木材キシラン・グルコマンナンの利用に関する研究 (第 1 報¹⁾) 精製と分離橋本武雄,^{2a)} 橋本和雄^{2b)}日東紡績化繊研究所,^{2a)} 市立秋田総合病院薬剤部^{2b)}Studies on the Utilization of Xylan and Glucomannan in Woods. I.¹⁾

Purification and Separation

TAKEO HASHIMOTO^{2a)} and KAZUO HASHIMOTO^{2b)}Research Institute of Chemical Fibers in Nitto Boseki^{2a)} and Pharmacy
of Akita Municipal Hospital^{2b)}

(Received October 2, 1974)

Polysaccharide mixture xylan and glucomannan were prepared from the waste water of the steeping alkali solution of wood pulp in a better yield and in higher purity than by the conventional methods. Concentrated waste water, adjusted to 7.5—10% sodium hydroxide concentration, produced a flocculent precipitate by the addition of excess methanol. This precipitate had a good filtrability to be recovered on Büchner funnel. Graded hydrolysis of this precipitate with hydrochloric acid in methanol gave ash-free polysaccharide mixture, mainly composed of D-xylose, D-mannose, and D-glucose, and free from L-arabinose. Xylan was recovered from water dispersion of polysaccharide mixture as a precipitate. Glucomannan in the supernatant was recovered by fractional precipitation with methanol.

ビスコース工業のパルプ浸漬アルカリの廃液中には、主にキシランとグルコマンナンからなる、いわゆるヘミセルロースが含まれている。両多糖成分の分離には常法としてフェーリング法、水酸化バリウム法があるが、分離多糖中の銅・バリウムの完全除去が困難であるとともに、回収率も十分とはいえない。今回著者らは当該廃液から精製した多糖混合体 (CX) を得、さらに CX の水・メタノールによる分別沈殿から、キシラン成分 (X)、グルコマンナン成分 (GM) を分離した。X および GM はいずれも重量平均重合度 30—40 の易反応性物質で、構成単糖 1 ケにつき 1 以上の置換基を導入することもできる。脂血清澄作用は X の硫酸エステル、GM の硫酸エステルにも認められ、とくに X の硫酸エステルには抗潰瘍性作用のあることも認められた。³⁾

岡らはヘミセルロース中に、固型腫瘍 Sarcoma 180 に対して増殖阻止作用を示す成分のあることを述べているが、⁴⁾ 同腫瘍に対して 66.2% の阻止率を示し、X は不活性であった⁵⁾。樋口らは X の硫酸エステルが血行性肺転移に著しい抑制作用のあることを報告している。⁶⁾ また CX, X, GM は錠剤の賦型剤として興味ある性質を示した。⁷⁾

本報告では、以上述べた諸種の利用を企てるための材料としてパルプ廃液から CX を得る方法を述べる。なおこの処理はパルプ廃液の再生利用、廃棄処理にもつながる意味を含む。また CX より X と GM を分離する方法について改良を加えた結果、得られた知見について述べる。

ヘミセルロースは国産ブナ材 80% (広葉樹)、スプルース、ヘムロック 20% (針葉樹) の溶解用亜硫酸パルプ

1) 日本薬学会第 94 年会, 仙台, 1974 年 4 月。

2) Location: a) Fukuyama-cho, Koriyama, Fukushima; b) Matsuoka-cho, Kawashiri, Akita.

3) 小松豊彦, 田中秀雄, 橋本武雄 (未発表)。

4) 岡 捨巳, 日本臨床, 27, 1749 (1969)。

5) 内山 充, 北條博史, 未発表。

6) 樋口佑次, 小林正樹, 山本俊明, 山下 喬, 螺良英郎, プラスミン研究会第 14 回報告集, 第一製薬, 1964 年, p. 103.

