3	N.D.	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
D-S	8.9 ± 2.5	1.9 ± 0.5	59.9 ± 1.2	6.8 ± 1.4	64.6 ± 3.6	23.2 ± 5.1	3.7 ± 1.4	0.4 ± 0.0	1.4 ± 0.1

*¹ 成分組成は、各画分の乾燥粉末 1 g 当たりのリグニン及び多糖類が占める重量の百分率で示した。*² クラークソン法によって分析したリグニン量を示した。ASL (酸可溶性リグニン: Acid-soluble lignin), AIL (酸不溶性リグニン: Acid-insoluble lignin)。*³ 多糖類の成分組成は、硫酸分解処理後の HPLC 分析によって検出されたグルコース (Glc), キシロース (Xyl), アラビノース (Ara), ガラクトース (Gal), ラムノース (Rha), フコース (Fuc) の定量値の総和で示した。単糖割合は、各種単糖が占める重量の百分率で示した。

よって再析出させることで、キシラン及びリグニンと容易に分画することが可能であること、また、その後に徐々に IL を取り除くことで水溶性の異なる 2 種類のキシラン成分 (D-S 及び D-P) を分離することが可能であることがわかった。この水溶性の異なる D-P 画分と D-S 画分の違いは、キシランの構造上の違いに基づくものと考えられる。

4. IL 抽出で調製したキシラン成分の構造的特徴

4.1 エステル結合を介した修飾基の構造

IL 抽出によって得られた水溶性の異なる 2 種類のキシランの構造的特徴を明らかにするために、赤外吸収スペクトルをフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) によって測定した。D-P 画分と D-S 画分のスペクトルには、糖の C-O 伸縮運動に由来する $1,045\text{ cm}^{-1}$ とリグニンの芳香環骨格振動に関連する $1,608$, $1,514$, $1,455\text{ cm}^{-1}$ のピークが確認された。更に、成分分析では得られなかった化学結合の情報として、カルボニル基の C=O 結合伸縮運動に由来する $1,745\text{ cm}^{-1}$ と C-O 結合伸縮運動に由来する $1,245\text{ cm}^{-1}$ のピークが観察されたことから、エステル結合の存在が示唆された (図 4)。このエステル結合に関係する二つのピークと芳香環骨格中の C-C 結合伸縮振動に由来する $1,608\text{ cm}^{-1}$ のピークは、D-P 画分と D-S 画分をアルカリ溶液によって処理することで消失した。以上の結果より、IL 抽出によって得られたキシランには、アルカリ抽出では加水分解されてしまうエステル結合が含まれることが明らかとなった。

次いで、キシランにエステル結合を介して修飾される成分の種類と含量を明らかにするために、D-P 画分と D-S 画分のアルカリ処理によって生じる酸性化合物を HPLC により分析した。その結果、酢酸及び、フェルラ酸、クマル酸が検出されたことから、IL 抽出キシランにはこれらの修飾基が結合状態で残存することが明らかとなった。D-P 画分と D-S 画分に含まれる各修飾基の定量結果とキシロース及びアラビノース残基に対する修飾頻度を表 2 にまとめた。アセチル基については、D-S 及び D-P 画分において若干の差はあるものの、修飾頻度はほぼ同程度であっ

図 4. FT-IR による D-P 画分及び D-S 画分に含まれるエステル結合の同定

KBr によって粉末試料を錠剤とし、 4 cm^{-1} , 100 回積算で 3 回測定した平均のデータを用いた。(A) D-P, (B) D-S の IR スペクトルを上段に示した。下段には、各サンプルに対してアルカリ処理 (1 M NaOH, 80°C , 3 時間) し、中和、脱塩後の IR スペクトルを示した。

た。フェルロイル基については、D-S 画分の方が修飾頻度としては D-P 画分よりも高いが、いずれも少量しか含まれていなかった。一方、クマロイル基については、D-P 画分の方が 4 倍高い修飾頻度であった。

4.2 リグニン-キシラン複合体の存在

IL 抽出キシランのリグニンとの結合について考察するため、リグニンの吸収波長を指標としたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC-UV) によって分子量分布を解析した (図 5(A))。D-P 画分及び D-S 画分の分子量分布はいずれ

表2. D-P 画分および D-S 画分のアルカリ処理によって生じる酸性化合物の含量

画分	酢酸		クマル酸		フェルラ酸	
	$\mu\text{mol/g}^{*1}$	モル比 ^{*2} (Xyl/AcOH)	$\mu\text{mol/g}^{*1}$	モル比 ^{*2} (Ara/CouA)	$\mu\text{mol/g}^{*1}$	モル比 ^{*2} (Ara/FerA)
D-P	189	18	62	5	6	132
D-S	124	22	39	20	9	85

*¹ 各画分の乾燥粉末重量当たりの各成分の物質質量. *² キシロース及びアラビノースに対する物質質量比 (mol/mol).

