蔬菜中の炭水化物に関する研究 (第5報)

Studies on the Carbohydrates in Vegetables (Part 5)

ヨモギ葉よりのセルロースの分離とヘミセルロースとの関係

Isolation of cellulose from the leaves of *Artemisia*
Capillaris and its relation to hemicellulose

(昭和42年9月7日受理)

榎 光 章 佐 藤 幸 夫
(Mitsuaki Maki) (Yukio Sato)

By availing oneself of solubility with the solvents, α -cellulose, β -cellulose and γ -cellulose were separated from *Artemisia Capillaris* helocellulose. The quantitative analysis gave the following results.

1. All these celluloses contained lignin, and α -cellulose, especially, had much of them. As their sugar components, glucose, xylose and galactose were detected in α -cellulose, and xylose and galactose in both β -cellulose and γ -cellulose. Glucose in α -cellulose was about 46%, the molecular ratio between xylose and galactose in each cellulose being 4:1, the same as hemicellulose.

2. In the extracts of each cellulose, by 50% alcohol including 1% NaOH or NaClO₂, xylose and galactose were detected as the hydrolysed sugars, their molecular ratio being 4:1. Xylose combining with lignin was also detected.

3. It was concluded that the hemicellulose was a kind of galactoxylan consisting of four parts of xylose and one part of galactose, at a uniform rate, combining with lignin.

緒 言

前報¹⁾でヨモギ葉よりヘミセルロースを分離検出して報告したのであるが、このヘミセルロースがリグニンを混有している事実からリグニンとの結合が問題視されるに至った。しかもヘミセルロースはセルロースの随伴物質として存在すると推定されており、従ってセルロースとヘミセルロースとの関係並びにリグニンとの結合状態を検索するために、ヨモギ葉よりセルロースを分離或は抽出して化学的性状を調査することにした。その結果セルロースはヘミセルロース、リグニン、その他成分を随伴していることが判明したのでこれら成績を報告する。

実 験

1. 供試料

米沢市松川畔で採集したヨモギ葉を蒸煮後竹簀に広げて天日乾燥し、粉碎器で粉末にした。この粉末をエタノール、ベンゼン (1:2) 混液でソックスレー抽出器を用いて熱時抽出して樹脂、色素などを除去し、これに5倍容の0.5% 蔞酸アンモニウム溶液を注加して沸騰浴上5時間、3回処理してペクチンおよび遊離糖類等を除去し、

熱水で十分洗滌後エーテルを加えて乾燥粉末化してホロセルロースを得た。これをセルロース分離の試料に供した。

2. 一般化学成分

常法に従って試料のホロセルロースを分析した結果は第1表に示す通りである。すなわちホロセルロースは25.88%のリグニン、35.94%の粗せんいとかから主として構成されているとみなされ、ヘミセルロースの主成分であるペントーザンが15.55%、それにセルロースとして α セルロース22.95%、 β セルロース5.05%、 γ セルロース0.75%でセルロースの含有量が案外少ない割りにリグニンの含有量が多い関係から、セルロースやヘミセルロースはリグニンと結合した状態にあるのではないかと推察された。

3. セルロースの分別

ホロセルロース20gを5倍容の5%苛性ソーダで30°C 48時間3回抽出して抽出液を除去し、次に5%苛性ソーダ溶液で沸騰浴上6時間3回抽出した残渣を稀塩酸および熱水でよく洗滌後乾燥させ、それに17.5%苛性ソーダを加えてときどき攪拌しつつ室温に1日放置し、遠心分離して上澄液を除去し、その残渣を1%塩酸で3~4回

第 1 表 ホロセルロースの化学組成 (無水物%)

粗 灰 分	4.33
粗 蛋 白 質	11.17
粗 セ ン イ	35.94
リ グ ニ ン *	25.88
α セ ル ロ ース **	22.95
β セ ル ロ ース **	5.05
γ セ ル ロ ース **	0.75
ペ ン ト ー ザ ン ***	15.55

(水分 1.59%)

