

(参考英論文 1)

Efficient Digestion and Structural Characteristics of Cell Walls of Coffee Beans

コーヒー豆細胞壁の効率的な消化と構造特性

Screening of effective food-processing cellulase for digestion of cell walls of coffee beans was carried out, and the cellulase from *Trichoderma* sp. was selected. The digestion of the cell walls of green and roasted coffee beans was carried out by sequential procedures of alkali boiling (0.1 M Na₂CO₃ buffer, pH 10, and 0.1 M NaOH), cellulase digestion autoclaving with 0.1 M NaOH, and cellulase redigestion. The total digestion yields were >95 and >96%, respectively. The cell walls became thin, and the final residues of the cell walls were easily broken into small pieces. The neutral sugar analysis of the digestion or the extract and the residues and the microscopy observations with staining with toluidine blue O, Yariv reagent, and calcoflour for the residue in each step were investigated. Four structures, the galactomannan-cellulase(center part), the membrane of the arabinogalactan protein, the cellulose-rich galactomannan layer, and the arabinogalactan protein-rich layers (outer part), were found in the cell walls.

コーヒー豆細胞壁分解のための効果的な食品加工セルラーゼ分解の選別が行われ、トリコデルマ属由来のセルラーゼが選択されました。

生豆、焙煎コーヒー豆の細胞壁の分解はアルカリ煮沸(pH 10 に調製した 0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液、又は 0.1 M 水酸化ナトリウム)、0.1 M 水酸化ナトリウムと共に高圧蒸気滅菌 (オートクレーブ処理)、セルラーゼ再分解の連続した手順によって行われました。

全体の分解率はそれぞれ生豆 95 % と焙煎豆 96 % にもなりました。

細胞壁は薄くなり、細胞壁の最終的な残存物は小片に容易に分解されました。

分解又は抽出物と残存物の中性糖分析、及び分解の各段階でトルイジンブルーO、ヤリブ試薬及び Calcoflour による染色を用いた顕微鏡観察が、研究されました。

4 つの構造、ガラクトマンナン・セルラーゼ(中央部)、アラビノガラクトタン・たんぱく質の膜、セルロースに富むガラクトマンナン層、アラビノガラクトタン・多たんぱく質層(外相部)が細胞壁の中で発見されました。

INTRODUCTION

Coffee is considered to be a major tasty drink. The worldwide production of coffee beans is >5 million tons (1). Coffee beans have insoluble and thick cell walls (>48% of the beans weight), which are mainly made of galactomannans, arabinogalactans, and cellulose (2-10). The cell wall has been studied, but its detailed composition is still unknown over the past 40 years (2, 8).

Analysis of the composition requires it to be solubilized or extracted, but the cell walls are hard to digest or solubilize.

The residues after the coffee extraction, which are the cell walls, are also not able to be used (8). The residues and the wastes are difficult to treat (12, 13), although mannan, galactomannan, and arabinogalactan of the cell walls are expected for use as a food material (14). Many researchers have been studying the cell walls. Recently, Oosterveld et al. reported in detail the chemical extraction of the green and roasted coffee beans, the compositions, and the changes in galactomannan, arabinogalactan, and cellulose or xyloglucan (4, 5). Fischer et al. also reported the chemical extraction of the mannan and its structures (3). Redwell et al. reported arabinogalactan or the arabinogalactan proteins using stepwise chemical and alkaline extraction, and the observation of some mannan layers of the cell walls using the mannan antibody (6, 8, 9). These results are important information about the cell walls of the coffee bean. However, the insolubility of the cell walls makes them difficult to analyze and use (2, 8). Galactomannan is the main insoluble polymer of carbohydrates (4, 5). Some arabinogalactans are tightly cross-linked with protein (2, 6-9). Glucan is proposed to exist as a mannan-cellulose in the cell walls (2). These characteristic compositions and structures would prevent

the digestion and extraction for a long time. We have been studying the efficient digestion of the soybean and its characteristics (15-17). Coffee is also a bean; thus, the principal structures of the cells are similar (15, 17). We carried out an investigation to determine an effective treatment and enzyme screening for the efficient digestion of the green and roasted coffee beans and achieved efficient digestion of the cell walls (>95%). We also show an outline and the structural characteristics of the cell wall based on the results of the efficient enzymatic digestion, the sugar composition from the digestion, the extracts, and the residues or the microscopy observation of the residual cell walls using toluidine blue O, Yariv reagent, and calcofluor staining in each procedure. At least four structures, the galactomannan-cellulose (center part), the membrane of the arabinogalactan protein, the cellulose-rich galactomannan layer, and the arabinogalactan protein rich layers (outer part), were found in the cell wall.