7) 日本薬学会第 94 年会, 仙台, 1974 年 4 月。

Chart 1. Isolation and Purification of CX

のアルカリ浸漬液を透析によって脱アルカリして生ずる工場廃液を利用した。CX は該廃液から Chart 1 の方法によって得た。

ヘミセルロースは通常そのアルカリ溶液を過剰のアルコール（沈殿剤）に加えることによって回収されるが、エタノールに比し、アルカリ溶解度の高いメタノールが、より完全な凝集沈殿を与える。また得られる凝集性粒子の形態はヘミセルロースを溶解する液のアルカリ濃度の影響をうけ、沈殿の回収法に大きな影響を与える。すなわち CX の汙過性試験の結果 (Fig. 1) が示すように、低濃度アルカリ (5% 以下) では沈殿粒子が小さく、汉過閉塞を起こし、分離には遠心器を必要とする。高アルカリ (12.5% 以上) では凝集塊は過剰のアルカリによって膨潤性を帯び、粘着性を呈し汉過性低下が起こる。したがって最適の汉過性を示すアルカリ濃度は、この中間域 (7.5—10%) にあり、これで得た凝集塊は通常のブフネル汉過器で容易に汉別される性質を示すので、原料となる低アルカリ分の廃液を濃縮して、このアルカリ濃度に調製すれば、ブフネル汉過器によって容易に汉別される沈殿 (I) を与える。I は 80% メタノールで洗浄しても、1—2% の灰分 (主として Na, 若干の Ca, Mg) を有し、赤外吸収スペクトルに示されるウロン酸は塩の形 [IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 1610 (COO⁻)] を示す。⁸⁾ また I はカセイソーダ溶液に完溶しない。したがって I の脱塩・精製を行なうため、80% メタノール-塩酸 (8%) 処理を行ない精製品 CX を得た。CX は 4% カセイソーダ、ジメチルスルホキシドに完溶し、ウロン酸は遊離のカルボン酸 [IR $\nu_{\max}$ cm⁻¹: 1730 (COOH)] を示す。Table I に示すごとく 8% 塩酸処理によって I は脱塩され、さらに構成中性糖成分の D-ガラクトース、L-アラビノースを失い、D-キシロース、D-マンノース、D-グルコースを主中性糖成分とする CX となる。塩酸処理

Fig. 1. Effect of NaOH Concentration in CX Solution on the Filtrability of CX precipitated with MeOH

NaOH (%): $\square$ —: 10.0, $\bullet$ —: 7.5, $\triangle$ —: 12.5, $\circ$ —: 15.0, $\times$ —: 5.0, $\ominus$ —: 2.5, $*$ —: 17.5

8) T.E. Timell, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 5211 (1960); 祖父江寛, 福原節雄, 工化, **61**, 377 (1958).

TABLE I. Composition of Neutral Sugars in Acid Hydrolyzed I

HCl %(w/v)	Alcohol %(v/v)	Ratio					Ash (%)
		Xy.	Man.	Glu.	Ara.	Gal.	
0	80(M)	100	67	49	33	3	1.32
3.5	80(M)	100	61	34	13	0	0
8	80(M)	100	64	39	0	0	0
4	70(E)	100	57	32	15	0	0
8	75(E)	100	50	31	0	0	0
8	80(E)	100	52	32	0	0	0

Xy.: xylose, Man.: mannose, Glu.: glucose, Ara.: arabinose, (M): MeOH, (E): EtOH

による L-アラビノースの消失は、塩酸処理によってタマラックキシラン中の L-アラビノースが消失することを認めた Adams の例と同じように、⁹⁾ 主にヘムロックキシラン、スプルースキシランの側枝成分と思われる L-アラビノースが、¹⁰⁾ 多糖の分解形式である末端、側枝成分からの酸化を受け、脱離したためと考えられる。一方 D-ガラクトースの消失は、グルコマンナンあるいはガラクトグルコマンナンの側枝成分と考えられる α -1 ガラクトース→6 の結合が、酸によって容易に切断したためと考えられる。^{11,12)}

X, GM は CX の水、メタノールによる分別沈殿法—Chart 2 によって分離した。すなわち、CX の水分散液の

Chart 2. Fractionation of CX by Methanol Precipitation

a) The treatment is the same as that of X.

- 9) G.A. Adams, *Can. J. Chem.*, **38**, 2402 (1960).
- 10) J. Love, E. Percival, *Biochem. J.*, **84**, 29 (1962); *idem*, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 3338; G.G.S. Dutton, K. Hunt, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1682 (1960).
- 11) T.E. Timell, *Tappi*, **44**, 88 (1961); *idem*, *ibid.*, **45**, 734 (1963); A.R. Mills, T.E. Timell, *Can. J. Chem.*, **41**, 1389 (1963).
- 12) E.C.A. Schwarz, E.E. Timell, *Can. J. Chem.*, **41**, 1381 (1963).

沈殿部分: X, さらにその上澄部分に逐次メタノールを添加して得られる調製液 (10, 50, 80% MeOH) の各沈殿画分: A, GM, B を遠心分離した. X は D-キシロース 含量の高いペントース成分であり, GM は D-マンノース: D-グルコース比が 2:1 のヘキソースに富む成分である (Table II).