* Klason—Ost 法²⁾

** 17.5%NaOH 法

*** 佐々木—Schmidt 法³⁾

液を換えながら煮沸処理を行ない、その後熱水で十分乾燥するとリグニンを含有する α セルロースが得られた。収率は22.95% (収量 4.59 g)。

17.5%苛性ソーダ処理汚液を醋酸で正確に中和してから、100°C に加温後冷蔵庫に放置して生ずる沈澱を遠心分離により集めた。この沈澱物が β セルロースであり収率5.05% (収量1.01 g)。

この β セルロースを除去した汚液を冷メタノール中に投入すると沈澱が得られ、これを遠心分離で母液と分け沈澱を冷水・50%メタノール・80%メタノール・エーテルの順に洗滌乾燥して白色の γ セルロースを得た。収率は0.75% (収量0.15 g)。

4. 各セルロース構成成分の検索

分離した各セルロース粉末に100倍量の2%硫酸を加えて沸騰浴上2時間加水分解を行ない、過剰の炭酸カルシウム末で中和後減圧濃縮乾固し、これを80%メタノールで抽出し、その抽出液を再び減圧濃縮したシラップについてペーパークロマトグラフを試みた。その結果は第2表に示す通りである。

特異的には α セルロースのみに多量のグルコースが、 β セルロースと γ セルロース両方にのみ極く少量のフルクトースが検出された。これより見て α セルロースはグルコースより構成されるセルロースとヘミセルロースの混在が、 β セルロースと γ セルロースはヘミセルロースを主成分として構成されていることが推定された。またRf 0.11 および 0.06 のスポットは汚紙切り法により再検出するに、多量のキシロースと少量のガラクトースが得られることから、これらを構成糖とするオリゴ糖であることは間違いないようである。

以上のペーパークロマトグラフの結果を精査する目的で次の実験を行なった。まず乾燥 α セルロース4gに無水醋酸1.5cc・氷醋酸15cc・濃硫酸1.6ccを加え、密栓してときどき攪拌しながら30°Cの恒温水槽中に5日間保持し、その後遠心分離して主としてリグニンおよびヘミセルロースである不溶解残渣を除去し、さらに5日間この温度に保持し、これを冷水1l中に攪拌しつつ投入した時生じた結晶を遠心分離で集め、水で3回、95%メタノールで3回、エーテルで3回洗滌乾燥し、白色の octacetyl cellobiose の結晶1gを得た。mp 210°C 汚紙より同様処理して製した octacetyl cellobiose と混融しても mp の降下を示さなかった。 CH_3CO 含有量は50.02%で理論値 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_{11}$ (CH_3CO)₈ として計算した50.74%と類似し、octacetyl cellobiose と化学的性質が一致したので α セルロース中に真のセルロースの存在することが認定された。

この octacetyl cellobiose 調製残渣に72%硫酸を攪拌しつつ加えて室温に一昼夜放置後、3lの冷水中に投入攪拌して酸濃度を低下させ、冷却器を附して沸騰浴上1時間加熱し、一昼夜放置してから遠心分離で集め、冷水・メタノール・エーテルの順で十分洗滌乾燥して黒色のリグニンを得た。これはアニリン反応・フロログシニン反

第 2 表 ペーパークロマトグラフによるセルロース構成糖類の検出

試料 \ Rf	α セ ル ロ ース	β セ ル ロ ース	γ セ ル ロ ース
加 水 分 解 物	0.28 卅	0.28 卅	0.28 卅
	0.18 卅	0.23 土	0.23 土
	0.16 卅	0.16 卅	0.16 卅
	0.11 +	0.11 +	0.11 +
	0.06 +	0.06 +	0.06 +
標 準 試 薬	キシロース 0.28	グルコース 0.18	
	ガラクトース 0.16	フルクトース 0.23	

汚 紙 : 東洋汚紙 No. 50 2×40cm

展開剤 : プタノール, 醋酸, 水 (4 : 1 : 2)

呈色剤 : アニリンフタル酸溶液, ナフトレゾルシントリクロール醋酸混液

第3表 セルロースの化学組成

	α セルロース	β セルロース	γ セルロース
全 糖*	78.05 %	80.92 %	87.71 %
ペントーザン**	25.02 %	62.86 %	67.82 %
全糖—ペントーザン	53.03 %	18.06 %	19.89 %
灰 分	3.16 %	6.43 %	5.25 %
リグニン***	15.98 %	1.76 %	0.95 %
そ の 他	2.81 %	10.89 %	6.09 %
全糖—ペントーザン ペントーザン		$\frac{1}{3.48}$	$\frac{1}{3.41}$

