キシラナーゼによるキシラン含有天然物から

キシランの加水分解抽出について*

(1) 前処理によるキシランの易分解化

日下部 功, 安井恒男, 小林達吉

(東京教育大学農学部木材糖化研究施設)

昭和 50 年 10 月 31 日 受理

Enzymatic Hydrolysis-extraction of Xylan from Xylan-containing Natural Materials

(1) Increase in Susceptibility for Enzymatic Action of Native Xylan in Natural Materials with Pretreatment (Studies on Xylanase System of *Streptomyces* Part V)

By Isao KUSAKABE, Tsuneo YASUI and Tatsuyoshi KOBAYASHI

Laboratory of Wood Hydrolysis and Fermentation, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Education, Komaba-cho, Meguro-ku, Tokyo

Xylan contained in natural raw materials is known to be resistant to the action of xylanase. This report describes methods to make the xylan susceptible to enzymatic action.

After the raw materials containing xylan had been previously treated with dilute-alkaline solution or with cooking, the xylan became easily hydrolyzable and was readily hydrolyzed and extracted by using a solution of xylanase derived from *Streptomyces* sp. E-86. This pretreatment with alkaline solution was found to be applicable to a variety of raw materials such as corncobs, rice straw, oat hulls, hardwoods and so on.

The hydrolyzates prepared from these materials with the crude xylanase solution were mainly composed of xylose residues, accompanied with a small amount of arabinose, glucose and other residues. When purified preparations which possess no or low cellulase activity were used, the hydrolysis-extraction of xylan was effectively performed and the amounts of glucose in the hydrolyzates decreased markedly. Hydrolysis products obtained from corncobs mainly consisted of a large amount of xylose and xylobiose, accompanied with an appreciable amount of arabinose-containing xylooligosaccharides.

After steeping in NH_4OH solution, washing with water and the hydrolysis-extraction with xylanase, followed by the dilute-acid hydrolysis, 189 g of crystalline xylose was obtained from 1 kg of corncobs (pentosan : 333 g). (Received October 31, 1975)

緒 言

著者らは、酵素水解によるキシランの利用、キシラナーゼの応用などを目的として研究を進めており、まず土壌よりキシラナーゼの強力な微生物を検索し、多くの糸

* *Streptomyces* 属の xylanase 系に関する研究 (第 5 報).

状菌、放線菌および細菌を分離した。このうち、放線菌の酵素はキシランを速やかに、かつ高濃度で可溶化する能力を持ち、その分解終産物はキシロースとキシロビオースであった。われわれは、これらの特性を利用して、広葉樹不溶性キシランからキシロビオースの調製⁽¹⁾、キシロオリゴ糖の有効な調製法⁽²⁾、希酸水解との併用によるキシロースの調製法⁽³⁾などを考案し、すでに発表した。

キシランはセルロースや澱粉につき自然界に広く、かつ多量に存在する多糖類であるが、これら天然に存在する天然物キシラン*は、酵素に対し著しい抵抗性があるため酵素作用をうけにくく、天然物キシランの酵素水解による利用は、ほとんどかえりみられなかった。それでこれまでにこなされてきたキシランの酵素水解やキシランの利用に関する研究、キシラナーゼの研究などは、すべて天然物のアルカリ抽出などでえられる抽出キシラン**についてのみにあつて、われわれの前記研究結果もすべて同様であつた。

しかし、著者らはキシラン含有天然物を、キシランが溶出しない程度の希アルカリ溶液処理、あるいは高温湿熱処理することにより、それらに含まれている天然物キシランが易分解化され、キシラナーゼにより容易に加水分解抽出***される事実を発見した。この方法を用いれば、濃いアルカリ溶液によってキシランを抽出する必要がない。

従来、天然物中のキシランからキシロースをうるための工業的加水分解は、酸水解で行なわれていたが、この方法は、キシロース系成分以外の成分も可溶化され、水解液中に2次的副生物が生じ、さらに、装置は耐酸性が要求されるなどの難点があつた。しかし、酵素法は特異性が高く、目的とするキシロース系成分のみが水解抽出され、糖液の精製も容易で、装置の材質的要求もないなどの利点がある。

本報では、まず前処理により多種類の天然物キシランが酵素易分解化される事実、前処理の方法について述べ、さらに多くのキシラン含有天然物試料の糖組成、前処理試料の酵素水解抽出液の糖組成、酵素液中のセルラーゼの影響、この方法を用いて実際に corncobs (トウモロコシ穂軸) からキシロースを調製した実験例などを述べる。