【序論】

コーヒーは、主要な飲み物であると考えられます。

コーヒー豆の世界的な生産は 500 万トンです(1)。

コーヒー豆は、不溶性で、主にガラクトマンナン、アラビノガラクトタン、およびセルロース(2-10)で構成される厚い細胞壁(豆重量の 48%以上)を持っています。

細胞壁は研究されていますが、その詳細な組成はこの 40 年(2, 8)の間でまだ十分には知られていません。

組成の分析は、可溶化または抽出が必要ですが、細胞壁は分解または可溶しづらいです。

コーヒー抽出後残渣の細胞壁は、まだ扱うことが出来ません(8)。

残渣と廃棄物は扱いづらい(12, 13)ですが、細胞壁のマンナン、ガラクトマンナン、アラビノガラクトタンは食品材料として期待されます(14)。

多くの研究者は、細胞壁を研究しています。

最近、オストヴェルド等は、コーヒー生豆、焙煎豆の化学的な抽出の詳細と、ガラクトマンナン、アラビノガラクトタン、セルロース又はキシログリカンの組成、変化を報告しました(4, 5)。

フィッシャー等もまた、マンナンの化学的な抽出と構造を報告しました(3)。

レグウェル等は、アラビノガラクトタン又はアラビノガラクトタンタンパク質の化学的な段階を踏んだアルカリ抽出と、マンナン抗体を使った細胞壁のいくつかのマンナン層の観察を報告しました(6, 8, 9)。

これらの結果は、コーヒー豆細胞壁についての重要な情報です。

しかしながら、細胞壁は不溶性により、分析や使用が難しいです(2, 8)。

ガラクトマンナンは、炭水化物の主要な不溶性重合体です(4, 5)。

いくつかのアラビノガラクトタンは、タンパク質と強く架橋しています(2, 6-9)。

グルカンは、細胞壁のマンナンセルロースとして存在していることを提唱されました(2)。

これらの特徴的な組成と構造は、長い時間、分解と抽出を防いでいます。

私達は、大豆の効果的な消化と特徴を研究してきました(15-17)。

コーヒーもまた豆です。従って、細胞の主要な構造は似ています(15, 17)。

私達は、コーヒー生豆と焙煎豆の効果的な分解のための酵素選別と効果的な処理を決定する為に調査を行い、細胞壁の効果的な消化(95%以上)を達成しました。

私達はまたアウトラインと効率的な酵素の分解、分解からの糖組成、抽出、および残渣または各手段の中で染色しているトルイジンブルーO、ヤリブ試薬、および Calcofluor を用いて残りの細胞壁を顕微鏡使用し観察結果に基づいた細胞壁の構造特性を示します。

少なくとも 4 つの構造、ガラクトマンナンセルロース(中央部分)、アラビノガラクトタンタンパク質の膜、セルロースに富むガラクトマンナンレイヤー、およびアラビノガラクトタンのたんぱく質に富むレイヤー(部分)が細胞壁の中で発見されました。

MATERIALS AND METHODS

【素材と方法】

Green and Roasted Coffee Beans. Coffee beans (*Coffea arabica*), the roasted coffee beans, and their cracked and milled powders were gifts from UCC Ueshima Coffee Co., Ltd., Kobe, Japan. The defatted powder samples were prepared with a 10-fold volume of hexane extraction at room temperature for 24 h. The sample was then washed with hexane and dried at room temperature.

【コーヒーの生豆、焙煎豆】

コーヒー豆(アラビカ種)、焙煎コーヒー豆、ひびが入ったもの、脱脂された粉は日本の UCC 上島珈琲(神戸)からの贈り物でした。

脱脂した粉末試料は 24h、10 倍量を室温でヘキサン抽出しました。

サンプルはヘキサンによって洗浄し、室温で乾燥しました。

Enzymes. Cellulase (for food-processing cellulase from *Trichoderma* sp., 5000 units/g) was a gift from Daiwa-Kasei Co., Ltd. (Osaka, Japan). Pectinase (Pectinex Ultra SP, from *Aspergillus aculeatus*; 26000 units/mL) and Cellclast 1.5 L FG from *A. aculeatus* were gifts from Novozyme Japan. Cellulase XL531 from *Aspergillus niger* was a gift from Nagase chemtex, Japan. Cellulocine GM5, AC40, and HC100, cellulase from *Aspergillus* sp. and TP25 and T2 from *Trichoderma viride* were gifts from HBI, Inc., Japan. All other reagents were of reagent grade.