* ベルトラン法 (キシロースとして表示)

** 佐々木—Schmidt 法 (キシロースとして表示)

*** Klason—Ost 法

応が強陽性であり、水・稀アルカリ・稀酸・アルコール・エーテルに不溶で、灰分0.51%, OCH_3 含有量18.18%, このことから α セルロース中にリグニンの混有が認められた。

β セルロースと γ セルロースは共にヨード反応およびフエーリング反応を示さないが、アニリン反応・フログルシン反応は陽性を呈した。しかもこれら粉末を100倍量の2%硫酸で沸騰浴上2時間分解し、それに過剰の炭酸カルシウム末を加えて中和を行ない、減圧濃縮乾固させ、温メタノールで抽出し、その減圧濃縮液を40×40 cm の濾紙にスポットして展開させ、Rf 0.23, 0.16, 0.28の部分の濾紙切取法による熱水抽出、濃縮液にアルコールを加えてそれぞれの糖類を沈澱させフェニルオサゾンの形成を実施した。その結果 Rf 0.28 より mp 155°C のキシロースフェニルオサゾンを、Rf 0.23 より mp 158°C のフルクトースメチルフェニルオサゾンを、Rf 0.16 より mp 201°C のガラクトースフェニルオサゾンを検出した。このことより β セルロースおよび γ セルロースは多量のキシロース並びにガラクトースと少量のフルクトースを構成糖とする多糖類であることが確認された。

5. 各セルロースの構成成分の定量

各セルロース粉末について一般定量法に準じて分析した結果は第3表に示す通りである。

これによれば全糖量では γ セルロース> β セルロース> α セルロースの順をなし、ペントーザン量もこれと比例的に γ セルロース> β セルロース> α セルロースの順をなすが、灰分は β セルロース> γ セルロース> α セルロースの順をなし、その他の成分も同様な順序となり、リグニンは α セルロース> β セルロース> γ セルロースの順序をなした。 β セルロースと γ セルロースの糖成分は大部分がキシロースとガラクトースよりなることから、ペントーザン量はキシロース量と、全糖とペントーザン

量の差はガラクトース量とみなされ、キシロースとガラクトースの含有比は β セルロースでは3.48:1となり、 γ セルロースでは3.41:1となりヘミセルロースの割合と全く類似した。今 α セルロース中のペントーザン量をキシロース量とみなし、且つキシロースとガラクトースが3.4:1の比をなすとしてガラクトース量を計算すると7.36%となり、従って真のセルロース量は78.05—(25.02+7.36)=45.67%となった。いずれにしても α セルロースは他セルロースに比し、リグニンの含有が多いのが特長的であった。しかるに各セルロースの中では α セルロースが最も沈澱し易く、次に β セルロースであり、最も沈澱し難い性状を有するのが γ セルロースであった。しかも β セルロースと γ セルロースの分子形の大小がこのような差異を示すとも考察されるけれども、キシロースとガラクトースの含有比が同一である点から見ても分子形態の如何が溶解性を直接支配していると考え難く、むしろリグニンとの結合性にもとづく分子形態での物理化学的性質が強く影響しているのではなかろうかと考察した。

6. アルカリ抽出物および NaClO_2 処理物中のリグニン結合物の検索

3種のセルロースともリグニンを含有することは上記試験結果よりも明瞭であるので、そのリグニン除去の目的として次の実験を実施した。すなわち各セルロースを10倍量の50%アルコール1%苛性ソーダで冷却器を附して沸騰浴上1時間加熱抽出した。その濾液をアルカリ性のまま濾紙の一端にスポットし、水飽和ブタノール液で展開したもの3枚作り、その1枚はフェノールフタレインで検出した所原点のみで発色しアルカリは全然移動しないことが判明した。次の1枚をフログルシン塩酸溶液で検出するとRf=1(青紫色)0.08(淡赤紫色)に反応出現しリグニンの存在が判明した。最後の1枚をアニリンフタル酸溶液で検出すると、いずれのセルロース

