



Title	MWL抽出残渣木粉中のリグニン：1. 単離と分別
Author(s)	佐野, 嘉拓; SAN0, Yoshihiro; 榊原, 彰 他
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 31(1), 63-77
Issue Date	1974-07
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/20934
Type	departmental bulletin paper
File Information	31(1)_P63-77.pdf



MWL 抽出残渣木粉中のリグニン*

1. 単離と分別

佐野嘉拓** 榊原 彰**

Studies on Chemical Structure of Lignin in MWL Extracted Wood Residue

1. Isolation and Fractionation of Residual Lignin

By

Yoshihiro SANO** and Akira SAKAKIBARA**

目 次

1. 序 言	64
2. 実 験	64
2.1 試料の調製	64
2.2 酵素分解	65
2.3 酵素分解残渣の分別	65
2.4 ニトロベンゼン酸化	66
2.5 糖の分析	66
2.6 UV スペクトル分析	66
2.7 IR スペクトル分析	66
2.8 p-ヒドロキシベンジルアルコール基の定量	66
3. 結果と考察	67
3.1 酵素分析	67
3.2 磨砕木粉 (Milled Wood) の酵素分解	67
3.3 MWL・LCC 抽出残渣木粉の酵素分解	69
3.4 LCC の酵素分解	71
3.5 単離 MWL の比較	72
4. 結 論	73
参考文献	74
Summary	75

* Received Dec. 15, 1973.

This Report was presented at "The 18th Lignin Chemistry Symposium in Japan", 17 (1973).

** 北海道大学農学部 林産学科 木材化学教室

Laboratory of Wood Chemistry, Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

1. 序 言

少量の木粉を非膨潤性の溶媒中で極めて効率の良いボールミルにより磨砕し、中性溶媒により抽出される BjÖRKMAN の MWL (Milled Wood Lignin)^{1a-e)} はリグニン試料の中で最も変質が少なく、天然リグニン(プロトリグニン)に近いと考えられ、リグニンの化学反応、構造分析等に広く使用されている。しかし MWL は最も効率の良い条件下で磨砕、抽出しても、木材中のクラフソン・リグニンの高々 50% を占めるに過ぎなく、MWL が残部のリグニンと同じ化学構造を有するという確証はない。またリグニンの化学反応に基づくパルプ化や高収量パルプの漂白研究²⁾ 等においても、容易に除去しうる多量のリグニン部分と極めて除去し難いリグニン部分の存在が示唆され、これらは細胞間層リグニンと 2 次膜リグニン等という組織構造面からのみでは説明しえない。以前榊原³⁾ はリグニンの均一、不均一性を検討するために、MWL、LCC および不溶部リグニンを酸化分解、エタノリス、加水分解処理して分解物の定量的検討を行い、3 区分のリグニン間に顕著な相違のあることを報告している。しかし MIKSCH⁴⁾ は酸化分解による最近の研究からあまり明白な傾向がないと報告している。BjÖRKMAN^{1e)} は LCC を再度ボールミルで磨砕し、LCC のリグニンの 50% を MWL として単離し、MWL と LCC のリグニンの類似性を示唆した。従ってこれら 3 区分のリグニンを更に分別し互いに混在する部分を除去するならば、3 区分間のリグニンの化学構造の対比はより容易になると考えられる。1957 年、PEW⁵⁾ は低温度下で木粉を磨砕し、酵素分解することにより 12~14% の炭水化物を含む変質の少ない可溶性リグニンを調製した。本研究は PEW の酵素分解法と BjÖRKMAN の磨砕抽出法を併用し、LCC と残渣木粉に含まれる残部リグニンの単離、分別を検討し、MWL と残部リグニンを比較するために行った。今回は残部リグニンの単離、分別を検討した。

2. 実 験

2.1 試料の調製

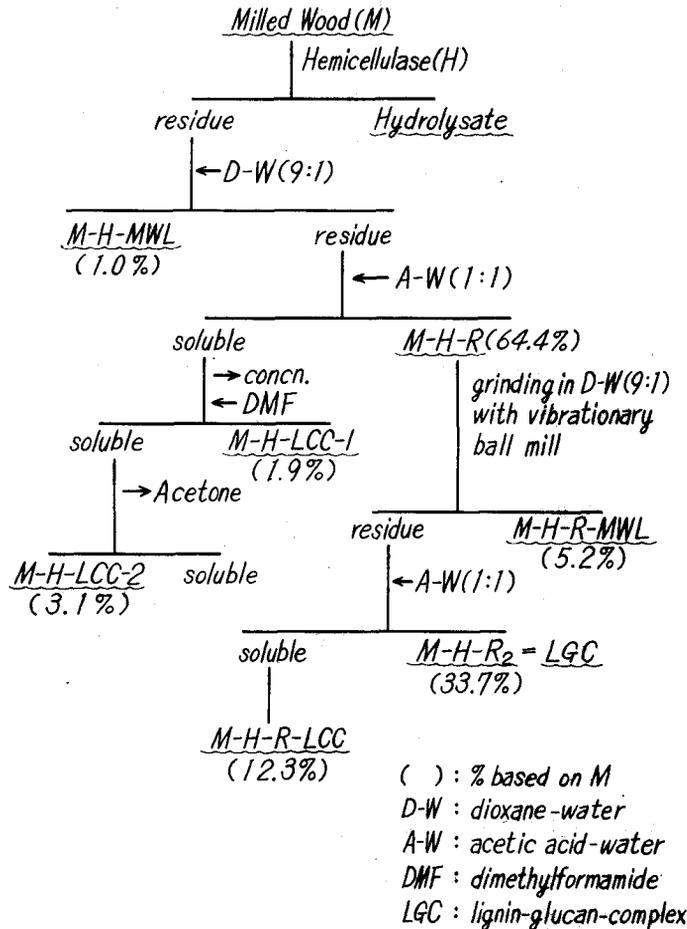
エゾマツ (*Picea jezoensis*) 脱脂木粉 (60 メッシュ以下) を P_2O_5 上で 3 週間減圧乾燥し、BjÖRKMAN の標準法^{1b)} に基づき処理した。すなわち 6 g の乾燥木粉をトルエン中、振動ボールミルで 48 時間磨砕した。遠心分離した磨砕木粉をジオキサン-水 (9:1) 中で 48 時間浸漬抽出し、遊離のリグニンを除き、残部を磨砕木粉 (M) とした。M の一部はジオキサン-水 (D:W) (9:1) 中、振動ボールミルで 48 時間磨砕抽出し、MWL (B-MWL) を除き、抽出残渣は酢酸-水 (A:W) (1:1) 中で 3 カ月間浸漬抽出し、LCC (B-LCC) を単離した。B-MWL と B-LCC は BjÖRKMAN の溶解沈殿法により精製した。LCC 抽出残渣は水で十分洗滌し、凍結乾燥または減圧乾燥し、MWL・LCC 抽出残渣 (R) とした。M、B-LCC および R の 3 試料を酵素分解に供した。