TABLE II. Properties of CX and its Sub-Fractions obtained by the Method shown in Chart 2

		CX	X	A	GM	B
Yield (%) / CX		100	36.4	2.7	11.0	6.0
Pentose (%)		62.3	82.9	37.9	12.6	64.2
Ratio of three sugars	Xylose	100	100	85	9	100
	Mannose	57	8	100	100	56
	Glucose	32	5	56	52	34
Uronic acid/Pentose (%)		10.19	11.41	21.89	2.86	10.98
$[\alpha]_D^{20}$		-72.4	-87.2	-55.6	-44.2	-71.0
$[\eta]$		0.172	0.191	0.172	0.154	0.135
$\overline{DP}_w$		37	40	37	33	29

X, GM の赤外吸収スペクトル (Fig. 2) は, 主成分単糖のスペクトルに酷似する. X のグリコシド結合は β 結合 ($IR \nu_{max} \text{ cm}^{-1}$: 740—760 欠) と考えられ, GM も β 結合 ($IR \nu_{max} \text{ cm}^{-1}$: 810—855 欠, 890 在) を示している.¹³⁾

X 線スペクトル (Fig. 3) における X は松崎らがフェーリング法で分離したブナキシランに類似し,¹⁴⁾ GM は同じく松崎らがフェーリング法で分離したアカマツのグルコマンナンに類似する.¹⁵⁾

本法によって分離した X, GM を, 常法によって分離した相当品と比較するため, CX より Adams のフェー

Fig. 2. IR Spectra of CX and Its Four Sub-Fractions^{a)}

a) fractionation method appeared in Chart 2

Fig. 3. X Ray Spectra of CX and Its Four Sub-fractions

13) S.A. Barker, E.T. Bourne, D.H. Whiffen, *Method Biochem. Anal.*, **3**, 213 (1956); 平野茂博, 小野寺幸之進, “多糖生化学 化学編 I,” 初版, 江上不二夫監修, 共立出版, 東京, 1969, p. 152.

14) 松崎 啓, 守屋正夫, 秋月和雄, 祖父江寛, 工化, **62**, 1030 (1959).

15) 松崎 啓, 守屋正夫, 祖父江寛, 工化, **62**, 865 (1959).

TABLE III. Properties of X and GM separated by Various Methods

	(X)				(GM)			
	Yield ^{a)} g	Pentose %	Ash %	$[\alpha]_D^{20}$	Yield ^{a)} g	Pentose %	Ash %	$[\alpha]_D^{20}$
Present method	3.16	82.9	0	-87°	1.8	12.6	0	-44°
Fehling method ^{b)}	0.2	—	7	—	2.2	17.2	1.94	-48°
Ba(OH) ₂ method ^{c)}	6.2	65.1	10.15	-74°	0.1	—	11.8	—

a) yield per 10 g CX

b) application of Adams's method in the literature index; 16)

c) application of Beélik's method in the literature index; 17)

リング法によって X, GM を得た.¹⁶⁾ また当該廃液に Beélik らの水酸化バリウム法を適用して X, GM を得た.¹⁷⁾ それらの物性を Table II に示す.

CX のフェーリング溶液による沈殿部分, すなわち銅複合体から回収される GM 成分は, 高収量を与える. 他方溶解部分から回収される成分は, 松崎らが国産ブナ材のヘミセルロースの同溶液中に純度の高いキシランの存在することを認めているように,¹⁴⁾ IR 上 X 相当品と推定されるが, X の回収法として収量的に适当といえない. また Beélik らが, 針葉樹系のものに試みた水酸化バリウム法を, 当該廃液に適用して分離した, X のペントース含量は劣るが, 収量は良い. しかしバリウム塩の 15% カセイソーダ抽出分から得られた GM (IR 上 GM 相当品と推定) は, 低収量であり, GM の回収法としては适当といえない. すなわちフェーリング法, 水酸化バリウム法によって得た X, GM に比較して, 本報告の方法で得た X, GM は純度 (灰分, ペントース含量), 収量で優れたものであるといえる.