からも $R_f=0.13$ (キシロース) 0.06 (ガラクトース) 0.01~0.02 (オリゴ糖) の 3 スポットを得た。そこで 6×40 cm の β 紙の一端にスポットして同様展開を行ない、 $R_f 1$ および 0.08 の部分の β 紙切り取り、アルコール性 1%苛性ソーダで抽出し、硫酸で中和を行ない蒸発乾固した。これを 72% 硫酸 0.5cc で 2 時間分解し、さらに 3% 硫酸に稀釈後 2 時間加熱して炭酸バリウムで中和し、その β 液を減圧濃縮乾固し、アルコールで抽出して再びペーパークロマトグラフにかけた。その結果 $R_f 1$ の部分からは糖が検出されず、0.08 の部分からは糖としてキシロースのみを検出すると共に $R_f 1$ の所がフロログルシンで赤紫色を呈示したが 0.08 の所に呈色がなかった。こうした事象より考察するに、最初アルカリのままで展開した時は $R_f 1$ にあったリグニンは糖と結合していないが、0.08 の部分は $R_f 1$ に上昇するリグニンとキシロースの両方から構成され、恐らく両者は化学的に結合していたと考えられた。最初の展開時に 0.08 に出現して上昇しない理由としては、キシロースは大分子量であり、キシランに小分子のリグニンが結合した形でキシランとしての性質が強くなったためではないかと想定した。

α セルロース粉末に 25 倍容の醋酸緩衝液 (pH 4.5) を加え、さらに原料の $1/2$ 量の NaClO_2 を注加して冷

却器附して沸騰浴上 30 分加熱し β 液と残渣とに区分した。 β 液にはアルコールを 10 倍量注加して生ずる沈澱を遠心分離で集め乾燥した。残渣および β 液についての分析結果は第 1 図に示す通りである。

各 β 液を 2% 硫酸溶液で加熱分解してペーパークロマトグラフにて成分を検索するに、キシロースとガラクトースの 2 種類の糖類が検出されるだけでグルコースの出現が見られない点から、 β 液 1・ β 液 2・残渣 2 はヘミセルロースまたはその分解糖で構成されていることが判明した。しかし NaClO_2 処理によりセルロース中に混入するリグニンとヘミセルロースの分離遊出が起こることを認知した。全糖—ペントーザンとペントーザンの比は大体ガラクトース：キシロースの割合を示すこととなり β 液 1 では 1:3.5、 β 液 2 では 1:2、残渣 2 では 1:4 となることより見てセルロース中に存在するヘミセルロースの構成糖類の割合と大体一致し、その結果ヘミセルロースの構成糖としてのキシロースとガラクトースは均一した割合にてヘミセルロースを構成しているのではないかと考案された。なお NaClO_2 処理でリグニンは 31.25%、全糖は 8.34%、ペントーザンは 20% 遊出することから、糖の割合に比しリグニンが多量除去される効果のあることが認められた。また β 液 1 および β 液 2 の濃縮液について前記同様ペーパークロマトグラフにて検出を試

第 1 図 α セルロースの NaClO_2 処理 α セルロース 2 g

全	糖	1.56 g (78.05%)
ペン	トーザン	0.50 g (25.02%)
リ	グニ	ン 0.32 g (15.98%)

25倍容の醋酸緩衝液 (pH 4.5) 注加,
原料の $1/2$ 量の NaClO_2 添加,
100°C, 30分間作用

 β 液 1

全	糖	0.13 g (8.34%)
ペン	トーザン	0.10 g (20%)
リ	グニ	ン 0.10 g (31.25%)

$$\frac{\text{全糖—ペントーザン}}{\text{ペントーザン}} = \frac{1}{3.5}$$

残渣 1

全	糖	1.43 g (91.6%)
ペン	トーザン	0.40 g (80%)
リ	グニ	ン 0.22 g (68.75%)