2.2 酵素分解

試料 1 g を水 8 ml に懸濁し、酵素溶液 10 ml (1 g 酵素/10 ml 水)、酢酸緩衝液 (pH 5.5) 2 ml, トルエン数滴を加え、40°C, 7 日間酵素分解した。酵素分解率は分解液に含まれる還元糖をベルトラン法により測定し求めた。酵素としてヘミセルラーゼ (H) (*Rhizopus mold*, type II, Sigma) とセルラーゼ (C) (*Rhizopus mold*, type III, Sigma) を使用した。

2.3 酵素分解残渣の分別

M (および R) の酵素分解残渣はフローシートに基づき分別した。すなわち試料 M は酵素分解し、分解液を遠心分離した。分解残渣はジオキサン-水 (D:W) (9:1) 中に 48 時間浸漬し、遊離のリグニンを M-H-MWL として除き、次いで酢酸-水 (A:W) (1:1) 中に 7 日間浸漬し、LCC (M-H-LCC) を抽出した。これらを抽出した残渣 (M-H-R) は Björkman の標準法で処理し、B-MWL と B-LCC の相当部分を各々 M-H-R-MWL と M-H-R-LCC として単離し、最終の抽出残渣木粉を M-H-R₂ とした。酵素分解液は減圧濃縮し、限外ろ過により 1000 以下



Flow sheet Fractionation of products from Milled Wood

の分子量部分をろ別し、酵素分解ろ液とした。試料 R も同様に処理し、M の代わりに R の頭文字で各分別物を表わした。B-LCC の酵素分解残渣は D-W (9:1) 中で、40°C、7 日間かくはん抽出し、抽出物は B-MWL の精製法に基づき処理した。すなわち抽出物 1g を A-W (9:1) 20 ml に溶解し、不溶物 (LCC-H-1) を除き、可溶部は水 230 ml に沈殿し、回収した。沈殿は十分乾燥し、ジクロロエタン-エタノール (2:1) 20 ml に溶かし、不溶部 (LCC-H-2) を除き、可溶部を乾燥エーテル 230 ml にかくはん投入し、LCC-H-MWL を沈殿として回収した。各試料から分別した MWL と LCC 相当部は Björkman の精製法で精製した。粗 M-H-LCC は DMF (ジメチルホルムアミド) に溶解し、不溶部を M-H-LCC-1 として除き、沈殿回収し可溶物は A-W (1:1) に溶かし、アセトンで沈殿精製し、M-H-LCC-2 とした。

2.4 ニトロベンゼン酸化

クラフソン・リグニン 100 mg を含む試料に 1 ml のニトロベンゼン、18 ml の 2N-NaOH を加え、20 ml 容オートクレーブ、180°C、2.5 時間酸化分解した。分解液は SO₂ 水で酸性としエーテル抽出した。抽出残液は 20% H₂SO₄ で酸性とし、SO₂ を N₂ 気流で除き、クロロホルム-アセトン (1:1) 抽出し、抽出物をアルデヒド部とした。エーテル抽出液は飽和 NaHCO₃ 水で逆抽出し、NaHCO₃ 層は 20% H₂SO₄ で酸性とし、クロロホルム-アセトン (1:1) 抽出して抽出物を酸性部とした。酸性部はジアゾメタンで数回メチルを繰り返し、ガスクロマトグラフィーで分析した。アルデヒド部に含まれるバニリンもガスクロマトグラフィーで分析し、相対面積を比較した。酸性部のガスクロマトグラフィーマススペクトル分析は分子イオン 196 のベラトロム酸メチルエステルの他に、分子イオン 182 と 198 の化合物の存在を示した。

2.5 糖の分析

MWL フラクションに含まれる糖の定量は O-アミノジフェニル-酢酸法⁶⁾により行った。構成糖の分析⁷⁾は単糖類を糖アルコールアセテートに変え、ガスクロマトグラフィーにより行った。

2.6 UV スペクトル分析

リグニン試料はメチルセロソルブ (MCS) に溶解し、測定した。フェノール性水酸基量は 4ε 法⁸⁾により測定した。MCS 不溶物は 1.6 N-KOH に溶解し、酢酸酸性として測定した。LCC のリグニン量は UV スペクトルによる MWL の検量線を使い測定した。

2.7 IR スペクトル分析

IR スペクトルは KBr 錠剤法により測定した。スペクトルの分析は 1500 cm⁻¹ の吸光度に対する主要吸収帯の相対吸光度を測定し行った。

2.8 p-ヒドロキシベンジルアルコール基の定量

2~3 mg のリグニンを 10 ml 容メスフラスコに採り、0.06% キノンメチド-MCS 溶液 2 ml、0.04% KOH-MCS 溶液 2 ml を加え、全容を 10 ml とし、時々かくはん下 3 時間放置し、生じたインドフェノール量を 640 mμ の吸光度により測定した。バニリルアルコールの検