【酵素】

セルラーゼ(トリコデルマ sp.を 5000 のユニット/g、食品加工セルラーゼのための)は日本の大和カセイ(大阪)からの贈り物でした。*A. aculeatus* からのペクチナーゼ(アスペルギルス属 *aculeatus* からのペクチネックス、SP: 2万6000 のユニット/mL)と Cellclast1.5L の FG はノボザイム(日本)からの贈り物でした。黒色アスペルギルスからのセルラーゼ XL531 はナガセテムテックス、日本からの贈り物でした。アスペルギルス属 sp.と TP25 からのセルロシン GM5、AC40、および HC100 セルラーゼとトリコデルマ ビリデーからの T2 は HBI 社(日本)からの贈り物でした。他のすべての試薬は特級試薬でした。

Screening Enzyme. The roasted residues was autoclaved with 0.1 M NaOH at 121 °C for 60 min. The treated residues were washed with water and 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) and placed in a 96-well microplate; a 1 or 5% enzyme solution (0.1 M acetate buffer, pH 5.0) was mixed at 40 °C overnight, and the collapse or any visual change was observed.

【スクリーニング酵素】

焙焼された残渣は 60 分間 121°C で 0.1M 水酸化ナトリウムによってオートクレーブされました。残渣は水と 0.1 M の緩衝酢酸溶液(pH 5.0)によって洗浄されて、96 穴マイクロプレートに置かれました。1 または 5% の酵素溶液(0.1 M の緩衝酢酸溶液、pH5.0)は一晩中 40°C で培養されました。

Digestion of the Cell Walls of Sliced Green Coffee Beans. The green coffee beans were autoclaved with water at 121 °C for 10 min. The cooled beans sliced, and the sliced sections were autoclaved with water or 0.1 N NaOH at 121 °C for 10 min. The sections were incubated in an eppen-tube with 1% the selected cellulase from *Trichoderma* sp. at 40 °C overnight.

【スライスされたグリーンコーヒー豆の細胞壁の分解】

コーヒー豆の生豆は 10 分間 121°C で水によってオートクレーブされました。冷却された豆はスライスし、10 分間、121°C で水または 0.1N の水酸化ナトリウムによってオートクレーブされました。エッペンチューブにおいて 1% によって調整され 40°C のトリコデルマ sp.からの選ばれたセルラーゼ培養を一晩中行いました。

Time Course of the Cellulase Digestion of the Cracked Green Beans and the Roasted Coffee Residues. The cracked coffee beans or the residues were autoclaved with a 50-fold volume of 0.1 M NaOH (121 °C for 60 min), filtered, washed, and dried at 40 °C. The dried samples (2g) and 0.1 M acetate buffer (pH 5.0, 16 mL) were added to a glass bottle (30 mL). The glass bottle was then incubated with stirring (1200 rpm) at 40 °C for 24 h with 1% cellulase. The reaction mixture was centrifuged (3000 rpm, 10 min), and the supernatant was analyzed.

【ひびが入った生豆と焙煎されたコーヒー残渣のセルラーゼ分解の時間経過】

ひびが入ったコーヒー豆または残渣は 0.1M 水酸化ナトリウム(60 分間の 121°C)の 50 倍量によってオートクレーブされて、40°C で染色され、洗浄、乾燥しました。乾燥試料(2g)と 0.1 M の緩衝酢酸溶液(pH 5.0, 16 mL)はガラス瓶(30 mL)に保存されました。ガラス瓶中に、1%のセルラーゼを加え一晩中(24 h) 40°C で振盪しました。反応混合物は遠心分離された(3000 rpm, 10 分)上澄み液を分析しました。