10倍量のアルコール注加

 β 液 2

全	糖	0.03 g (1.92%)
ペン	トーザン	0.02 g (4.0%)
リ	グニ	ン 0.02 g (6.25%)

$$\frac{\text{全糖—ペントーザン}}{\text{ペントーザン}} = \frac{1}{2}$$

残渣 2

全	糖	0.12 g (7.69%)
ペン	トーザン	0.08 g (16.0%)
リ	グニ	ン 0.08 g (25.0%)

$$\frac{\text{全糖—ペントーザン}}{\text{ペントーザン}} = \frac{1}{4}$$

みるに、キシロース・ガラクトース・リグニンとキシロースの結合物・オリゴ糖のスポットが得られ、しかも濾紙切り法でその部分の分解物を精査するに、オリゴ糖は主としてキシロビオース・キシロトリオース・キシロースと少量のガラクトースの結合物であることが判明した。こうした事象から考察するにヘミセルロースの主要糖はキシロースとガラクトースであり、恐らく多量のキシロース骨格に均一の割合（含有比が3.4:1であることよりモル比 4:1）にガラクトースが混合した構造をなし、こうした分子形態のヘミセルロースにリグニンが結合して存在し、そのため酸・アルカリの弱分解などによりキシロースがガラクトースよりも多く遊出し、しかも遊出割合が均一をなし、且つキシロースのみおよびキシロースとガラクトースのオリゴ糖の分解産物が得られるのではなかろうかと想定した。

7. 構成成分としてのウロン酸の検出

セルロース中にリグニン・ヘミセルロースの混在が認められ、それにリグニンとの結合が推定されるに至り、その結合の仲介としてウロン酸のカルボキシル基がエステル結合をなして関与しているのではなかろうかと予想されたので、各セルロースの加水分解物についてウロン酸の検出を試みた。即ちセルロース 0.2 g と 5%硫酸 10 cc を加えて2時間沸騰浴上加水分解を行ない、炭酸バリウムで中和後減圧濃縮し、一旦析出する炭酸バリウムを除去し、その濾液を減圧濃縮してシラップとなし、これに95%アルコールを加えて生ずるバリウム塩の沈澱を濾別した。かくして得られるアルコール液を再び濃縮し、ナフトレゾルシン反応・オルシン反応を検出したが陰性を呈示し、塩基性醋酸鉛反応もウロン酸特有の呈色を示さなかった。バリウム塩はアルコールで洗滌後少量の水に溶解してペーパークロマトグラフを試みた所ウロン酸の存在を認知できなかった。またウロン酸が存在すれば加水分解物中にアルドビュロン酸の検出が見られる

わけであるがこうしたものは得られなかった。こうした事象から、リグニンとヘミセルロースの結合にウロンの介在を考えることができないことが判った。

要 約

以上ヨモギ葉より溶解度の差を利用してセルロースを分別し次の結果を得た。

1. 構成成分の検索にて α セルロースはグルコースとキシロース・ガラクトースを構成糖とするヘミセルロースよりなるが、 β セルロースと γ セルロースはキシロース・ガラクトースのヘミセルロースを主成分となしそれに少量のフラクトースの存在を認め、且ついずれのセルロースもリグニンの含有を認知した。

2. α セルロースはリグニンが他に比し多く、真のセルロース量は約46%であり、 β セルロースおよび γ セルロースのキシロースとガラクトースの比は3.4:1で一致した。

3. 加水分解物にはウロン酸は検出されなかった。アルカリ或いは NaClO_2 処理による遊離液中には多量のリグニンとそれより遊離割合の少ないヘミセルロースが移行し、リグニンとキシロースの結合物・キシロースのオリゴ糖も検出され、ヘミセルロースの構造およびリグニンとの結合を推定した。

本研究は昭和42年7月22日日本農芸化学会東北支部例会で研究講演した。

文 献

- 1) 榎 光章, 佐藤幸夫: 本誌, 20, 452 (1968)
- 2) P. Klason: *Papier Chem.*, 53 (1908);
H. Ost, L. Wilkenning: *Chem.-ztg.*, 34, 461 (1916)
- 3) S. Sasaki: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 6, 538 (1930); E. Schmidt: *Cell. Chem.*, 11, 61 (1930)

(米沢女子短期大学)