* 天然物キシラン：キシラン含有天然物中に存在し、そのままでは水で抽出されず、後述の抽出キシランに対して、天然物キシランと呼ぶ。

** 抽出キシラン：キシラン含有天然物（木材や農産廃物など）から、濃いアルカリ溶液などで抽出した後、種々の沈殿法などで精製したキシラン。

*** 加水分解抽出：前処理後の天然物キシランは、キシラナーゼで容易に加水分解され、キシロースやそのオリゴ糖類として抽出されるので、著者らは便宜的に加水分解抽出または水解抽出と呼ぶ。

実験材料および方法

1. 酵素液

a. 粗酵素液：土壌から分離した *Streptomyces* sp. E-86 の培養濾液で、既報⁽¹⁾のごとく調製した。このキシラナーゼ活性は 120 units/ml であり、活性の測定はすでに記載された方法⁽²⁾に従い、還元力の増加から測定した。なお、本実験で使用した酵素液は、すべて同一バッチで調製されたものであつて、これを凍結保存し、用時に融解して使用した。

b. 精製酵素：粗酵素液を約10倍に濃縮し、DEAE-セファデックス-セルロース（重層カラム）の通過液を、QAE-セファデックスによるクロマトグラフィーで精製した。この標品は超遠心分析で単一なパターンを示し⁽⁴⁾、セルロース粉末（東洋濾紙 cellulose powder, 300 mesh）の分解活性は認められなかった。酵素精製の詳細については、次報で述べる。

2. キシラン含有天然物

使用した試料は、Table I に示すとおりであるが、いずれも風乾後、corncobs は径 1~5 mm に粉碎、木材は大鋸屑、稲わらやイ草は 5~10 mm に切断したものを、また綿実セリ、oat hull などは粉碎せずにそのまま実験に供した。

3. 糖の分析

a. 試料の加水分解：乾物 270~300 mg を乳鉢にとり、72% 硫酸 3.5 ml を加え、30°C で 40 分~1 時間ねり、泥状にした。水を加え硫酸濃度を 4% に調整し、100°C、2 時間 30 分加水分解した。放冷後定容とし、東洋濾紙 No. 5 c で濾過した。

b. 糖の定量：ペントース（ペントサン）の定量は、キシロースを標準物質とし、オルシン-塩化鉄-塩酸法⁽⁵⁾、還元糖の定量はソモギー法⁽⁶⁾で行なった。

c. ガスクロマトグラフィー (GLC)：酸加水分解後の糖液は、BaCO₃ で中和。遠心分離後、上澄について、Borchardt ら⁽⁸⁾の方法に準じて中性糖の測定を行なった。

d. ペーパークロマトグラフィー (PPC)：すでに報告した方法⁽⁷⁾に従い、ブタノール：ピリジン：水 (6:4:3) を用い、上昇法で2回展開し、発色剤は *p*-アニジン塩酸塩を用いた。

4. 前処理およびキシランの水解抽出 試料に 4~15 倍量のアルカリ溶液を加え、30°C、1 日、または 5 日間浸漬した後（1 日、1~2 回攪拌）、固液分離した。

液部は、前処理で溶出したペントサンの定量に用いた。一方、固形物はアルカリの反応が消失するまで水洗し、バスケット型遠心濾過機で脱水した後、酵素によるキシランの水解抽出の実験に用いた。

水解抽出の方法は、1.5 l 丸底円筒容器に、長さ約 7 cm のプロペラ翼が 2 段ついた糖化試験器に、試料（上記水洗した固形物または無処理試料）と酵素液を入れ、200~300 rpm で攪拌し、pH を 5.6~5.8 に調整しつつ、55°C で所定の時間反応を続けた。固液分離後、液部については直接還元糖および全還元糖（4% 硫酸で加水分解後）を定量し、全糖/直糖値を平均重合度 (D.P.) とした。水解抽出率は、用いた試料中の全ペントサン量に対し、水解抽出で得られたペントサン量の百分率で表わした。なお、前処理および水解抽出の条件は、Table II に示した。

実験結果

1. キシラン含有天然物の糖組成

キシラン含量の比較的高い資源に着目し、品種、産地、植物の部分などの異なる試料について、ペントサン含量、中性糖組成、キシロース/アラビノースの比率

(Xyl/Ara 比) などを Table I に示した。

ペントサン含量は、corncoobs, corn hull, cotton seeds (shell), oat hull などが高く、30~39% であった。中性糖の組成比はグルコースがもっとも高く、36~60% を示し、キシロースはおおよそ 30~51% であったが、cotton seeds (キシロース 71.8%) のごとき例外もあった。Xyl/Ara 比は、corncoobs, oat hull, peanut shell などが高いが、産地、品種のちがいによっても幾分変動した。また、木材や cotton seeds は例外的に高く 40~60 で、これはアラビノースが非常に少ないことを示している。また、特に corn hull, soya beans, brewer's cake などはアラビノースの比率が高く、したがって Xyl/Ara 比は低い値を示した。他の糖としては、soya beans にマンノースとガラクトースの比率が比較的高いほかは、ラムノース、マンノース、ガラクトースの比率は一般に低かった。