量線から官能基含量を測定し、リグニンのフェニルプロパン単位 210 に対する p-ヒドロキシベンジルアルコール単位を計算した。

3. 結果と考察

3.1 酵素分解

各試料に対するヘミセルラーゼ活性は $LCC > M > R(\text{凍結乾燥}) \geq R(\text{減圧乾燥}) > \text{ホロセルロース}(\text{加熱乾燥})$ の順となり、凍結と減圧乾燥による試料の間に明白な相違を示さず、加熱乾燥したホロセルロースは既報⁹⁾のように活性度が低かった。LCC は R の 1.5 倍の活性を示した。酵素分解曲線は最初の 1 日間でほぼ最高の分解率に達し、以後漸次増加することを示し、2 倍量の酵素使用量はほぼ 2 倍の活性度を示した。これは木粉と酵素との不均一反応によると考えられる。ヘミセルラーゼとセルラーゼの間には明白な活性の特異性は認められなかった。

3.2 磨砕木粉 (Milled Wood) の酵素分解

磨砕木粉 (M) をヘミセルラーゼ (H) により分解し、分解残渣をフローシートに基づき溶解分別した。PEW⁵⁾の結果と異なり、M と M-H-R は 2N-NaOH にほとんど溶解せず、M-H-R₂ も一部不溶であった。このことは PEW による低温乾式磨砕に比べてこの実験の磨砕が不十分なためによるものであり、酵素に対する磨砕木粉の活性度の減少と炭水化物に対する酵素分解の顕著な興味ある選択性を生じる結果となった。M とそのフラクションの分析結果を Table 1 に示した。M から M-H-R への過程において、マンノース残基の 76% が溶出するのに対し、キシロースとグルコース残基の溶出は各々 40 と 10% であった。グルコース残基の僅少な溶出は磨砕によるセルロース結晶領域の分解 (非晶化) と酵素分解が不十分なためであろう。酵素分解残渣の浸漬抽出残部である M-H-R に BJÖRKMANN の標準法を適用すると、MWL (M-H-R-MWL) (全リグニンの 20%) は温和な磨砕による B-MWL (25%)¹⁰⁾ とほぼ同一収量でえら

Table 1. Analyse of fractions from M-Wood by hemicellulase

	Yield (%)	K. Lignin (%)	Distribution of Lignin (%)	Sugars (%)				
				Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.
M-Wood	100	27.1	100	3.9	14.5	26.2	0.0	55.4
M-H-R	64.4	23.7	56.2	3.2	11.9	9.2	2.6	73.1
M-H-R ₂	33.7	12.5	15.5	1.5	4.7	4.8	0.9	88.1
M-H-LCC ₁	1.9	26.1	1.8	6.5	19.1	6.9	39.8	25.7
M-H-LCC ₂	3.1	20.6	2.4	4.9	18.8	8.2	46.7	21.3
M-H-R-LCC	12.3	28.9	13.9	2.4	19.9	50.9	9.3	17.5
LCC	(13)	38.2	—	4.1	20.3	48.7	9.3	17.6
M-H ₂ -R ₂	23.9	12.7	11.2	1.6	3.4	2.2	0.0	92.8
M-H ₃ -R ₂	22.8	12.1	10.1	1.4	3.1	1.4	0.0	94.1

() = Obtained from one reference

れ、LCC (M-H-R-LCC) もまた B-LCC とよく似たクラークソン・リグニン含量と構成糖割合を有し単離された。MWL と LCC の抽出残部 M-H-R₂ は M の 33.7% の収量でえられ、このフラクションは分析結果からグルコース残基とリグニンから構成されている LGC (lignin-glucan complex) であった。M-H-R₂ を更に酵素分解し、えられる浸漬抽出残部 M-H₂-R₂ は M の 23.9% に減少し、再々度の酵素分解による M-H₃-R₂ は 22.8% ともはや分解されないことを示唆した。M-H₂-R₂ と M-H₃-R₂ は 12.7 と 12.1% の各クラークソン・リグニンをもち、グルコース残基の割合が 92.8% と 94.1% と更に増加した。M-H-R に Björkman の標準法を適用すると、溶出したリグニンのおよそ 80% は MWL と LCC のリグニンとして回収され、M-H-R₂ のリグニンを加算するならば M-H-R から溶出したリグニンのおよそ 100% を回収することが出来た。Goring^{10,11)} らは紫外線顕微鏡写真法を使い、トウヒ材の細胞膜のリグニン分布を研究し、細胞間層に春材で 28%、秋材で 18%、残りの各 72 と 82% のリグニンが 2 次膜に均一分布していることを明らかにし、Kallmes¹²⁾ はエゾマツの未晒亜硫酸パルプの即解ふるい分けにより木材組織におけるヘミセルロースの分布を研究し、多糖類の組成の同一性を結論した。ドイツウヒとヨーロッパアカマツによる研究¹³⁾ では両者の各膜層の多糖組成が非常に類似し、S₁ および S₂ 外層にセルロース含量が高く、グルコマンナン含有量は細胞膜の外側から内側に向って漸増し、アラビノグルクロノキシランは S₃ 層に集積されていることを報告している。M-H-R-MWL が B-MWL とほぼ同じ収量でえられたこと、M-H-R-LCC の構成糖割合とリグニン含量が B-LCC のものと酷似すること、およびマンノース残基の溶出が他の残基に比べて著しいという M からの結果は前述の知見により十分説明される。すなわち、エゾマツ磨砕木粉 M はその微細木粉の周辺部において酵素と反応して、炭水化物を分解し、マンノース残基の 70% を溶出し、酵素活性の低い α -(1→6) 結合したガラクトース残基を多量に含む M-H-LCC と 2 次膜の分解部分のリグニンより M-H-MWL そして分解不十分な部分を水溶性部として溶出する。微細木粉の内部に存在する 2 次膜成分は酵素と接触しえないために加水分解を受けない。引き続き M-H-R の磨砕抽出操作で、セルロースの機械的崩壊が進み、これら 2 次膜成分のリグニンとヘミセルロースは M-H-R-LCC として溶出する。従って、M-H-R-LCC は酵素分解を受けておらず、B-LCC と酷似する。M-H-R-MWL は標準法による B-MWL の収量¹⁴⁾ とほぼ一致し、膨潤溶解した細胞間層リグニンと考えられる。1g 木粉の磨砕、抽出操作による B-MWL の収量増加¹⁵⁾ は 2 次膜から溶出した B-LCC のリグニンに由来すると推定され、B-LCC の酵素分解または B-LCC の再磨砕による MWL の単離はその結論を支持する。2 次膜リグニンのおよそ 80% は B-LCC の構成成分として溶出し、全リグニンの 15% に当る残りの 20% のリグニンはヘミセルロースと一緒に溶出されず、M-H-R₂ (LGC) のリグニンとして残存する。残存する LGC のリグニンの不溶性が化学構造特性によるのかまたはセルロースとの密接な相互関係によるのか検討することは興味深い。そのために M、M-H-R および M-H-R₂ のニトロベンゼン酸化分解を行い、その酸性部のメチル化物のガスクロマトグラムの 1