Sequential Alkali Treatment and the Cellulase from *Trichoderma* sp. Digestion of the Milled and Defatted Powders of the Green and Roasted Coffee Beans. The sequential alkali-heated treatments and the cellulase digestion were as follows: for the first extraction, 2 g of the defatted powder of the green coffee beans or the roasted coffee beans and a 50-fold volume of 0.1 M Na₂CO₃ buffer (pH 10) were mixed, and suspension was boiled for 20 min. The suspension was centrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the residue was collected. The residue was mixed with a 50-fold volume of 0.1 M NaOH, and the suspension was boiled for 20 min; the residues were centrifuged and washed with water. For the first cellulase digestion, the collected residue was digested by 1% of the cellulase of *Trichoderma* sp. (0.1 M acetate buffer, pH 5.0) at 40 °C overnight with stirring. The residue was collected by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. For the sound alkali extraction, residue was autoclaved with a 20-fold volume of 0.1 M NaOH (121 °C for 10 min). For the sound same cellulase digestion, the residue and the 1% of the cellulase of *Trichoderma* sp. (0.1 M acetate buffer, pH 5.0) were mixed and incubated at 40 °C overnight with stirring again. The residue samples in each step were freeze-dried, and weighed. The differential weight in the each step was estimated as the extracts or the digestion weight. The supernatants of each step were used for the analysis of sugar and protein. Each residue was used for sugar analysis and microscopy observation.

【粉碎と脱脂された生豆と焙煎されたコーヒー豆の逐次アルカリ処理とセルラーゼ分解】

逐次、アルカリでの加熱処理とセルラーゼ消化は次の通りでした。

最初の抽出のため、生豆または焙煎されたコーヒー豆の脱脂した粉と 0.1 M Na_2CO_3 緩衝液(pH 10)の 50 倍量の 2 g を加え、20 分間煮沸消毒されました。

10 分間 3000rpm で遠心分離されて、残をは収集しました。

残渣は 0.1 M 水酸化ナトリウムの 50 倍量と混合し、20 分間煮沸消毒されました。

残渣は水で遠心分離し、洗浄しました。

最初のセルラーゼ分解のために、収集された残渣は一晚中 40°C でトリコデルマ sp のセルラーゼの 1% で体系化されました。(0.1 M の緩衝酢酸溶液、pH 5.0)

残渣は 10 分間 3000rpm の遠心分離によって収集されました。

アルカリ抽出のために、残渣は 0.1 M 水酸化ナトリウム(10 分間、121°C)の 20 倍量によってオートクレーブされました。トリコデルマ sp のセルラーゼと同じセルラーゼ分解は再度一晚中 40°C で振盪しました。(残渣、および 1%、0.1 M の緩衝酢酸溶液、pH 5.0)

各項目中の残渣サンプルは凍結乾燥し、重量測定されました。

各項目中の格差がある重量は抽出または分解重量として概算されていました。

各項目の上澄み液は砂糖とたんぱく質の分析のために使われました。

各残渣は砂糖分析と顕微鏡使用観察のために使われました。

Estimation of Sugar and Protein. The amount of uronic acid was measured according to the 3-phenyl phenol method (18). The total sugar estimated by using the phenol-sulfuric acid method (19). The reducing sugar was estimated according to the Nelson-Somogyi method (20). Protein was estimated by using the Bradford method (21). Each amount was calculated using a colorimetric standard curve with D-galacturonic acid, D-glucose, and serum albumin as the standards.

【砂糖とたんぱく質の評価】

ウロン酸の量は 3 フェニルフェノールの方法(18)に従って測定されました。

フェノール硫酸の方法(19)を使って全糖を概算しました。

還元糖はネルソン・ソモジ法(20)に従って概算されていました。

たんぱく質は、ブラッドフォードの方法(21)を使って概算されていました。

標準として D-ガラクトツロン酸、D-グルコース、および血清アルブミンは比色分析の標準曲線を使って、各量は計算されました。

Neutral Sugar Analysis. Analysis of the neutral sugars was done using the alditol-acetate method (14). The composition of the neutral sugar was analyzed by a GC system with a capillary column of DB-225 (J&W Co., 0.25 mm \times 30 m) connected to a Yanaco G-2800 (Yanaco Co., Ltd., Kyoto, Japan). The standard solution was adjusted with a 1% solution of each of the seven kinds of following sugars: L-rhamnose, L-fucose, L-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, and D-glucose.

