〔農化 第 35 卷, 第 1 号, p. 80~83, 1961〕

リグニンと炭水化物との化学結合に関する研究 (第 9 報)*

結合物のクロマトグラフ上の挙動について

林

暁 (立命館大学理工学部化学科)

昭和 35 年 8 月 1 日 受 理

前報迄において、小麦藁から単離した各種試料はリグニンと炭水化物との結合物を含む事を示したが^(1~8)、試料中の全リグニン或は全炭水化物が果して結合しているかどうかは不明であった。これを確めるために溶剤による溶解度の差を利用して種々検討を行なっても明かな結果は得られなかった。

最近、佐藤、三川⁽⁹⁾は未晒亜硫酸パルプから抽出したリグニン炭水化物複合体を濾紙電気泳動により分別した結果、リグニンと炭水化物は異った挙動を示し結合していない事を報告している。また高橋、八浜⁽¹⁰⁾は、 γ 線照射木粉抽出物のペーパークロマトグラムから、同一挙動を示すリグニン炭水化物の存在を認めている。

筆者等も先にペーパークロマトグラム上の若干の位置でリグニンと炭水化物が共存する事を示したが⁽⁶⁾、本報においては小麦藁の 50% 酢酸抽出物及びジメチルホルムアミド (DMF) 抽出物につきペーパークロマトグラフを行ない、クロマトグラム上におけるリグニン炭水化物の挙動を調べ、更にその際の炭水化物の糖構成の変化を調べた結果を報告する。

実 験

I. 試料 前報⁽⁶⁾において調製した以下の試料を本実験に使用した。

ジオキサンリグニン	(メトオキシル基 17.42%)
50% 酢酸抽出物 (LCC)	(" 3.14%)
DMF 抽出物 A ₁ (DMF-A ₁)	(" 6.35%)

II. リグニン炭水化物結合物のペーパクロマトによる分離 各試料の溶液を作り、両端を更に細く引いたキャピラリーで 40 cm (長) × 20~30 cm (幅) の東洋濾紙 No. 51 または No. 527 につけ、試料の量は塗布前後のキャピラリーの秤量差から求めた。展開はブタノール-酢酸-水 = 4 : 1 : 5 (B-A-W)、ブタノール-エタノール-水 = 5 : 1 : 4 (B-E-W)、ピリジン-酢酸エチル-水 = 1 : 2 : 2 (P-EA-W) を使用し上昇法を用いた。

展開後クロマトグラムを横に 6 等分し、原線部から上に向かって 1, 2, 3, 4, 5, 6 区分とする。各区分は細切して共栓の試験管に入れ、30 ml の溶剤を加え時々振盪しながら 24 時間後濾過し、その一部をとり適当に稀釈後リグニンの定量を行なった。抽出液の他の一部を減圧下に溶媒を溜去し、72% 硫酸を加え 2 時間後 3% 濃度に稀釈し、4 時間加熱加水分解後還元糖を定量した。

第 1 図 ジオキサンリグニンの
検量線
(ジオキサン溶液 282 m μ)

III. リグニン炭水化物の定量法 リグニンはジオキサンリグニンを標準に選び、ジオキサン溶液の紫外線吸収から検量線を求め、他のリグニンも同一吸収を示すものとして定量を行なった。小麦藁ジオキサンリグニンの最大吸収は 282 m μ にあり、その検量曲線は第 1 図の通りである。

尚、クロマト未分別のリグニン炭水化物結合物の紫外線吸収より求めたリグニン含量は、Klason リグニン或はメトオキシル基の含量から換算した値よりも多少高い値を示し、LCC で 21.0%, DMF-A₁ で 41.0% であった。

炭水化物は硫酸加水分解液を苛性ソーダで中和後 Somogyi 法⁽¹¹⁾で定量、還元量はグルコースに換算して示した。

IV. ジオキサンリグニンの展開 ジオキサンリグニンの 2% ジオキサン溶液をつけ、1 週間水洗した No. 51 濾紙で B-A-W を用い展開後、6 等分したクロマトグラムをジオキサンで抽出してリグニンを定量した。そのリ

* Studies on the Chemical Combination between Lignin and Carbohydrate. Part IX.

Chromatographic Research of Lignin-Carbohydrate Complex.