2. 前処理の効果

Table II に示した各試料について、主としてアルカリ処理後のキシランの酵素水解抽出について検討した。

アルカリ処理条件としては NaOH (1~3%), NH₃ (5%), Ca(OH)₂ (4%), Na₂CO₃ (4%), 30°C, 1~5 日

Table I. Sugar Composition of Xylan-containing Natural Materials

*No.	Xylan-containing materials (Place of production)	Pentosan (A) (%)	Neutral sugar components (B)							Xyl/Ara (ratio)
			Rham (%)	Ara (%)	Xyl (%)	Man (%)	Gal (%)	Glu (%)	Other sugars (%)	
Corncoobs	I-1 (America)	36.3	0	3.4	51.1	0	0.8	44.7	0	15.0
	-2 (Thailand)	35.6	0	5.1	49.4	0	1.7	43.8	0	9.6
	-3 (Hokkaido, Japan)	27.9	0	3.6	43.0	3.6	0.9	48.9	0	12.0
	-4 (Yamanashi, Japan)	33.4	trace	6.2	45.0	1.1	2.0	45.7	trace	7.3
	II Corn hull	36.2	trace	19.7	30.8	0.7	3.8	45.0	0	1.6
Woods	III-1 White birch	25.7	0.6	0.7	42.4	3.0	1.2	52.1	trace	60.7
	-2 Japanese oak	21.9	0.5	0.9	36.5	2.5	0.9	58.7	trace	40.5
	-3 Bleached KP	26.4								
	-4 Semi-chemical pulp	23.5								
	IV Cotton seeds	39.2	trace	1.2	71.8	0	trace	27.0	0	59.9
Soya beans	V-1 Cake	17.8	0.8	9.7	17.7	11.2	10.1	48.5	2.0	1.8
	-2 Hull	20.9	0.9	10.7	18.7	10.9	6.0	51.1	1.7	1.7
Gramineae	VI-1 Rice straw	22.3	trace	5.3	35.8	trace	2.0	56.9	trace	6.8
	-2 Rush	22.3	trace	9.8	35.8	0.4	4.3	49.7	trace	3.7
	-3 Bagasse	27.3	0	3.6	45.0	0	trace	51.4	trace	12.3
Oat hulls	VII-1 (America)	35.6	trace	5.0	51.7	trace	1.0	42.3	0	10.3
	-2 (Hokkaido, Japan)	35.9	trace	5.8	52.8	0	1.1	40.3	0	9.1
	VIII Brewer's cake	28.0	trace	16.9	44.2	0.8	2.0	36.1	0	2.6
	IX Peanut shell	16.9	0.5	3.3	33.9	0.7	1.2	60.3	0.1	10.3

(A) Based on dry matter. Pentosan (pentose $\times$ 0.88) was determined by orcinol-ferric chloride reaction.⁽⁵⁾

(B) Sugar components were determined by gas-liquid chromatography.⁽⁶⁾

Table II. Effect of Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis-extraction of Pentosan from Xylan-containing Natural Materials