も、高分子領域 (Mw, $10 \sim 100 [\times 10^3]$) と低分子領域 (Mw, $1 \sim 7 [\times 10^3]$) の二つのピークに分離されたことから、分子量分布が異なるリグニン成分が存在していることが示された。次に、精製した GH10 β -1,4-エンドキシラナーゼによる酵素処理前後の SEC クロマトグラムを比較した結果、D-P 画分、及び、D-S 画分ともにキシラナーゼの加水分解反応後に、高分子領域のピークが完全に消失した (図 5(B, C))。これは、高分子領域ピークに含まれるリグニンが、単独で存在しているのではなく、キシランと結合していることを強く示唆するものである。この高分子領域の分子量範囲は、抽出方法や植物起源によっても異なるが、既報のイネ科植物由来のリグニン-ヘミセルロース複合体の平均分子量値 ($38 \sim 46 [\times 10^3]$)²²⁾と同程度であった。

5. おわりに

本稿では、植物バイオマスの前処理溶剤としても用いられる IL の溶媒特性を利用し、植物細胞壁成分を抽出、分離する方法について紹介した。これまでに、植物細胞壁を IL に溶解させた状態で NMR²³⁾や HPLC²⁴⁾に供することで、天然構造を明らかにしようとする報告例はある。しかし、IL をキシランの調製方法として提案したのは本研究が初めてである。今回得られたキシランは、エステル結合の開裂なしに、アセチル基やクマロイル基、フェルロイル基といった修飾基、更にリグニンとの複合状態を維持した細胞壁中での天然型構造に近いものであった。この天然型キシランを基質として利用することで、これまで困難であったリグニンとキシランの複合体に対する酵素の反応解析が可能になると考えられる。筆者らは、本抽出法で得られる天然型キシランを基質として、ウスバタケが生産する植物細胞壁分解酵素の解析を進めている。こうした研究を積み重ねていくことで、植物バイオマスの利活用に貢献できるものと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導して頂きました信州大学の鮫島正浩先生に厚く御礼申し上げます。分子量解析に関して、アドバイスをくださったストックホルム大学 Mika Henriki Sipponen 先生に感謝申し上げます。なお、本研究は、JSPS 科研費 (17K07874) の助成を受け行われた

図5. SECによるD-P画分及びD-S画分の分子量分布の解析

分子量分布は、リグニンの吸光波長である UV 280 nm を指標に分析した。カラムには TSK-gel GMHHR-N (7.8 mm I.D. $\times$ 300 mm, TOSOH Bioscience), 分子量の標準には、ポリスチレンを用いた。(A) D-P と D-S の比較, (B) D-P のキシラナーゼ処理前後での比較, (C) D-S のキシラナーゼ処理前後での比較。

ものです。信州大学大学院サステイナブルサイエティグローバル人材養成プログラムからは、学会への参加のための援助を頂きました。この場を借りて皆様の支援に御礼申し上げます。