By Akira HAYASHI (Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University)

第 1 表 B-A-W 展開による
ジオキサンリグニンの分布

区 分	リグニン(%)*
1 (原点)	17
2	2
3	3
4	3
5	9
6 (上端)	66
全回収率**	90

* 全回収率に対するリグニン分布の割合

** 各区分リグニンの測定値の和/供試試料

第 2 図 ジオキサンリグニンの
B-A-W による展開第 2 表 B-A-W 展開による LCC のリグニン, 炭水化物の
分布

測定 対象	区 分	未洗濾紙* (%)	水洗 2 日* (%)	水洗 7 日* (%)	水洗 7 日* 50% 酢酸 7 日(%)
リ グ ニ ン	1 (原点)	17	26	19	28
	2	11	19	16	21
	3	9	13	12	12
	4	10	9	11	11
	5	10	8	15	10
	6	43	26	26	18
	全回収率**	84	38	32	24
炭 水 化 物	1 (原点)	—	40	27	27
	2	—	14	15	19
	3	—	14	10	12
	4	—	12	12	14
	5	—	6	19	16
	6	—	14	17	12
	全回収率***	—	—	—	34

* リグニン或は炭水化物の全回収率に対する分布割合

** 各区分リグニン測定値の和/供試試料 (21% のリグニン含む)

*** 各区分炭水化物測定値の和/供試試料

第 3 表 B-E-W 展開による
LCC のリグニン, 炭水化物
の分布

区 分	リグニン (%)	炭水化物 (%)
1 (原点)	23	27
2	24	16
3	12	11
4	13	11
5	13	18
6 (上端)	15	18
全回収率	—	35

第 3 図 LCC の B-A-W に
よる展開
×……× 炭水化物 ○——○ リグニン第 4 表 P-EA-W 展開による
LCC のリグニン, 炭水化物
の分布

区 分	リグニン (%)	炭水化物 (%)
1 (原点)	39	32
2	16	15
3	9	14
4	6	6
5	5	15
6 (上端)	25	23

第 4 図 LCC の B-E-W に
よる展開
×……× 炭水化物 ○——○ リグニン

グニンの各区分への分布を百分率で示すと第 1 表の通りである。この際の各区分から抽出されたリグニンの量の和の供試全リグニンに対する比率をリグニンの全回収率とすると 90% であり, 分布の百分率をグラフに示すと第 2 図の通りである。

V. LCC の展開 LCC を 50% 酢酸に溶解し, 最初酸性である B-A-W で No. 51 濾紙を用いて展開した。展開後は各区分を 50% 酢酸で抽出し, リグニン, 炭水化物のクロマトグラム上での分布を測定した。

その際, 使用前の濾紙の予備洗滌が不十分であると, 紫外線吸収でリグニンと同様の吸収を示す物質が溶出しリグニンが多く出る。濾紙の予備洗滌法を変えた場合の各区分に対するリグニンの百分率及び全回収率並びに炭水化物の分布の百分率を示すと第 2 表の通りである。

水洗 7 日, 50% 酢酸洗 7 日を経た濾紙は大体満足な結果を与える事が分った。この条件下の濾紙のクロマトグラムの分布を第 3 図に示す。

次に展開剤を中性の B-E-W に変えて同様の実験を行なった。その結果は第 3 表及び第 4 図に示す。

更に展開剤をアルカリ性の P-EA-W に変えると第 4 表, 第 5 図の通りになる。

VI. LCC 中のウロン酸の定量 上記クロマトグラフ実験の際のデーターから分る通り, LCC 中のリグニン含量は紫外線吸収値から 21%, 炭水化物の回収率/供試 LCC=約 35% であり, 尚 40% 以上が未知である。今ウロン酸の定性反応⁽¹²⁾を行なうとプラスであり, LCC 中のウロン酸の定量⁽¹³⁾を行なうと 22.1% 存在した。しかし尚 $100 - (21 + 35 + 22) = 22\%$ は未知である。

VII. DMF-A₁ の展開 DMF-A₁ は DMF に溶解し, 水 50% 酢酸洗滌済の No. 51 濾紙を用い B-A-W で展開し, クロマトグラムは DMF で抽出した。その結果が第 5 表及び第 6 図である。

DMF-A₁ のウロン酸定性反応は不明瞭であり, 定量は試料少く行なえなかった。その結果 $100 - (41 + 43) = 16\%$ は未知であり, もしウロン酸が存在したとするとこの中に

図 5 LCC の P-AE-W による展開
×……× 炭水化物 ○——○ リグニン

第 5 表 B-A-W 展開による DMF-A₁ のリグニン、炭水化物の分布

区 分	リグニン (%)	炭水化物 (%)
1 (原点)	48	25
2	19	16
3	9	13
4	8	11
5	8	21
6 (上端)	7	14
全回収率	41	43