Xylan-containing materials (place of production)	Samples taken (g) (dry matter)	Pretreatment		Enzymatic hydrolysis-extraction			Percentage of pentosan extracted ¹⁾						
		Alkaline soln. used for pre-treatment (ml)	Condition of pre-treatment	(g as xylose)	Xylanase solution used (g)	Enzyme reaction (hr)	Extent of extraction (g as xylose)	D. P.	Pre-treatment	Enzyme reaction	Total		
*No.													
Corn-cobs	I-1 (America)	150(138)	non-treatment				510	24	17.4	1.67	0	+	30.5 = 30.5
	"	"	water, 1500	120°C, 30 min			510	25	24.4	1.61			39.3
	"	"	5% NH ₃ , 570	30°C, 5 days	3.1		510	24	52.4	1.43	5.5	+	92.0 = 97.5
	"	"	3% NaOH, 600	30°C, 5 days	14.6		510	24	43.2	1.46	25.7	+	75.8 = 101.5
	109(100)	"	2% NaOH, 1000	30°C, 24 hr	10.1		650	24	31.8	1.49	24.5	+	77.0 = 101.5
	"	"	4% Na ₂ CO ₃ , 1000	30°C, 5 days			650	24	32.3	1.46			78.2
	"	"	4% Ca(OH) ₂ , 1000	30°C, 5 days			650	24	38.5	1.47			93.2
	-2 (Thailand)	150(135)	non-treatment				500	24	19.5	1.40	0	+	35.7 = 35.7
	"	"	5% NH ₃ , 900	30°C, 5 days	5.3		500	24	41.2	1.73	9.7	+	75.5 = 85.2
	-3 (Hokkaido)	(100)	water, 660	150°C, 30 min	9.3		500	24	28.8		23.0	+	71.2 = 94.2
-4 (Yamanashi)	"	2% NaOH, 1000	30°C, 24 hr	8.5		650	24	21.2	1.64	26.8	+	66.8 = 93.6	
	"	2% NaOH, 1000	30°C, 24 hr	6.3		600	24	31.6	1.69	16.6	+	83.2 = 99.8	
II	Corn hull	(100)	1% NaOH, 1250	30°C, 5 days	32.8		650	24	16.6	2.73	79.8	+	28.3 = 108.1
Woods	III-1	100(93)	non-treatment				510	8	3.6	1.70	0	+	13.2 = 13.2
	White birch	150(139)	5% NH ₃ , 1650	30°C, 5 days	3.4		510	24	22.5	1.53	8.5	+	56.3 = 64.8
	"	"	3% NaOH, 1500	30°C, 5 days	24.7		510	24	12.9	1.52	60.8	+	31.8 = 92.6
	-2	Japanese oak	129(50)	non-treatment			500	8	2.5	1.65	0	+	20.3 = 20.3
	"	"	6% NH ₃ , 500	30°C, 5 days	1.2		500	19	8.7	1.67	9.3	+	70.3 = 97.6
	-3	B-KP	53(48.4)	non-treatment			510	8	9.4	1.62	0	+	73.4 = 74.3
-4	S-CP	56(50.8)	non-treatment			510	8	9.4	1.64	0	+	78.7 = 78.7	
IV	Cotton seeds	200(169)	non-treatment				500	8	8.4	1.63	0	+	11.0 = 11.0
Soya beans	V-1	Cake	200(184)	5% NH ₃ , 600	30°C, 5 days	4.4	500	25	43.3	1.78	0.6	+	57.7 = 58.3
	"	"	non-treatment				510	8	14.1	1.65	0	+	37.9 = 37.9
	"	"	5% NH ₃ , 1170	30°C, 5 days	4.6		510	8	12.5	2.16	12.3	+	33.6 = 46.9
	-2	Hull	100(91.2)	non-treatment			500	24	10.4	1.81	0	+	48.0 = 48.0
"	"	"	5% NH ₃ , 800	30°C, 5 days	0.8		500	24	8.9	2.17	3.7	+	41.0 = 44.7

Gram- ineae	VI-1 Rice straw	{ 71(63.7) non-treatment 142(127.4) 5% NH ₃ , 853 (100) 5% NH ₃ , 1500	30°C, 5 days	3.2	510	8	5.4	1.42	0	+	33.6	=	33.6
	-2 Rush	{ 100(88.3) non-treatment 102(90.1) 5% NH ₃ , 766	30°C, 5 days	4.5	950	24	17.2	1.54	17.7	+	67.8	=	85.5
	-3 Bagasse	{ 100(88.3) non-treatment 102(90.1) 5% NH ₃ , 766	30°C, 5 days	2.7	510	8	9.6	1.65	9.7	+	34.4	=	44.1
	VII-1 (America)	{ 100(88.3) non-treatment 102(90.1) 5% NH ₃ , 766	30°C, 24 hr	7.0	650	24	29.5	1.50	17.1	+	72.3	=	89.4
	-2 (Hokkaido)	{ 128(119) non-treatment 128(119) 5% NH ₃ , 768	30°C, 24 hr	11.0	650	24	31.2	1.37	27.1	+	77.1	=	104.2
Oat hulls	VIII Brewer's cake	{ 128(119) non-treatment 128(119) 5% NH ₃ , 768	30°C, 5 days	10.6	510	8	23.2	1.93	0	+	61.3	=	61.3
IX Peanut shell	{ 100(88.3) non-treatment 102(90.1) 5% NH ₃ , 766	{ 100(88.3) non-treatment 102(90.1) 5% NH ₃ , 766	30°C, 5 days	1.2	600	24	1.2	1.81	6.2	+	6.2	=	12.4

1) On the basis of total pentosan of original samples.