【中性糖分析】

中性糖の分析はアルジトールアセテートの方法(14)を使ってされていました。

中性糖の構成はヤナコ G-2800(ヤナコ Co, Ltd., 京都、日本)と接続された DB-225(J&W Co.(0.25mm \times 30m)の毛管カラムによって GC システムによって分析されました。

標準液は以下、7 種類砂糖の各 1% のよって調整されました。

L-ラムノース、L-フコース、L-アラビノース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、および D-グルコース。

Staining. Toluidine blue O (1% in 0.1 M phosphate buffer, pH 7) (22), Yariv reagent (0.1 M phosphate buffer containing 0.3 M NaCl, pH 7) (23), and Calcofluor white were used for the staining reagent of the coffee residue (24). The β -glucosyl-Yariv reagent was obtained from Wako Pure Chemistry Co., Ltd., Osaka, Japan. Calcofluor white, BactiDrop, was obtained from Remel, Lenexa, KS.

【染色】

トルイジンブルー-O(0.1 M のリン酸緩衝液、pH 7 中の 1%) (22)、ヤリブ試薬(0.3 M 塩化ナトリウム、pH 7 を含んでいる 0.1 M のリン酸緩衝液) (23)、および Calcofluor 試薬はごく微量のコーヒー残渣(24)の染色に使われました。

β -グルコシル ヤリブ試薬は和光純化学(Co, Ltd., 大阪、日本)から得られました。

Calcofluor 白、BactiDrop は Remel、レネキサ KS から得られました。

Light and Fluorescent Microscopic Observation. The microscopic observations and photos were done using an Olympus BH-21 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) light microscope and a digital DP-II microscope photographic device. Fluorescent microscopic observations and photos were done using an Nikon Eclipse E-600

(Nikon Co., Ltd., Tokyo, Japan) fluorescent microscope and a digital Hamamats ORCA-ER C4742-95 camera (Hamamatsu Photonics Co., Ltd., Hamamatsu, Japan)

【光学と蛍光顕微鏡観測】

顕微鏡観測と写真はオリンポスのBH-21(オリンパス光学工業、東京、日本)光学顕微鏡とデジタルのDP-II顕微鏡写真機器を用いました。蛍光性の顕微鏡観測と写真はニコン製E-600(ニコン Co.,Ltd.,東京、日本)蛍光顕微鏡とデジタルのハママツ ORCA-ER C4742-95 カメラ(浜松ホトニクス Co., Ltd., ハママツ、日本)を使ってされていました。

RESULT

【結果】

Screening of Cellulase. Nine kinds of cellulases as food-processing enzymes (1%, 0.1 M acetate buffer, pH 5.0) were mixed with the alkali-treated coffee residue (0.1 M NaOH, 121 °C for 60 min) at 40 °C overnight. Only the cellulase of *Trichoderma* sp. caused the collapse of residues. The cells were dispersed, and the cell walls were partially digested.

【セルラーゼのスクリーニング】

食品加工酵素(1%, 0.1 M の緩衝酢酸溶液、pH 5.0)としての9種類のセルラーゼは一晩中40°Cでアルカリ処理されたコーヒー残渣(0.1 M 水酸化ナトリウム、60分間の121°C)と混合しました。

トリコデルマ sp.のセルラーゼだけが残渣の崩壊を起こしました。

セルは拡散し、細胞壁は部分的に分解されました。

Cellulase from *Trichoderma* sp. Digestion of the Sliced Section of Green Coffee Beans. The selected cellulase (1%, from *Trichoderma* sp.) digestion was carried out for the sliced green coffee beans treated by autoclaving with water (121 °C for 10 min). The microscopy observations are shown in Figure.1. The autoclaving treatment effectively stopped the formation of the brown color, which inhibited the cellulase digestion. The body complexes of the cells were removed by slicing and autoclaving with water, and the cell walls were easily observed. The decomposition of the cell walls was recognized as the autoclaving treatment and the cellulase effectively digested the cell walls of the coffee beans. The cell kept their shape without a single cell formation after the autoclaving. The residual cell walls were not completely digested even by 5% cellulase. In the cell walls without the body complex or residual coffee brew, the autoclaving with water (121 °C for 10 min) was sufficiently effective for the digestion of the outer cell walls.