実 験 の 部

ペントースの定量 フルフロール約 0.1 g 相当の多糖を 12% HCl 100 ml 中で加熱蒸留 (留出速度 30 ml/hr), 留出液がアニリン-酢酸試験紙で赤色を呈するときは, 12% HCl 30 ml を追加, 蒸留する. 蒸留液にフロログルシン試薬 (11 g/12% HCl 1500 ml) を推定フルフロール生成量の 2 倍加え, 生成する黒色沈殿を 12% HCl 400 ml に希釈, 一夜放置後, ガラスペーパーで汙過洗浄 (H₂O: 150 ml), 乾燥 (120°C, 2 hr), Kroeber の表より xylan に換算,¹⁸⁾ ペントース含量として示す.

比旋光度 $c=5, 8\%$ NaOH, 20° (日本分光 DIPSL).

多糖中の構成中性糖の分析 多糖試料約 200 mg を加水分解 (4% H₂SO₄ 20 ml, 8 hr), 中和 (BaCO₃) し, 汙過洗浄液を 90% EtOH として一夜放置後オリゴ糖を汙別, 汙液の濃縮 (<40°) 物を水 10 ml に溶解, アニオン交換 (三菱化成 SK1B) カラムを通し, 水 200 ml の回収液を中和 (1N NaOH) 後, 再濃縮し, 硼酸溶液 (9.3 mg/ml) で pH 8 の 5 ml 溶液とする. これを液体クロマト分析装置 (日本電子 JEOL-3BC) にふし, 検出される中性糖から原料多糖を構成する中性糖の重量比を求める.

ウロン酸の定量¹⁹⁾ 構成中性糖の分析に用いる加水分解後の中和液を, ウロン酸 20—30 µg/ml の濃度になるよう希釈して試料液とする. ホウ砂-硫酸溶液 (0.95 g Na₂B₄O₇·10H₂O/100 ml 濃硫酸) 5 ml の冷却した試験管中に試料 1 ml を発熱を抑えながら徐々に加え (<20°), 激しく振盪する. ガラス球で蓋をし, 沸騰浴中で 10 分加熱後, 冷水で室温に冷却したものに, カルバゾール溶液 (12.5 mg の 10 ml EtOH 溶液冷暗所保存品) 0.21 ml を加え, 赤色を呈するまで約 15 分沸騰浴中で加熱し, 冷却後 530 mµ の吸光度を測定, D-グルクロン酸 4—40 µg/ml の検量線より換算定量する.

極限粘度 $[\eta]$, 重量平均重合度 $\overline{DP}_w$ Kayama らの方法により,²⁰⁾ 試料を Cadoxen ($c=0.5$) に溶解, ウベローデ粘度計 (35±0.1°) による $[\eta]$ を Arrhenius の近似式 ($[\eta]=\ln \eta_{rel}/C$) から求め, さらに Mark-Houwink の式 ($[\eta]=9.2 \times 10^{-3} \times \overline{DP}_w^{0.64}$) から $\overline{DP}_w$ を計算で求めた.²¹⁾

16) G. Adams, "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. V, ed. by R. Whistler, Academic Press, New York and London, 1965, p. 172.

17) A. Beélik, R. Conca, J. Hamilton, *Tappi*, **50**, 78 (1967).

18) E. Kroeber, *J. Landw.*, **48**, 355 (1900); *idem, ibid.*, **49**, 7 (1901).

19) G.P. Roberts, *J. Chromatog.*, **32**, 90 (1966).

20) T. Kayama, H. Higgins, *Appita*, **19**, 86 (1966).

21) R. Wikström, *Svensk Papperstidning*, **10**, 399 (1968).

CX の製法 Chart 1. 亜硫酸法溶解パルプ (国産 Buna 80%: Spruce, Hemlock 20%) のヘミセルローズが溶出するアルカリ浸漬液 (18.5% NaOH) をダイヤライザーで透析 (硫酸紙) した工場廃液 (1% NaOH w/w, 2.5% hemicellulose) 5 kg を減圧濃縮 (<45°) 処理し, 625 g (8% NaOH, 20% hemicellulose) に調製. これを3倍量の MeOH に注ぎ黄色凝集塊を得, 20 min 後ブフネル戸過器で戸別・絞液し I を得る. I を 8% HCl-80% MeOH 水溶液 2.5 liter 中に, 発熱を抑えながら徐々に添加し, 室温で 30 min 振盪処理する. 沈殿をブフネル戸過器上に捕集, 80% MeOH aq. (Cl⁻ の消失まで), acetone で洗浄し, 減圧乾燥 (P₂O₅, 48 hr) 後, CX 70g を得る.