Air dried xylan-containing natural materials were steeped into alkaline solution at 30°C. After washing with water until pH of washed liquor became to about 5.7, the wet residue was filtered by centrifugal filtration at about 1200×g for 2~3 min. The reaction mixture which consisted of the wet solid obtained or non-treated materials and 500~650 g of xylanase solution (120 units/ml) described in Part II of this series⁽¹⁾ was incubated in 1500 ml vessel with agitation at 200~300 rpm. Throughout the reaction, the pH was maintained at 5.6~5.8 by the addition of 5 N NaOH or HCl solutions, and the temperature was held at 55°C. After enzyme reaction for 8 or 24 hr, the slurry obtained was filtered by centrifugal filtration to remove remaining solid materials. Total and direct reducing sugars in the filtrate were determined by Sonogyl's method using D-xylose as reference standard.

*No. of samples in this table correspond to ones in Table I.

処理, 湿熱処理としては 120°C および 150°C, 30 分加圧蒸着を用いた。その結果, 未処理でもある程度の酵素作用を受けたが (全ペントサンの 11~30%), 前処理によってキシランは易分解化され, 酵素による加水分解抽出の速度, 加水分解抽出率は著しく増加した。前処理によって幾分ペントサン成分は溶出 (全ペントサンの 3~28%) され, 特に 3% (3% 以上) NaOH で顕著であった。前処理後, 酵素を作用させることによって, 全ペントサンの 60~100% (酵素作用の段階のみでは 50~90%) が抽出可能となった。前処理の効果は, ほとんどすべての試料について認められたが, なかには soya beans cake, 同 hull, peanut shell や, すでに酵素処理を受けている brewer's cake などのように効果が顕著でないものもあった。

3. Corncobs の前処理物と無処理物に対する酵素作用の比較

Corncobs の酵素水解抽出の結果を, 前処理と無処理と対比して, Fig. 1 に示した (前処理の条件は, Table II 中の I-1 に相当)。5% NH₃ 処理の corncobs では, 酵素反応の 8 時間および 24 時間後には, 全ペントサン量に対して, 酵素によって水解抽出されたペントサン量は, 各々 87%, 92% に達した。また 3% NaOH 処理で, 水解抽出率の値が低いのは, 前処理中にペントサンが溶出したためであって, したがって, この前処理条件は強すぎるといえる。なお, 前処理後の試料を用いて, 酵素

Fig. 1. Time Course of Enzymatic Hydrolysis-extraction of Pentosan from Corncobs.

The reaction mixtures were consisted of given amount of pre-treated or non-treated corncobs and the xylanase solution (see I-1 in Table II). The mixtures were incubated under condition as described in Table II.

●— non-treatment, ○— pretreatment by 3% NaOH, ○— pretreatment by 5% NH₃, ---○--- average degree of polymerization (5% NH₃).

吸着糖化⁽⁸⁾によるキシランの水解抽出も可能であった。

4. 酵素水解抽出液の中性糖とオリゴ糖組成

Table II に示した方法で前処理した試料を, 各々粗酵素と精製酵素を用いて水解抽出した。この抽出液を 4 %硫酸で水解した後, GLC で中性糖の分析を行ない, 水解抽出液中の全中性糖に対する各糖の%値をもって中性糖の組成を表わした (Table III)。この結果,

- 1) 主成分は, いずれもキシロースであった。
- 2) アラビノースとグルコースも含まれ, soya beans cake と同 hull では, マンノースやガラクトースもか

なり含まれていた。

3) 粗酵素と精製酵素を比較すると, 精製酵素の場合にはグルコースの量が著しく減少した。

4) Xyl/Ara 比は, 試料による差が大きく, corn hull, 稲わら, イ草, brewer's cake などではその比は小さく, アラビノース含量も高かった。また原料の Xyl/Ara 比 (Table I) と酵素水解抽出液の Xyl/Ara 比 (Table III) とは, ほぼ同じ傾向を示し, 精製酵素と粗酵素による水解抽出物では, この比はほとんど同じで, soya beans と peanut shell 以外は大差はなかった。なお,

Table III. Sugar Compositions of Enzymatic Hydrolyzates Obtained from Pre-treated Xylan-containing Materials