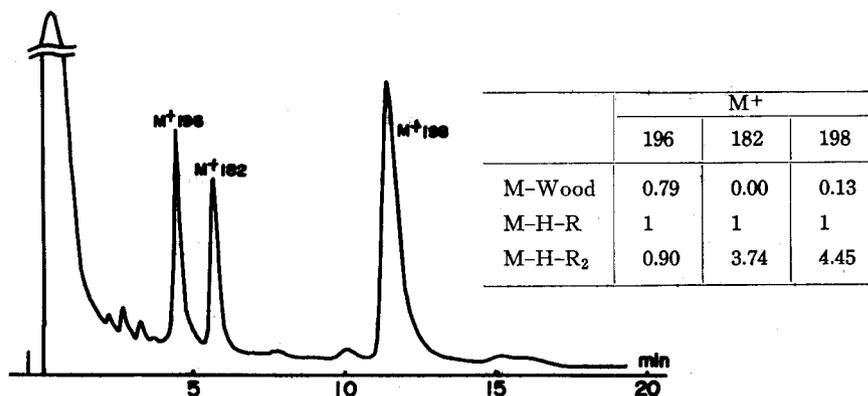


Fig. 1. Gas chromatogram of methylated acidic fraction by alkaline nitrobenzene oxidation of M-H-R₂. (Silicone grease 10% on Diasoid M, 2 ml column, 200°C, 60 ml/min.)

Table 2. Nitrobenzene oxidation of fractions from M-Wood

	Aldehyde		Acid	
	Total Yield (%)	Vanillin	Total Yield (%)	Vanillic acid
M-Wood	27.7	1	30.8	1
M-H-R	51.2	1.78	23.4	1.3
M-H-R ₂	32.2	0.74	44.8	1.1

例と分析結果を Fig. 1 と Table 2 に示した。アルデヒド部と酸性部の総収量は各々クラウン・リグニンの 60, 74, 77% であり, M-H-R₂ の酸性部の収量 44.8% は M-H-R のほぼ倍量であった。バニリン相対量は全く反対の傾向を示した。ニトロベンゼン酸化に関するモデル実験¹⁴⁾によれば, 酸性部の収量はフェニルプロパン側鎖の α -炭素がエーテル結合したり, カルボニル基であったり, またはフェノール性水酸基の O 位が縮合していると増加する。酸性部のベタトロム酸メチルエステル (分子イオン M⁺ 196) の相対比に顕著な相違は存在しなかったが M⁺ 182 と 198 の 2 個の化合物が M-H-R と M-H-R₂ の各酸性部において顕著に存在した。M⁺ 182 の化合物は m/e 165 (M-17), 152 (M-30), 137 (M-47) 等を持ち, O-バニリン酸又はバニリン酸のメチルエステルと推定されるが, 数回のメチル化においても遊離のカルボキシル基の存在することに多少の疑問を持つ。M⁺ 198 の化合物は m/e 169, 141, 105, 91, 77 を持ち, その構造については検討中である。以上の結果は M-H-R₂ (LGC) に含まれる残存リグニンが他の溶出リグニンと多少性質を異にすることを示唆する。

3.3 MWL・LCC 抽出残渣木粉の酵素分解

MWL・LCC 抽出残渣木粉試料 (R) を調製するために, LCC 抽出溶媒として一般的な DMF や DMSO の代りに揮発性の比較的良好な酢酸-水 (A:W) (1:1) を使用した。R の凍結と減圧による乾燥試料間に酵素活性の相違が認められなかったため, 後者による試料を以後の実験に使用した。R はヘミセルラーゼ (H) とセルラーゼ (C) の二つの酵素で分解し, 分解残渣は

Table 3. Analyse of fractions from R-Wood treated by enzymes

	Yield (%)	K. Lignin (%)	Distribution of Lignin (%)	Sugars (%)				
				Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.
R-Wood	100	17.9	100	2.1	11.9	16.0	3.6	66.4
R-H-R ₂	55.8	14.0	43.6	12.4	11.7	4.0	1.0	70.9
R-H-R-LCC	11.3	22.3	14.1	6.5	31.8	29.2	16.9	15.5
R-H-R-MWL	2.5	(89.2)	12.5	—	—	—	—	—
R-C-R ₂	76.6	13.7	58.7	4.0	4.1	5.4	1.3	85.2
R-C-R-LCC	5.0	71.6	20.0	9.0	33.3	28.6	19.9	9.2
R-C-R-MWL	2.2	(89.1)	11.0	—	—	—	—	—
R-H-R ₂ -H-R	32.4	31.3	56.5	1.4	2.2	2.7	0.0	93.7
R-C-R ₂ -H-R	46.0	28.4	73.0	1.5	5.2	3.6	0.0	89.7