文献

- 1) 西澤一俊： *Irpex lacteus* (ウスバタケ) セルラーゼの初期基礎研究の歩み. 富士経済附属阿部研究所研究報告, **97**, 1–14 (2004).
- 2) K. Nishizawa and Y. Hashimoto: Cellulose-splitting enzymes. VI. Difference in the specificities of cellulase and β -glucosidase from *Irpex lacteus*. *Archives Biochemistry Biophysics*, **81**, 211–222 (1959).
- 3) T. Kanda, Y. Amano, and K. Nishizawa: Purification and properties of two endo-1,4- β -xylanases from *Irpex lacteus*. *The Journal of Biochemistry*, **98**, 1545–1554 (1985).
- 4) Y. Amano, K. Nishizawa, R. Tokoo, and T. Kanda: Mode of action of two endo-1,4- β -xylanases from *Irpex lacteus* towards rice-straw xylan. *Mokuzai Gakkaishi*, **40**, 57–63 (1994).
- 5) H. Toda, S. Takada, M. Oda, Y. Amano, T. Kanda, M. Okazaki, and M. Shimosaka: Gene cloning of an endoglucanase from the basidiomycete *Irpex lacteus* and its cDNA expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **69**, 1262–1269 (2005).
- 6) H. Toda, N. Nagahama, Y. Amano, K. Nozaki, T. Kanda, M. Okazaki, and M. Shimosaka: Gene cloning of an cellulohydrolase II from the white rot fungus *Irpex lacteus* MC-2 and its expression in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **72**, 3142–3247 (2008).
- 7) S. Koh, S. Imamura, N. Fujino, M. Mizuno, N. Sato, S. Makishima, P. Biely, and Y. Amano: Characterization of an acetyl-xylan esterase from white-rot fungus *Irpex lacteus*. *Journal of Applied Glycoscience*, **66**, 131–137 (2019).
- 8) M.A. Kabel, H. van den Borne, J.P. Vincken, A.G.J. Voragen, and H.A. Schols: Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydrate Polymers*, **69**, 94–105 (2007).
- 9) B. Zhang, L. Zhang, F. Li, D. Zhang, X. Liu, H. Wang, Z. Xu, C. Chu, and Y. Zhou: Control of secondary cell wall patterning involves xylan deacetylation by a GDSL esterase. *Nature plants*, **3**, 17017 (2017).
- 10) N.J. Grantham, J. Wurman-Rodrich, O.M. Terrett, J.J. Lyczakowski, K. Stott, D. Iuga, T.J. Simmons, M. Durand-Tardif, S.P. Brown, R. Dupree, M. Busse-Wicher, and P. Dupree: An even pattern of xylan substitution is critical for interaction with cellulose in plant cell walls. *Nature Plants*, **3**, 859–865 (2017).
- 11) T. Watanabe and T. Koshijima: Evidence for an ester linkage between lignin and glucuronic acid in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**, 2953–2955 (1988).
- 12) T. Watanabe, J. Ohnishi, Y. Yamasaki, S. Kaizu, and T. Koshijima: Biding-site analysis of the ether linkages between lignin and hemicelluloses in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxidation. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**, 2233–2252 (1989).
- 13) S. Makishima, M. Mizuno, N. Sato, K. Shinji, M. Suzuki, K. Nozaki, F. Takahashi, T. Kanda, and Y. Amano: Development of continuous flow type hydrothermal reactor for hemicellulose fraction recovery from corn cob. *Bioresource Technology*, **100**, 2842–2848 (2009).
- 14) N. Sato, K. Shinji, M. Masahiro, K. Nozaki, M. Suzuki, S. Makishima, M. Shiroishi, T. Onoda, F. Takahashi, T. Kanda, and Y. Amano: Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from waste medium after mushroom cultivation by hydrothermal treatment with suitable pretreatment. *Bioresource Technology*, **101**, 6006–6011 (2010).
- 15) N. Sato, Y. Takano, M. Masahiro, K. Nozaki, S. Umemura, T. Matsuzawa, Y. Amano, and S. Makishima: Production of feruloylated arabinosaccharides (FA-AOs) from beet fiber by hydrothermal treatment. *The Journal of Supercritical Fluids*, **79**, 84–91 (2013).
- 16) T. Arai, P. Biely, I. Uhlikarivová, N. Sato, S. Makishima, M. Mizuno, K. Nozaki, S. Kaneko, and Y. Amano: Structural characterization of hemicellulose from corn cob in continuous flow type hydrothermal reactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **127**, 222–230 (2019).
- 17) R.P. Swatloski, S.K. Spear, J.D. Holbrey, and R.D. Rogers: Dissolution of cellulose with ionic liquids. *The Journal of the American Chemical Society*, **124**, 4974–4975 (2002).
- 18) J. Vitz, T. Erdmenger, C. Haensch, and U.S. Schubert: Extended dissolution studies of cellulose in imidazolium based ionic liquids. *Green Chemistry*, **11**, 417–424 (2009).
- 19) R.C. Remsing, G. Hernandez, R.P. Swatloski, W.W. Massefski, R.D. Rogers, and G. Moyna: Solvation of carbohydrates in *N,N'*-dialkylimidazolium ionic liquids: A multinuclear NMR spectroscopy study. *The Journal of Physical Chemistry B*, **112**, 11071–11078 (2008).
- 20) M. Mizuno, S. Kachi, E. Togawa, N. Hayashi, K. Nozaki, T. Itoh, and Y. Amano: Structure of regenerated celluloses treated with ionic liquids and comparison of their enzymatic digestibility by purified cellulase components. *Australian Journal of Chemistry*, **65**, 1491–1496 (2012).
- 21) 水野正浩：セルロースの高次構造改変とその酵素分解性の評価. 応用糖質科学, **7**, 10–15 (2017).
- 22) L. Yao, C. Chen, X. Zheng, Z. Peng, H. Yang, and Y. Xie: Determination of lignin-carbohydrate complexes structure of wheat straw using carbon-13 isotope as a tracer. *Bioresources*, **11**, 6692–6707 (2016).
- 23) K. Kuroda, H. Kimura, Y. Furuya, N. Nakamura, and H. Ohno: ¹H NMR evaluation of polar and nondeuterated ionic liquids for selective extraction of cellulose and xylan from wheat bran. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **2**, 2204–2210 (2014).
- 24) K. Kuroda, Y. Fukaya, T. Yamada, and H. Ohno: Molecular weight distribution of polysaccharides and lignin extracted from plant biomass with a polar ionic liquid analyzed without derivatization process. *Analytical Methods*, **7**, 1719–1726 (2015).