CX の戸過性試験 CX 0.5 g を濃度差をつけた NaOH aq. (2.5—17.5%) 5 ml に室温下で溶解し, これを 15 ml MeOH (10°) に注ぎ CX の凝集沈殿を作る. 静置 20 min 後, ふりまぜて均一とした液を戸過装置にかける. 戸過器は 15 m/m 直径のガラス管の一端にカナキン布をつけたもので, 三角ロートを経て 20 ml メスシリンダー中にたまる戸液を時間的に計量する.

I の塩酸処理 (B) の実験 10 g の I を, 塩酸濃度とアルコール濃度の異なる処理液 250 ml 中に徐々に添加し (中和熱を抑え), 30 min 室温で振盪処理 (B) したのち, ブフネル戸過器で捕集, 80% MeOH aq. (Cl⁻ の消失まで), acetone で洗浄, 減圧乾燥 (P₂O₅) して CX 相当品を得る. 3.5—4% HCl 処理の平均収率 (対 I): 85%, 9% HCl 処理品の平均収率: 78%.

X, GM の分離 CX 10 g を水 500 g に加え, ホモミキサー (特殊機化学工業製; HVM 型) で 3 hr 攪拌し, CX の分散液を作る. 高速遠心 (1500×g) で沈殿を分取し, MeOH, acetone に再分散して脱水, 減圧乾燥 (P₂-D₅) して X (3.64 g) を得る. X を分離した液を濃縮 (1/3 w/w) し, それを 10% MeOH (v/v) に調製, 生ずる沈殿を X と同様遠心分離, 乾燥し, 画分 A (2.7 g) を得, A の分離液を 50% MeOH (v/v) に調製し, 一夜放置後, 生ずる沈殿を同様の操作で分離, 乾燥し, GM (1.10 g) を得, GM の分離液を 80% MeOH (v/v) に再調製し生ずる沈殿を同様に処置し, B (6.0 g) を得た.

フェーリング法による X, GM の分離 Adams のキシラン精製法を用い,¹⁶⁾ CX 10 g の 5% NaOH 溶液 (1 liter) にフェーリング溶液 75 ml を加え, 沈殿する銅複合体と上澄部分に分割 (遠心分離) した. 沈殿は, 水 500 ml に分散して回収 (遠心分離) する洗浄法を 2 回くり返してのち, 100 ml の水に分散し, 冷却 (5°) 攪拌下に, 1N HCl を加え複合体を分解, 緑色澄明液とする. これを 4 倍容量の強攪拌下の EtOH 中に加え, 沈殿として回収 (遠心分離), さらに 100 ml の水溶液とし, HCl 酸性 (pH 1) 後, EtOH から回収する脱塩操作を 3 回行い, つづいて 80% MeOH による Cl⁻ の洗浄操作を行ったものを分離, 乾燥して, GM 相当分 (yield: 2.2 g, ash: 1.94%) とした. 銅複合体と分離した上澄液は, 冷却 (5°) 下に HCl で中和後 (沈殿を生じない), 蒸留水で 1 週間透析し, 減圧濃縮液 (1.65 g) の 70% MeOH aq. の凝集沈殿を分離, 乾燥して X' 相当分 (yield: 0.2 g, ash: 7%) を得た (Table II).

水酸化バリウム法による X, GM の分離 原料廃液 570 g (CX 10 g 相当分) を流水中に再透析 (硫酸紙) し, アルカリ分が NaOH として 0.1% 以下としたものを, 238 g に減圧濃縮, これに Ba(OH)₂·8H₂O, 19.24 g を加え, Beélik らが用いた針葉樹のヘミセルローズ原料液と同じ多糖濃度の調製液とした. 以下 Beélik らの方法を用い (詳細略),¹⁶⁾ 不溶部分を遠心分離 (6000×g) した上澄液から, X (yield: 6.2 g, ash: 10.15%), Ba(OH)₂ を除いた沈殿の 1% NaOH aq. による抽出液から, ガラクトグルコマンナン (yield: 0.4 g, ash: 1.8%), 同じく 15% NaOH aq. による抽出液から, GM (yield: 0.1 g, ash: 11.8%) を得た.

謝辞 本研究を行うに当り, 御指導戴いた東北大学医学部 薬学科 内山 充教授に深甚の謝意を表します. 液体クロマト分析に御協力戴いたヤクルト研究室 小林精三郎氏, 実験にたづさわった日東紡化研助手 鈴木悦子, 三村マチ子両嬢に感謝します..