H=hemicellulase; C=cellulase; ()=Calculated by calibration with B-MWL

ジオキサン-水 (9:1) で浸漬抽出し、次に Björkman の標準法で処理した。MWL と LCC を抽出した酵素分解残部である R-H-R₂ と R-C-R₂ は各々 R の 56 と 77% の収量でえられ、R のリグニンの 44 と 58% を含む (Table 3)。MWL・LCC 抽出残渣木粉 R は磨碎木粉 M と異なり複合細胞間層、すなわち酵素との接触を妨げる層を持たない。従って R の分解抽出残渣 (R-H-R または R-C-R) から A-W (1:1) で抽出した R-H-R-LCC または R-C-R-LCC は部分的な酵素分解を受けた LCC 部分となるために、それらの構成糖の相対割合は B-LCC や M-H-R-LCC と異なり、いずれもガラクトースとキシロース残基に富むことを示した。R-C-R-LCC の収量は低かったが、高リグニン含量のために、R の全リグニンに対する分布割合は 14.1 と 20.0% と近似した。R-H-R-MWL と R-C-R-MWL は共に 11.0% の糖含量を含み、リグニンの分布割合も 12.5 と 11.0% で非常に良く一致した。以上の結果、MWL・LCC 抽出残渣木粉 R はなお MWL と LCC として溶出される 30% ほどのリグニン部分と LGC (R-H-R₂ と R-C-R₂) として溶出されない 70% ほどのリグニン部分に分別された。後者である R-H-R₂ と R-C-R₂ は R リグニンの 44 と 59% を含む、R リグニンが全リグニンのおよそ 40% を占める¹⁰⁾ とするならば、各々のリグニンは全リグニンの 18% と 24% となる。従って M-H-R₂ (LGC) の 16% という値と比較的良く一致する。両者を更にヘミセルラーゼで分解し、D-W (9:1) と A-W (1:1) で順次浸漬抽出した分解残渣 R-H-R₂-H-R と R-C-R₂-H-R は共に 40% ほどの重量減少を示したが、M-H₂-R₂ と多少異なり、リグニン含量の顕著な増加を示した。各々 130 と 125% のクラークソン・リグニンの回収率を示した。これは R-H-R₂ と R-C-R₂ のクラークソンリグニン測定の際に水溶性リグニンとして溶出した部分が酵素処理により不溶性に変化し、定量されたものと考えられる。グルコース残基の割合は両者とも 93.7 と 89.7% に増加した。従って、LGC としての M-H-R₂ と多少異なるが、R も又不溶性リグニンを含む LGC に相当する

R-H-R₂ と R-C-R₂ を最終残渣として生じた。

3.4 LCC の酵素分解

MWL 抽出残渣を A-W (1:1) で3カ月間抽出し、単離した粗 LCC を常法に従って精製し、ヘミセルラーゼにより酵素分解した。分解残渣から D-W (9:1) により抽出された粗 MWL は Björkman の精製法で分別し、LCC-H-1, LCC-H-2 および LCC-H-MWL に分画した。D-W (9:1) 不溶部 LCC-H-R と LCC-H-1 は 80% 酢酸水溶液, メチルセロソルブに不溶, 1.6 N-KOH 水溶液に可溶であり, LCC-H-2 と LCC-H-MWL はこれらの溶媒に可溶であった。各フラクションの分析結果を Table 4 に示した。B-MWL に相当する LCC-H-MWL は LCC リグニンの 11.8% の収量であったが, 90% 以上のリグニン含量を含むフラクションを加えると 40% の収量となり, LCC の磨砕による MWL の収量¹⁰⁾ と近似した。Fig. 2 に UV スペクトル曲線を示した。280 m μ の極大吸収に対する 263 と 320 m μ の相対吸光度において, LCC-H-MWL のそれらは B-MWL とよく一致したが, 他のフラクションはいずれも相対値が大きく, LCC-H-R では 0.99 と 0.64 に達した。4 ϵ 曲線の極大吸収を示す 4293 m μ の相対値は易溶性の LCC-H-MWL と LCC-H-2 で 0.18 と一致し, LCC-H-R では特異的であった。LCC-H-R のスペクトル分析結果は酵素変質物の混入を示唆し, その元素分析値は N 0.35% と黒色残留物 24.5% の存在を示した。LCC-H-R の再酵素分解残渣 LCC-H-R-H-R は 30% の重量減少でえられ, リグニン含量, 構成糖, N 含量, 黒色残留物にほとんど変化を生じなかった。LCC 中に異質なリグニンが存在するという点から LCC-H-R はなお検討の余地を残すが, LCC の酵素分解により粗 MWL を LCC のリグニンの 40% の収量で生成したことは興味深く, 先の LCC の磨砕による MWL の単離¹⁰⁾ がリグニン分子の磨砕による低分子化に基因せず, 多糖類の分解による結果であることを示唆すると推論される。ヘミセルロース分別沈殿剤による LCC の分別⁷⁾ と酵素分解法の併用は LCC 中のリグニンと多糖類の相互関係に更に詳細な知見を与えるものと考えられる。

Table 4. Analyse of fractions from LCC by-hemicellulase

	Yield (%)	K. Lignin (%)	Distribution of Lignin (%)	Sugars (%)				
				Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.
LCC	100	38.2	100	4.1	20.3	48.7	9.3	17.6
LCC-H-R	12.4	29.7	9.6	8.5	20.9	18.9	34.0	17.7
LCC-H-1	5.2	(91.4)	12.6	6.0	8.0	16.4	38.3	21.3
LCC-H-2	6.2	(90.1)	14.7	8.4	28.7	31.1	23.0	8.8
LCC-H-MWL	5.1	(89.3)	11.8	—	—	—	—	—
LCC-H-R-H-R	8.7	32.7	7.4	7.2	14.9	11.7	23.6	32.6

() = Calculated by calibration with MWL

3.5 単離 MWL の比較

各試料から単離した MWL を B-MWL と比較検討した (Table 5, 6)。R-H-R-MWL と R-C-R-MWL の分析結果は全ての点でよく一致した。B-MWL はその糖含量に比べて元素分析値、 $E_{280}^{0.1\%}$ が従来の結果⁵⁾ よりも幾分低い値を示した。LCC-H-MWL はフェノール性水酸基と p-ヒドロキシベンジルアルコール基含量が他の MWL に比べて顕著に低く、再度酵素分解しえられる残渣 LCC-H-MWL-H は p-ヒドロキシベンジルアルコール基が 2.7 倍も増加し、僅少のフェノール性水酸基の増加を示した。両官能基の増加に比べて炭水化物は僅少しか除去されなかった。これらの結果は LCC-H-MWL に含まれる炭水化物がリグニン分子と数カ所において結合した高分子であり、たとえリグニンの

フェニルプロパン側鎖の α -炭素と糖残基とのグリコド結合の部分的加水分解によっても溶出されえないことを示唆する。セルラーゼリグニンから調製したホロセルロースが高分子であ