Xylan-containing materials (place of production)			Enzyme	Sugar compositions						Xyl/Ara (ratio)
*No.				Rham (%)	Ara (%)	Xyl (%)	Man (%)	Gal (%)	Glu (%)	
Corncoobs	I-1	(America)	{ crude	0	6.8	77.7	0	1.3	14.1	11.4
			{ purified	0	7.5	92.5	0	trace	0	12.3
	-2	(Thailand)	{ crude	0	8.4	74.8	0	1.2	15.6	8.9
			{ purified	0	9.6	90.8	0	0	0	9.4
	-3	(Hokkaido)	{ crude	0	8.4	76.9	0	1.0	13.5	9.2
			{ purified	0	7.9	86.0	0	1.6	4.5	10.9
	-4	(Yamanashi)	{ crude	0	10.1	79.9	0	1.6	8.4	7.9
			{ purified	0	10.1	87.1	0	1.3	1.5	8.7
Woods	II	Corn hull	{ crude	trace	25.2	41.2	1.5	6.4	25.7	1.6
			{ purified	trace	29.7	47.0	0	6.6	16.7	1.6
	III-1	White birch	{ crude	1.2	0.6	92.7	trace	trace	5.5	
			{ purified	1.1	0	98.9	0	trace	0	
	-2	Japanese oak	{ crude	1.1	trace	88.0	1.5	0	9.4	
			{ purified	1.5	0	98.5	0	0	0	
	IV	Cotton seeds	{ crude	0.6	0.3	99.1	0	0	0	
			{ purified	0.6	0	99.4	0	0	0	
Soya beans	V-1	Cake	{ crude	trace	9.8	45.6	29.6	8.0	7.0	4.7
			{ purified	1.6	11.1	69.2	4.6	8.5	3.6	6.2
	-2	Hull	{ crude	0.6	4.7	45.5	30.1	7.7	11.4	9.7
			{ purified	0.5	3.6	88.5	3.1	3.0	1.3	24.6
Gramineae	VI-1	Rice straw	{ crude	trace	14.2	70.8	0	2.1	12.9	5.0
			{ purified	0	15.2	80.1	0	2.2	2.5	5.3
	-2	Rush	{ crude	0.3	18.2	60.7	0	2.6	18.2	3.3
			{ purified	trace	20.6	74.1	0	3.3	2.0	3.6
	-3	Bagasse	{ crude	0	9.8	83.1	0	0	7.1	8.5
			{ purified	0	10.3	89.7	0	0	trace	8.7
Oat hulls	VII-1	(America)	{ crude	trace	9.3	80.7	0	1.3	8.7	8.7
			{ purified	0	9.0	91.0	0	trace	0	10.1
	-2	(Hokkaido)	{ crude	trace	11.5	81.1	0	2.1	5.3	7.0
			{ purified	trace	10.8	87.5	0	1.7	0	8.1
VIII	Brewer's cake	{ crude	trace	24.7	63.3	trace	2.0	36.7	2.6	
		{ purified	0	23.7	73.0	0	1.5	1.8	3.1	
IX	Peanut shell	{ crude	1.0	1.7	54.4	3.5	3.9	35.5	32.0	
		{ purified	1.2	1.8	90.1	0	0.9	6.0	50.0	

The enzymatic hydrolysis-extraction from pre-treated xylan-containing materials was carried out according to the procedure as described in Table II. The sugar compositions in the hydrolyzates were determined by G. L. C.,⁽⁸⁾ after hydrolysis with 4% H₂SO₄ at 100°C for 2 hr.

* No. of samples in this table correspond to ones in the Table II.

Fig. 2. Paper Chromatograms of Hydrolysis Products Obtained from Pre-treated Xylan-containing Materials by Xylanase.

A, B, C, D, E and F in this figure correspond to I-4, II, III-1, IV, VI-1 and VII-2 in Table II, respectively.

S: authentic samples, xylose, arabinose, glucose, xylobiose, xylotriose, xylotetraose, xylopentaose and xylohexaose from top; C: crude enzyme; P: purified enzyme; CA and PA: products after hydrolysis with 4% H_2SO_4 at $100^\circ C$ for 2 hr.

セルラーゼ活性の微弱な酵素液または精製酵素を用いた実験では、水解抽出率には大差がなかった（未発表）。

次に、酸水解前の酵素水解抽出液と酸水解後の抽出液（上記 GLC と同試料, Table III）の糖組成の比較を Fig. 2 に示した。前報で述べたごとく、パルプの mercerization から得られる広葉樹キシランの、該酵素による分解産物は、ほとんどキシロースとキシロビオースからなっていた。しかし、本実験の前処理試料の酵素水解抽出液（酸水解前）の糖の主成分は、キシロースとキシロビオースであるが、アラビノースや R_f 値がグルコ

スに相当するスポットや、その他キシロオリゴ糖と異なる R_f 値を持つ未知の成分も検出された。

これらのスポットの数は試料によって異なるが、たとえば白カバや cotton seeds の精製酵素による水解物では、キシロースとキシロビオース以外に大きなスポットは、ただ 1 つ観察されるのみであった。 R_f 値がグルコースに相当するスポットは、 α -アニジジン塩酸塩による発色は赤色で、また酸加水分解後には消失するため、ペントースのオリゴ糖と断定された。