【スライスされた生豆のトリコデルマからのセルラーゼ分解】

選択性セルラーゼ(トリコデルマ sp 1%)分解は水(10分間の121°C)によって高圧蒸気滅菌法を処理されたスライスされた生豆に行いました。

顕微鏡使用観察は Fig.1 において示されます。

高圧蒸気滅菌法取り扱いは効果的に茶色の構成を止めました(セルラーゼ分解を抑制しました)。

細胞の体複合体は水によってスライスと高圧蒸気滅菌法によって取り除かれて、細胞壁は容易に観察されました。細胞壁の分解は高圧蒸気滅菌法取り扱いと認められて、セルラーゼは効果的にコーヒー豆の細胞壁を分解しました。

セルは高圧蒸気滅菌法の後に単細胞の構成なしでそれらの形を保持しました。

残りの細胞壁は5%のセルラーゼによってさえ完全に分解されたわけではありません。

細胞壁を除き体複合体または抽出されたコーヒー残渣は、水(10分間の121°C)による高圧蒸気滅菌法が外部細胞壁の分解のために十分に効果的でした。

Cellulase from *Trichoderma* sp. Digestion of the Boiled or Autoclaved Sliced Section of the Green Coffee Beans with 0.1 M NaOH. The alkali boiling (0.1 M NaOH, 100 °C for 10 min) and the cellulase digestion produced a digestion similar to that shown in Figure.1, but the alkali autoclaving (0.1 M NaOH, 121 °C for 10 min) and the cellulase digestion could produce a finger-pressure breakup in the sliced cell walls of the green coffee beans (Figure.2). It was found that alkali autoclaving was efficient for the cellulase digestion and the breakup of the cell walls.

【0.1M NaOH と共に焙煎またはスライス部分をオートクレーブ処理した生豆のトリコデルマからのセルラーゼ分解】

0.1M 水酸化ナトリウムを持つ生コーヒー豆を煮沸し、オートクレーブ後スライスされた部分の分解を行い(0.1 M 水酸化ナトリウム、10分間100°C)を沸かしているアルカリとセルラーゼ分解は Fig.1 において示されたそれに類似している分解を引き起こしたが、アルカリ高圧蒸気滅菌法(0.1 M 水酸化ナトリウム、10分間の121°C)とセルラーゼ分解は生豆(Fig.2)のスライスされた細胞壁の中で指圧崩壊を引き起こすことができました。

アルカリ高圧蒸気滅菌法がセルラーゼ分解と細胞壁の崩壊のために効率的であったことが判りました。

Time Course of the Cellulase from *Trichoderma* sp. Digestion of the Cracked Green Coffee Beans and Roasted Coffee Residues. Figure.3 shows the time course of the selected cellulase from *Trichoderma* sp. digestion for the

alkali-treated cracked green coffee beans and roasted coffee residues. The roasted one was well digested with a yield of $38.5 \pm 1.84\%$, and the green coffee yielded $16.3 \pm 0.53\%$ within 24 h. The digestion of the roasted coffee beans was higher than that of the green coffee beans. The green coffee beans contained the body complex and the oil in the cells as $\sim 50\%$ w/w, and each ratio of the digestion could be estimated to be the dispersed in the reaction mixture, and cell walls were partially digested and became thinner. The cell walls were collapsed and partially digested, but the body complex were not digested. The sugar degree of polymerization of the digestion were estimated as 2.2 and 2.5, respectively. Small amounts of uronic acid were detected. Mannose, galactose, glucose, and arabinose were continuously released for the digestion. The neutral sugars from the final digestion of the green coffee beans and the roasted coffee residues were mannose (33.7 and 48.4 mol %), galactose (25.4 and 24.6 mol %), glucose (26.6 and 18.3 mol %), arabinose (12.3 and 8.6 mol %), and rhamnose (2.0 and 0 mol %).