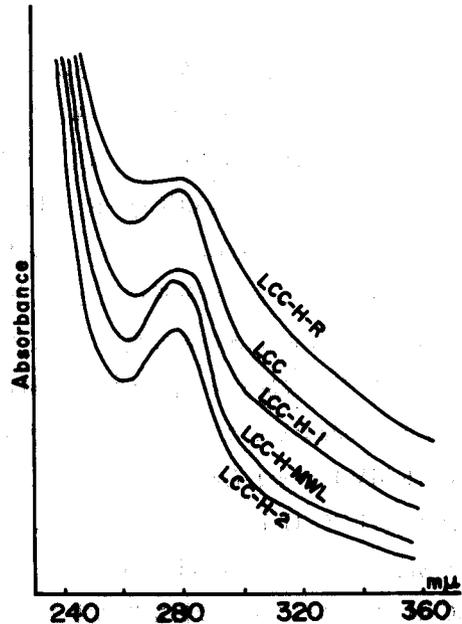


Fig. 2. UV spectra of fractions from LCC

Table 5. Analyse of samples of MWL

	Elementary analysis (%)			U.V.				Phenolic ¹⁾ OH (%)	P-hydroxy ²⁾ benzyl OH (%)	Sugars ³⁾ (%)
	C	H	O	$E_{280}^{0.1\%}$	$\frac{E_{263}}{E_{280}}$	$\frac{E_{320}}{E_{280}}$	$\frac{\Delta E_{293}}{E_{280}}$			
MWL	58.31	5.90	35.79	13.73	0.83	0.36	0.41	2.31	2.64	4.8
R-H-R-MWL	61.48	5.85	32.67	16.86	0.82	0.36	0.35	1.96	3.37	10.8
R-C-R-MWL	61.54	5.62	32.84	17.33	0.81	0.34	0.27	1.92	3.19	10.9
LCC-H-MWL	58.75	6.01	35.24	14.24	0.82	0.32	0.18	1.51	0.80	10.7
LCC-H-MWL-H	61.95	6.82	31.23	14.49	0.79	0.33	0.32	1.70	2.14	9.8

1) %=W/W; 2) %=units; 3) %=W/W

Table 6. Analyse of samples of MWL

	Ai/A ₁₅₀₀								
	1715	1640	1600	1460	1410	1370	1210	1110	1035
MWL	0.96	1.62	1.79	0.75	0.72	0.80	1.34	0.72	1.28
R-H-R-MWL	2.96	2.07	2.15	0.72	0.69	0.55	1.03	0.87	1.26
R-C-R-MWL	2.55	1.92	2.18	0.80	0.78	0.63	1.20	0.88	1.23
LCC-H-MWL	2.14	1.58	1.61	0.75	0.74	0.61	0.96	0.83	1.12
LCC-H-MWL-H	1.10	0.99	1.01	0.59	0.56	0.48	0.78	0.60	0.86

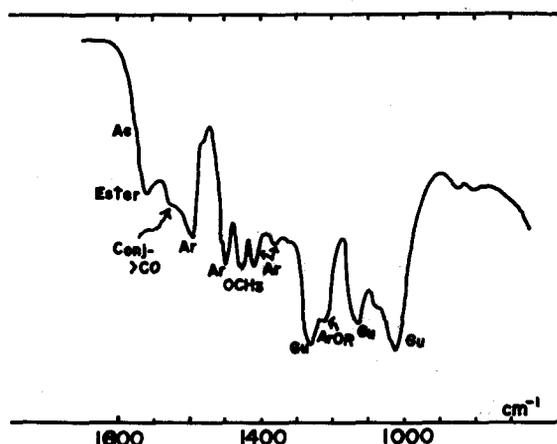


Fig. 3. IR spectrum of B-MWL, illustrating major group frequencies (Ac=Acetyl; Ar=Aromaticring; Gu=Uncondensed guaiacyl).

るといふ結果⁵⁾はこの見解を支持する。各 MWL の赤外線吸収スペクトルは 1500 cm^{-1} に対する相対吸光度により分析したが、顕著な相違を示さなかった。LCC-H-MWL の全般にわたる低い相対値は水分量の違いによる。以上の結果、LCC-H-MWL に酵素分解不十分なためによる興味ある分析値の多少の相違が見られたが、各 MWL 試料はよく似た結果を与え、IR に関しては、明確な比較はできなかつた。

4. 結 論

BJÖRKMAN による MWL はリグニン化学に関する研究試料として広範に利用されているが、全リグニンの高々 50% に過ぎず、MWL と残存リグニンの化学構造の同一性に対しては矛盾した結果も報告されており、必ずしも全リグニンを代表するとは言えない。従つて残存リグニンの化学構造と多糖類との相互関係を詳細に検討することは木材中の全リグニンを解明するために極めて重要である。この見地から我々は残存リグニンの単離、分別を試みた。エゾマツ (*Picea jezoensis*) 脱脂木粉から磨砕木粉 (M)、MWL・LCC 抽出残渣木粉 (R) および LCC を調製し、ヘミセルラーゼまたはセルラーゼにより酵素分解し、抽出残渣は更にボールミルで磨砕抽出した。PEW らに比べて、今回の比較的の不十分な磨砕条件の適用は酵素に対する多糖類のアクセシビリティに相違を生じ、興味ある結果を与えた。

(1) **M の酵素分解**: M は酵素分解により 35% の重量減少を示すが、MWL と LCC を僅少量しか生じない。この抽出残渣 M-H-R を磨砕抽出すると、更に 30% の重量減少を起し B-MWL¹⁰⁾ (全リグニンの 25%) に匹敵する収量の M-H-R-MWL (20%)、と B-LCC とほぼ同一組成を持つ M-H-R-LCC とを生じた。M-H-R-MWL は磨砕により溶解してきた細胞間層リグニンであり、M-H-R-LCC は複合細胞間層により保護され、酵素分解を受けなかつた S_1

層と S₂ 層のリグニン-ヘミセルロース (LCC) の一部と推論した。酵素に対して弱いアクセシビリティしか持たない M-H-R₂ は全セルロースの 70%, 全リグニンの 16% を含み, その組成から LGC (lignin-glucan complex) と命名した。LGC のニトロベンゼン酸化分解はバニリン相対比が小さく, 酸性部収量が高く, 他のフラクションとの相違を明白にした。