図 6 DMF-A₁ の B-A-W による展開
×……× 炭水化物 ○——○ リグニン

い事が分っているから、原点以外の炭水化物はリグニンと結合しているためにリグニンの移動性によって上昇したと考えるのが妥当である。またリグニンに就て考えると LCC, DMF-A₁ 中のリグニンがジオキサンリグニンと全く同一とは断定できないが、似た性質をもつものと仮定すると最上端まで上昇し得るリグニンが炭水化物と結合した為に移動性が減じ、中間の区分にも比較的均一に分散したものと考えられる。即ち易動性のリグニンと難動性の炭水化物の結合物と考えて眺めると第 3~6 図の分布図が理解できる。しかし全く或は殆ど移動を示さぬ原点に残る部分については以上の様な考え方をそのまま当てはめることに疑問が生ずる。しかし原点部におけるリグニン対炭水化物の組成比はどのクロマトグラムにおいても他の易動性の区分の比率と殆ど変りなく、更に LCC の場合についてみると展開剤を酸性 (B-A-W)、中性 (B-E-W)、アルカリ性 (P-AE-W) と変化しても、尚且つその比率分布に変化がない事は、リグニンと炭水化物は矢張り結合している事を暗示している。

このように展開により生ずる各区分におけるリグニンと炭水化物の比率は比較的一様であるが、その炭水化物の糖構成の内容については必ずしも一様でないことが第 6 表より分る。即ち第 1, 2, 3 の下半分の区分ではアラビノース、ガラクトースが多く、従って LCC 中に散在したウロン酸も恐らくこの部分に大部分存在し、所謂アラボガラクトタン、ペクチン物質に近いような組成のヘミセルロース部分が存在しているように思われる。このことは先に小麦藁の水抽出を行なった際にヘミセルロースとリグニンが相共に抽出されたことからその可能性

第 6 表 B-A-W 展開による LCC, DMF-A₁ 構成糖類の分布

試 料	LCC						DMF-A ₁					
	1 原点	2	3	4	5	6 上端	1 原点	2	3	4	5	6 上端
糖 類												
キシロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
アラビノース	+	+	±	±	±	±	+	+	+	+	±	±
グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ガラクトース	+	+	±	—	—	±	+	+	±	—	—	±

含まれる。併しその量は後報する如く電導度滴定で殆ど滴定できぬ程の少量である⁽¹⁴⁾。

VIII. 展開区分中の糖構成 LCC, DMF-A₁ 試料を No. 527 (厚手)

濾紙で B-A-W で展開し、抽出後各区分共加水分解を行ない、イオン交換樹脂を通して後 P-EA-W で下降法展開を行ない、*o*-aminodiphenyl で発色させて構成糖の定性試験を行なった。その結果を第 6 表に示す。

考 察

ジオキサンリグニンを酸性の展開剤 B-A-W で展開すると、クロマトグラム上には原点と最上端に最も濃い着色が認められ、その分布は第 2 図に示す如く最上端 (第 6 区別) に約 2/3 量が上昇し、原点 (第 1 区分) に残る部分がそれに次いで多く出ている。そして中間には殆ど存在しない事が分る。この事はジオキサンリグニン中には少くとも 2 群に分ち得る違った性質をもつ部分が混合しており、この差は多分子量の差に基くものでないかと考えられる。

一方リグニン炭水化物の結合物と思われる LCC, DMF-A₁ では、原点 (第 1 区分)、最上端 (第 6 区分) の外に $R_F = 0.15 \sim 0.20$ 附近 (第 2 区分、時によっては第 1 区分にかかる事あり) にも着色点が認められる。そして第 3~6 図に示される如くリグニン、炭水化物の分布も第 2 区分でも相当に高く、原点を除く他の区分にも比較的均一に分布し、何れの試料、何れの展開法でもリグニンの分布と炭水化物の分布が甚しく喰違うような事は認められない。

これ等の展開に用いた展開剤は何れも通常糖類の分離に用いる組成のものであり、上昇法の場合遊離の単糖類があっても精々 R_F は 0.3 以下であり、2 糖類或はそれ以上の寡糖類は遙かに少い R_F しか示さない。LCC, DMF-A₁ 中には *o*-aminodiphenyl で発色する様な遊離の単糖類、寡糖類は含まれない