次に、前処理 corncoobs の水解抽出液の PPC を Fig. 3 に示した

が、この場合には数個のスポットが認められた。水解抽出液を厚手の濾紙で展開した後（東洋濾紙 No. 527 による PPC）、X と Y に相当する部分を抽出し、結晶化した結果、各々キシロースとキシロビオース⁽¹⁾と同定された。一方、この水解抽出液を酵母処理してキシロースとキシロビオース（X, Y）を除去した後^(2,9)、炭末クロマトグラフィー、ついで厚手濾紙の PPC で未知成分を単離した。a, b, c の各成分は、いずれもキシロースとアラビノースのみよりなり、a の主成分は 1 つで、Xyl/Ara 比は 2.0, D. P. は 3.0 であった。また b の主成分は 2 つあり（b-1, b-2）、各々の Xyl/Ara 比は 3.0, 4.9 であり、また各々の D. P. は 4.0, 4.6 であった（b-2 は Xyl/Ara 比と D. P. 値から判断して不純と思われる）。さらに c は Xyl/Ara 比は 4.1, D. P. は 5.0 であった。d は、ウロン酸を含むキシロオリゴ糖と推定された⁽⁹⁾。

5. キシロースの調製

Corncoobs を上述のごとく 5% NH_3 , $30^\circ C$, 5 日間前処理し、キシランを易分解化し、水洗後、酵素でキシランを水解抽出し、この糖液を希酸水解⁽⁸⁾し、脱塩、濃縮して、原料 1000 g（ペントサンとして 333 g 含有）からキシロース結晶 189 g を得た。その結果を Fig. 4 に示した。

考 察

無処理の天然物キシランに対しても、酵素はある程度作用したが、高温湿熱や希アルカリ溶液などの前処理に

Fig. 3. Paper Chromatograms of Hydrolysis Products Obtained from Pre-treated Corncoobs with Xylanase System.

A: authentic xylose and xylooligosaccharides, B: hydrolysis products obtained from pre-treated corncoobs, C: B after elimination of xylose and xylobiose by *Candida guilliermondii* IFO 0566.

Fig. 4. Procedure and Material Balance for Producing Xylose from Corncobs by Enzymatic Hydrolysis-extraction, followed by Dilute-acid Hydrolysis.

よって、酵素作用は著しく促進された。前処理の効果は品種、産地、植物の部分などの異なる試料についても認められたが、なかには soya beans cake や peanut shell などのように、効果が顕著でないものもあった。今後、個々の試料について、前処理の最適条件を検討す

れば、前処理時間は短縮され、さらに前処理で溶出するペントサンを最少限に止め、かつ酵素による水解抽出率の増大が可能であろう。

天然物キシランが、高温湿熱や希アルカリ溶液による前処理の結果、なぜ易分解化されるのか、易分解化の物理化学的なメカニズムは非常に複雑であろうが、前処理条件の検討とともに、易分解化のメカニズムの検討は今後の課題である。

Streptomyces sp. E-86 のキシラーゼによる天然物キシランの水解抽出液の酸水解物中には、キシロースのほかアラビノースやグルコースなども含まれていた。まず、アラビノースの生成は、アラバンに起因することと考えられるが、多くの場合、アラビノキシランから由来したものであろう。すなわち、本実験で、(イ)水解抽出液からアラビノースを含むキシロオリゴ糖が生成・分離されたこと、(ロ)水解抽出液の Xyl/Ara 比と試料の Xyl/Ara 比とは、ほぼ同じ傾向にあったことなどの結果から、アラビノキシランであると推察される。また他の研究者も、キシランの多くはアラビノキシランであることを報告しており⁽¹⁰⁻¹⁶⁾、さらに酵素水解物として、ア

ラビノースを含むキシロオリゴ糖を生成・単離している⁽¹⁷⁻²³⁾。またグルコースの生成は、精製酵素(セルロースの分解活性がない)やセルロース物質によってセルラーゼを吸着除去したセルラーゼ活性の微弱な酵素液を使った実験では(未発表)、グルコースは生成されない

か、または微量検出されたにすぎなかった事実から、セルラーゼに起因するものと思われる。しかし、ある種の試料では、セルラーゼ活性のないキシラナーゼを使っても、若干のグルコースが検出されたが、これはキシランの水解抽出にともない、組織の崩壊による低分子セルロースの溶出、または精製酵素にも、本実験での測定法では検出されない程度の微弱なセルラーゼの混在（またはキシラナーゼがセルロース分解作用を有する場合も考えられる）、さらにキシラン鎖にグルコースが結合しているなどが考えられる。大豆では、他の試料に比較して、特にマンノースやガラクトースも生成されたが、これは、上述したようなグルコースの生成原因と類似しているものと推察した。