(2) **R の酵素分解:** R をヘミセルラーゼ (H) またはセルラーゼ (C) により酸素分解し, 抽出分解残渣を磨砕した。両酵素による分解物はほぼ同じ収量 (11.0 と 12.5%) で MWL を更に生じ, B-LCC とは多少組成を異にするが, R-H-R-LCC と R-C-R-LCC という構成糖割合のよく似た LCC を生じた。M の場合と同じく, R から LGC に相当する組成を有する R-H-R₂ と R-C-R₂ を単離した。これらは全リグニンのおよそ 20% のリグニンを含み, M-H-R₂ のリグニン量と酷似した。M と R の結果はエゾマツ木粉中のリグニンが細胞間層リグニン (20~30%) と 2 次膜リグニン (70~80%) に一般的に大別され, 2 次膜リグニンが更にヘミセルロースと一緒に溶出する LCC 部分 (40~50%) と不溶性 LGC 部分 (20~30%) に細分されることを示唆した。B-MWL の収量増加 (50%) は従って LCC として遊離した 2 次膜リグニンが更に LCC 多糖類の分解の進行により MWL として溶出したものと考えられる。

(3) **LCC の酵素分解:** M の結果により 2 次膜成分と考えられる LCC は酵素分解によって 90% 以上のリグニン含量を持つ粗 MWL を LCC リグニンの 40% の収量で生じた。これは BJÖRKMAN の LCC 磨砕による MWL の収量にほぼ匹敵し, LCC からの MWL の単離がリグニンの磨砕による低分子化によるのでないことを示唆した。

(4) **単離 MWL の比較:** UV・IR スペクトル分析は B-MWL, R-H-R-MWL, R-C-R-MWL, LCC-H-MWL の化学構造の類似性を示した。LCC-H-MWL は p-ヒドロキシベンジルアルコールとフェノール性水酸基含量が他の MWL と比べて低く, 特に前者が顕著であったけれども, 更に酵素分解を行うことにより改善された。しかし多糖類の分解, 溶出はあまり認められず, MWL に含まれる多糖類の結合様式に興味深い示唆を与える。

参 考 文 献

- 1) a. BJÖRKMAN, A.: "Extraction of lignin with neutral solvents." *Svensk Papperstid.*, **59**, 477-485 (1956).
- b. BJÖRKMAN, A. and PERSON, B.: "The properties of lignins extracted with neutral solvents from softwoods and hardwoods." *Ibid.*, **60**, 158-169 (1957).
- c. BJÖRKMAN, A.: "Extraction of lignin-carbohydrate complexes with neutral solvents." *Ibid.*, **60**, 243-251 (1957).
- d. BJÖRKMAN, A. and PERSON, B.: "Some reactions of the lignin extracted by neutral solvents from *Picea abies*." *Ibid.*, **60**, 285-292 (1957).
- e. BJÖRKMAN, A.: "The effects of milling." *Ibid.*, **60**, 329-335 (1957).
- 2) KLEPPE, P. J., CHANG, HOU-MIN., and ECKERT, R. C.: "Delignification of high yield pulp with oxygen and alkali. 1. Preliminary studies on Southern Pines." *Pulp Paper Mag. Can.*, **73**, 102-106 (1972).
- 3) 松倉紀男・構原 彰: "リグニン分子における化学結合様式の不均一分布について." *木材誌*, **15**, 35-

- 39 (1969).
- 4) ERICKSON, M., LARSSON, S. and MIKSCHE, G.: "Gaschromatographische Analyse von Ligninoxydations produkte. III. Zur Struktur des Lignins der Fichte." *Acta Chem. Scand.*, **27**, 903-914 (1973).
 - 5) PEW, J. C.: "Properties of powdered wood and isolation of lignin by cellulytic enzymes." *Tappi*, **40**, 553-558 (1957).
 - 6) 福井作蔵: 生物化学実験法. A. 一般分析法, 1. 還元糖の定量法. 東京大学出版会 (1969).
 - 7) 佐野嘉拓・榊原 彰: "ジオキサン-水によるリグニンの加水分解 (第8報), リグニン-多糖類複合体部分." 木材誌, **17**, 66-73 (1971).
 - 8) GOLDSCHMID, O.: "Determination of phenolic hydroxyl content of lignin preparation by ultraviolet spectraspectrometry." *Anal. Chem.*, **26**, 1421-1425 (1954).
 - 9) ERIKSON, KARL-ERIK., HOLLMARK, B. H. and PETTERSON, A.: "Enzymic attack on wood fibers." *Svensk Papperstid.*, **72**, 551-552 (1969).
 - 10) SCOTT, J. A. N., PROCTER, A. R., FERGUS, B. J. and GORING, D. A. I.: "The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood, Description and validity of the technique." *Wood Sci. and Techn.*, **3**, 73-92 (1969).
 - 11) FERGUS, B. J., PROCTER, A. R., SCOTT, J. A. N. and GORING, D. A. I.: "The distribution of lignin in sprucewood as determined by ultraviolet microscopy." *Wood Sci. and Techn.*, **3**, 117-138 (1969).
 - 12) KALLMES, O.: "Distribution of the constituents across the wall of unbleached spruce sulphite fibers." *Tappi*, **43**, 143-153 (1960).
 - 13) MEIER, H.: "Proceedings of the wood Chemistry Symposium." Montreal, Canada (1961).
 - 14) PEW, J. C.: "Nitrobenzene oxidation of lignin model compounds, spruce wood and spruce native lignin." *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2831-2833 (1955).
 - 15) SARKANEN, K. U. CHANG, HOU-MIN. and ALLAN, G. G.: "Species variation in lignins, II. Conifer lignins." *Tappi*, **50**, 583-587 (1967).

Summary

Milled wood lignin (MWL) has been used as a more preferable preparation in lignin chemistry as it has been presumed not to suffer any serious chemical change during the preparation process. However, there has been considerable doubt whether MWL may not be representative of all types of lignin, since its yield exceeds hardly more than 50% of Klason lignin in wood.