が裏書きされる⁽¹⁾。上半分の区分ではキシロースとグルコースが主な構成糖であり、この両者は常にリグニンと共に存在する主要糖類である事が分る。従って従来からキシロースがリグニン炭水化物において最も主要な役割を演じていると考えられていたが、本実験の結果からキシロースの役割は依然として重要である事が認められる。

尚 LCC, DMF-A₁ (DMF-A₁ のウロン酸は未定量) 共に炭水化物リグニンウロン酸の定量値の和が 100% に達せず、これは加水分解不十分の為か或は未知物質の混在の為か目下の処不明であるが、恐らく複雑な多糖類の存在の為に本実験で用いた条件では加水分解不十分の結果と推定される。

要 約

以上の実験結果から筆者の実験に用いた小麦藁 LCC, DMF-A₁ の試料中のリグニン、炭水化物は殆ど全部が化学的に結合していると推定できる。

本実験に就き種々御教示戴いた京都大学農学部教授館勇博士に厚く御礼申上ます。

(1) 林 暁, 館 勇 : 本誌, 30, 442(1956).	(9) 佐藤孝一郎, 小林晃夫 : 第 4 回リグニン化学討論会講演要旨集 (1959).
(2) 林 暁, 館 勇 : 本誌, 30, 445(1956).	(10) 高橋節夫, 八浜義和 : 日本化学会第 13 年会講演要旨集 (1960).
(3) 林 暁, 館 勇 : 本誌, 30, 448(1956).	(11) M. Somogyi : <i>J. Biol. Chem.</i> , 160, 61 (1945).
(4) 林 暁, 館 勇 : 本誌, 30, 791(1956).	(12) B. Tollens : <i>Ber.</i> , 41, 1788 (1908).
(5) A. Hayashi, I. Tachi : <i>TAPPI</i> , 41, 173A (1958).	(13) B. L. Browning : <i>TAPPI</i> , 32, 119 (1949).
(6) 林 暁, 館 勇 : 本誌, 33, 806(1959).	(14) 林 暁 : 本誌, 35, 83 (1961).
(7) 林 暁, 館 勇 : 本誌, 34, 462(1960).	
(8) 林 暁, 館 勇 : 本誌, 34, 466(1960).	

[農化 第 35 卷, 第 1 号, p. 83~85, 1961]

リグニンと炭水化物との化学結合に関する研究 (第 10 報)*

Phenol- β -glycoside 結合の存在について

林 暁 (立命館大学理工学部化学科)

昭和 35 年 8 月 1 日 受 理

前報⁽¹⁾において以前に筆者等の単離した小麦藁からの 50% 酢酸抽出物 (LCC), ジメチルホルムアミド抽出物 (DMF-A₁) が, クロマトグラフ的な研究から大部分化学的に結合していると推定できることを示した。またリグニンと炭水化物との間の結合様式については, さきに酢化物 (アセチルキシロリグニン) の場合について phenolglycoside 結合が少くとも一部には存在することを示した⁽²⁾。併し酢化物についてはアセチル基の存在が種々の実験考察の障害となり結果を不明瞭にした嫌いがあった。

本報においては LCC, DMF-A₁, DMF-A₂ のリグニン炭水化物結合物について, 溶液状態におけるアルカリ処理, アルカリ性加熱下におけるセルロースへの transglycosidation, β -glycosidase による加水分解の実験を行ない, 何れも phenolglycoside 結合の存在を支持する結果を得たので報告する。

実 験

I. アルカリ加水分解 以前の報告⁽³⁾において, 小麦藁のアセチルキシロリグニンはアルカリ性溶液中においてリグニンと炭水化物との結合は比較的容易に開裂し, 且つ遊離のフェノール基が増加することを示した。そしてその際大体 2 日後にフェノール基の増大は止まり, 後は殆ど変化しなかった。

本実験に使用した LCC にはウロン酸が約 22% 存在する事が分っており⁽⁴⁾, ウロン酸を介してリグニンの水酸基がエステル結合をしている可能性も考えられる。このようなエステル結合の可能性については Sarkar⁽⁴⁾, Havris⁽⁵⁾, 山森, 館⁽⁶⁾等の実験が報告されている。従ってアルカリ処理後の試料について電導度滴定による弱酸

* Studies on the Chemical Combination between Lignin and Carbohydrate. Part X. The Existence of Phenol- β -glycosidic Bond.

By Akira HAYASHI (Department of Chemistry, Faculty of science and Engineering, Ritsumeikan University)