以上の結果、酵素水解抽出液の糖組成は、試料の種類による差が大きく、したがってキシラナーゼ作用のみを有する酵素でも、キシロース系成分のみを水解抽出することは不可能であろう。しかし、水解抽出液にアラビノースの混在を少なくする方法としては、あらかじめ希酸水解または arabinosidase などであらびノースを除去した後、キシラナーゼを作用させる手法などが考えられる。

要 約

キシラン含有天然物から、*Streptomyces* sp. E-86 のキシラナーゼでキシランを加水分解抽出することを目的とし、多種類の試料に対する前処理の効果、水解抽出液の糖組成、corncobs からキシロースの調製法などについて実験を行ない、次の結果を得た。

1. 無処理の天然物キシランに対しても、酵素はある程度作用したが、希アルカリ溶液や高温湿熱による前処理は、キシランを易分解化し、酵素によるキシランの水解抽出率は著しく高められた。さらに、アルカリによる前処理は、多種類の試料に対して有効であった。

2. 水解抽出液の構成糖（酸水解後）は、キシロースが大部分であったが、そのほかにアラビノースやグルコースなども生成された。しかし、精製酵素による実験では、グルコース量は極端に減少した。また、セルラーゼ作用のないキシラナーゼでも、キシランを水解抽出することが可能であった。さらに、キシロース/アラビノース比は、天然物キシランのその比と大差は認められなかった。

3. Corncobs の水解抽出液は、キシロースとキシロ

ビオースが主産物であったが、数種のアラビノースを含むキシロオリゴ糖も含まれていた。

4. Corncobs 1 kg（ペントサンとして 333 g 含有）を 5% NH_3 で前処理し、水洗後、酵素でキシランを水解抽出した。さらに希酸水解を行ない、精製・濃縮し、結晶キシロース 189 g を得た。

終りに、本研究に際して、キシラン含有天然物を恵与くださった、味の素株式会社、天野製薬株式会社、合同酒精株式会社、ゼネラルフーズ株式会社、富士デベロップメント株式会社、三井製糖株式会社の各社に謝意を表します。本研究の概要は、昭和 44 年 11 月、日本農芸化学会関東支部大会（東京農業大学）、昭和 47 年 4 月、日本農芸化学会大会（東北工業大学）および昭和 47 年 10 月、日本農芸化学会関東支部大会（東京教育大学）でそれぞれ講演発表した。

なお、本研究の費用の一部は、昭和 44 年度、三島海雲記念財団学術奨励金によって行なわれたことを付記し厚く謝意を表します。

- (1) I. Kusakabe, T. Yasui and T. Kobayashi: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1355 (1975).
- (2) 日下部 功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **49**, 383 (1975).
- (3) 日下部 功, 安井恒男, 小林達吉: 醸工, **53**, 135 (1975).
- (4) 小林達吉, 安井恒男, 日下部 功: 日農化大会講演要旨, p. 242 (1972).
- (5) W. R. Ferrell and H. K. King: *Analyst*, **78**, 80 (1953).
- (6) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- (7) 日下部 功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **43**, 145 (1969).
- (8) L. G. Borchardt and C. V. Piper: *Tappi*, **53**, 257 (1970).
- (9) 小林達吉, 安井恒男, 日下部 功: 日農化関東支部大会講演要旨, p. 2 (1972).
- (10) R. Montgomery and F. Smith: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 2834 (1955).
- (11) G. A. Adams: *Can. J. Chem.*, **33**, 56 (1955).
- (12) R. L. Whistler and J. N. BeMiller: *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 1163 (1956).
- (13) G. O. Aspinall and R. J. Sturgeon: *J. Chem. Soc.*, **4469** (1957).
- (14) R. L. Whistler and B. D. E. Gaillard: *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 332 (1961).
- (15) R. E. Gramera and R. L. Whistler: *ibid.*, **101**, 75 (1963).
- (16) 前川英一, 北尾弘一郎: 木材研究, No. 34, 100 (1965).

- (17) C. T. Bishop and D. R. Whitaker : *Chem. & Ind.* (London), 119 (1955).
(18) R. L. Whistler and D. I. McGilvray : *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1884 (1955).
(19) C. T. Bishop : *ibid.*, **78**, 2840 (1956).
(20) S. Fukui : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 39 (1958).
(21) H. R. Goldschmid and A. S. Perlin : *Can. J. Chem.*, **41**, 2272 (1963).
(22) S. Takenishi and Y. Tsujisaka : *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1385 (1973).
(23) R. F. H. Dekker and G. N. Richards : *Carbohyd. Res.*, **39**, 97 (1975).
-