And there have been some conflicting results in works concerning the heterogeneity of lignin structures. The present work was designed so to gain a clue to heterogeneity in various fractions obtained from enzyme digestion of LCC and R (wood residue after removing MWL and LCC). Milled wood (M) was also used as a reference to this treatment. They were subjected to enzyme digestion followed by extraction in a vibratory ballmill for 48 hrs. and fractionation was performed according to the standard method of BJÖRKMAN. M and R prepared by the milling of wood at room temperature were only slightly soluble in 2N NaOH and neutral cellulose solvents such as 60% lithium bromide solution, a solubility behavior different from that proposed by PEW. It is very probable that crystalline regions of cellulose still remained after the milder vibratory grinding, and this may be the reason for their lower accessibility to the enzyme. However, it gave favorable selectivity to the enzyme digestion of the

polysaccharides in the wood.

1. Digestion of milled wood (M) with hemicellulase (H)

After enzyme digestion, about 35% (wt.) of M was removed by successive extractions with the solvents, dioxane-water (D-W 9:1) and acetic acid-water (A-W 1:1). The extracted residue (M-H-R) contained 56.2% of lignin in M. Yields of D-W soluble fraction (M-H-MWL) and A-W soluble fraction (M-H-LCC) were 1 and 5%, respectively. The latter contained more galactose residue (about 40%) than that in the wood. The extraction of M-H-R with D-W (9:1) in the vibratory mill followed by A-W (1:1) extraction gave further MWL and LCC, yields of which were 5.2 and 12.3% of M, respectively. In consideration of the yield of MWL (M-H-R-MWL, 20% of the lignin in M) corresponding to that of B-MWL (25%) prepared by standard BJÖRKMAN procedure, MWL fraction eluted first from the wood with the milder vibratory milling may probably belong to the lignin in middle lamella, judging from its yield and ease of dissolution. Purified M-H-R-LCC contained all five sugar residues with the same composition as that of B-LCC (prepared by standard BJÖRKMAN procedure).

This fact may indicate that the carbohydrates in M-H-R-LCC could probably be derived from the secondary walls (mainly from S_1), which were highly resistant to enzyme digestion.

The final residue (M-H- R_2) from M-H-R, amounting to 33.7% of M, was mainly constituted of lignin and cellulose, and was designated as LGC (lignin-glucan complex). When LGC containing 15.5% of all lignin in M was further digested and then dispersed in the solutions, the soluble part amounted to 30%. The residue (M-H₃- R_2) was treated further with the enzyme, giving a fraction (M-H₃- R_2) in 96% yield. M-H₃- R_2 showed little susceptibility to the enzyme. M-H₂- R_2 and M-H₃- R_2 (LGC) contained 11.2 and 10.1% of Klason lignin in the starting material, and 92.8 and 94.1% glucose residue, respectively. It is likely that the insoluble residual lignin in LGC is strongly associated with cellulose and/or possesses a different structure from those of other fractions. To account for this problem, the lignin in LGC, M, M-H-R and M-H- R_2 fractions was subjected to alkaline nitrobenzene oxidation, and compared by the relative yields of oxidative products using gas chromatography. M-H- R_2 gave a large quantity of acidic products and a lower relative value of vanillin. Therefore, the insoluble lignin in LGC is clearly distinguished from those of other fractions.

2. Digestions of wood residue (R) after removal of MWL and LCC with hemicellulase and cellulase treatments

Digestions of wood residue (R) with hemicellulase (H) and cellulase (C) followed by extraction caused the dissolution of 44.2 and 23.4% of the wood residue, respectively, and gave further R-H-R- and R-C-R-MWL fractions (12.5 and 11.0% of lignin in R, respectively). The residues R-H- R_2 and R-C- R_2 contained 55.8 and 58.7% of lignin in R, respectively. The insoluble lignin in LGC is, therefore, supposed not to be a probable artifact which might be formed by the treatment of aqueous acetic acid solution. Successive digestions of R-H- R_2 and R-C- R_2 with hemicellulase caused about 40% of them to be soluble and the yields of their Klason lignin to increase (130% and 125% of the original fractions, respectively). These increases may have originated from

the cleavage of the chemical bonds between lignin and carbohydrate by the enzyme. It may be assumed, therefore, that the lignin structures of R-H-R₂ and R-C-R₂ fractions are probably sensitive toward acid hydrolysis.

3. Digestion of LCC with hemicellulase

Seventy one percent of LCC became soluble during enzyme digestion and gave crude MWL amounting to 16.5% (corresponds to 40% of the lignin in LCC), which was soluble in the solution of D-W (9:1). The yield of crude MWL from LCC obtained by enzyme digestion agrees very closely with that obtained by BJÖRKMAN, who grounded LCC in a vibratory ball mill (50% of LCC lignin). Fraction LCC-H-MWL (see Flowsheet) is quite similar to B-MWL, but the others are slightly different. Fraction LCC-H-R, which is the dioxane-water insoluble residue, differs significantly from the other fractions.

4. Comparison of MWL fractions and other fractions

It may be valuable to know whether their MWLs have noticeable chemical differences. The discussion here is limited only to the results of elementary and spectral analyses. They are quite similar to each other in their values of relative absorbance of UV and IR spectra, but not in elementary analysis and values of $E_{280}^{0.1\%}$. Very interestingly, the content of p-hydroxybenzyl alcohol groups in LCC-H-MWL was much lower, but indicated a normal value after further digestion. It may be seen that enzyme digestion is not adequate for the cleavage of benzyl ether linkages with carbohydrates. Fraction LCC-H-MWL showed very low contents of p-hydroxybenzyl alcohol groups and free phenolic hydroxyls compared to the other MWL-fractions. The residue (LCC-H-MWL-H) obtained after further enzyme digestion revealed about 2.7 times as much contents in those functions as before. It is compared with those of other MWL-fractions. If the increased functions were derived from the cleavage of benzyl ethers with sugar residues, the carbohydrate content of LCC-H-MWL-H would have decreased considerably. This, however, was not the case. This fact may indicate that the residual carbohydrate in the enzyme-treated lignin has high degree of polymerization and is firmly linked to the lignin moieties.