質疑応答

[質問] 農研機構・食品研究部門 山本和貴

再析出の際に脱イオン水を加えているが、どのように加えているか、また、その加え方が析出物の構造・組成に影響しないか。

イオン液体のアニオンと試料との反応性はわかっているか。

[回答]

脱イオン水の添加方法は、IL 溶解液に対してセルロースのみが析出する液量の水を、一度で混ぜ合わせるように加えています。添加方法の重要と要素として、添加する液量をコントロールすることが大事です。これ以上に過剰量の水を加えてしまうと、リグニンやキシランが析出するために析出物の組成は大きく変化します。

IL のアニオンは、セルロース繊維間に働く水素結合による相互作用の解離に効果があると考えられていますが、リグニンやキシランなどといった他の細胞壁成分溶解の際の詳細は不明な部分が多いです。

[質問] 東京大学 砂川直輝

イオン液体に溶解後、析出したセルロース主体の成分中に存在するアラビノースが少ないキシロース成分がセルロースに高いアフィニティーを持つキシラン成分と考えて良いのか？

また、これらセルロースに吸着するキシランはⅡ型セルロースにも吸着できると考えられるか？

[回答]

アラビノースによる分岐が少ないキシランが再析出した理由についての詳細は、現時点でははっきりとは述べるこ

とができません。ただし、セルロースとの相互作用による凝集と、キシラン自体の自己凝集による二つの要因があるものと考えています。キシランのセルロースへの吸着様式には、キシロピラノース2位, 3位の水酸基を介して、セルロースマイクロフィブリル表面の親水性面と相互作用するモデルが分子動力学的計算から提案されています。セルロースIIにおいても同様の様式で吸着できるものと考えられます。

[質問] 海洋研究開発機構 立岡美夏子

アセチル化度が0.2程度という値について実バイオマス中でその値で分布しているように考えてよいのか? 文献値との比較もあれば教えて頂きたい。

キシラナーゼで分解した際のアセチル化の影響はどのように考察しているか。

[回答]

アセチル基の量は、植物の起源、組織、抽出の方法に依存するため、正確な数の議論は非常に困難です。我々が調べる限りでは、今回用いたエリアンサスから得られたアラビノキシランのアセチル基の数を正確に測定した例はなく、比較することが難しいです。アセチル基の広葉樹由来のグルクロノキシランでは、キシロース100残基当たりに

一つの頻度程度と報告されていますので、今回の結果は、こうした結果と比べると、極少量であると言えます。

キシラナーゼの実験では、アセチルキシランエステラーゼとともに反応させ、影響を調べましたが、アセチル基の存在はキシラナーゼの主鎖分解効果にほとんど影響はありませんでした。

[質問] 農研機構・食品研究部門 徳安健

試料粉末の由来を絞ればいろいろな構造のキシランの存在意義の解明につながるのではないかと。

また、IL処理工程で出るすべての画分のキシロース残基を測れば、それぞれの画分のキシランの特性と存在比とを関連づけて議論できるのではないかと。

[回答]

ILは草本系細胞壁にのみならず、木質細胞壁も溶解させることが可能です。本手法を様々な植物に適応させることで、キシランの構造解明や多様性の理解につながっていくものと考えられます。IL処理工程で生じたキシランは、それぞれで分岐やリグニンとの複合構造など特性が異なっていました。それぞれの量を正確に測定し、構造解析を行うことで、天然での細胞壁中に存在する多様なキシランの構造の理解につながるものと期待されます。