【トリコデルマ sp からのセルラーゼの時間経過】

ひびが入った生豆と焙煎されたコーヒー残渣の分解。

Fig.3 はアルカリ処理でひびが入った生豆と焙煎されたコーヒー残渣のトリコデルマ sp からセルラーゼ分解の時間経過を示します。

焙煎されたものはよく分解されて $38.5 \pm 1.84\%$ の収率を、焙煎されていないコーヒーは 24h の中で $16.3 \pm 0.53\%$ の収率を得ました。

焙煎されたコーヒー豆の分解は生豆より高くなりました。

生豆は 50% の w/w としての細胞の中に体複合体とオイルを含んでいて、分解の各比率は、反応混合物の中で分散したものであると見積ることができて、細胞壁は部分的に分解されて、より薄くなりました。

細胞壁は崩壊し、部分的に分解したが、体複合体は体系化されませんでした。分解の砂糖重合度はそれぞれ 2.2 と 2.5 として概算され、少量のウロン酸も検出されました。

マンノース、ガラクトース、グルコース、およびアラビノースは分解のために逐次放出されました。生豆と焙煎されたコーヒー残渣の最終的な分解からの中性糖はマンノース(33.7 と 48.4 モル%)、ガラクトース(25.4 と 24.6 モル%)、グルコース(26.6 と 18.3 モル%)、アラビノース(12.3 と 8.6 モル%)、およびラムノース(2.0 と 0 モル%)でした。

Sequential Alkali Treatment and Cellulase Digestion of the Milled and Defatted Powder of the Green Coffee Beans. The results are summarized in Table 1. The first alkali treatment produced a strong brownish green extraction, and the treatment effectively dissolved and removed the body complex of each cell. Half the weight was then solubilized (53.7%) in the result. The subsequent cellulase digested the outer layer of the cell walls. Mannose, galactose, glucose, and arabinose were found in the supernatant of the digestion. The residues were rich in galactose and mannose; however, glucose was not detected from the short hydrolyzation (2 h) with 2 M trifluoroacetic acid, but the long hydrolyzation (24 h) provided the glucose. The second autoclaving with alkali was essential for the effective second cellulase digestion, but the boiling with alkali could not produce an effective second cellulase digestion. The second alkali treatment provided arabinose and galactose in the extraction, and the ratio was found to be 1:3.8. The ratio of the residues was 1:2.5. Boiling with the same alkali concentration also produced arabinose and galactose in the same ratio. The secondary cellulase digestion caused fractionation of the residual cell walls with only finger pressure, and the secondary cellulase digestion caused the release of mannose, galactose, and glucose. The final residue contained mannose, galactose, and glucose. The ratio of arabinose and galactose was 1:3.7. The glucose and mannose were galactose was 1:17.4. The total extraction and digestion were achieved with the yield of 95.0%.

【砕かれたものと脱脂した生豆の粉の逐次アルカリ処理とセルラーゼ分解】

結果は Table 1 にまとめました。

最初のアルカリ処理は強い茶色がかかった緑色の抽出を引き起こし、取り扱い効果的に各細胞の体複合体を解き、取り除きました。半分の重量結果が、その時可溶化されました(53.7%)。

その後のセルラーゼは細胞壁の外層を体系化しました。

マンノース、ガラクトース、グルコース、およびアラビノースは分解の上澄み液の中で発見されました。

残渣はガラクトースとマンノースに恵まれていました。

しかし、グルコースは 2 M のトリフルオロ酢酸によって短い加水分解化(2 h)から検出されなかったが、長い加水分解化(24 h)はグルコースを提供しました。

アルカリを持つ 2 番目の高圧蒸気滅菌法は効果的な 2 回目のセルラーゼ分解に必須であったけれども、アルカリを持つ沸騰は効果的な 2 回目のセルラーゼ分解を引き起こすことができませんでした。

2 回目のアルカリ処理は抽出においてアラビノースとガラクトースを提供し、比率は、1:3.8 であることを発見されました。残渣の比率は 1:2.5 でした。

同じアルカリによって沸騰することはまた同じ比率でアラビノースとガラクトースを産しました。

第 2 のセルラーゼ分解は指圧だけによって残りの細胞壁の分離を起こし、第 2 のセルラーゼ分解はマンノース、ガラクトース、およびグルコースの放出を起こしました。

最終的な残渣はマンノース、ガラクトース、およびグルコースを含んでいました。

アラビノースとガラクトースの比率は 1:3.7 でした。

グルコースとマンノースは、ガラクトースが1:17.4でした。
全体の抽出と分解は95.0%の収率を得られました。

Sequential Alkali Treatment and Cellulase Digestion of the Milled and Defatted Powder of the Roasted. Table 2 shows the result of the same sequential procedures used for Table 1 carried out for the milled and defatted roasted coffee beans. The conditions of the extraction and the digestion were the same as those for the green coffee. The weight losses in each procedure were similar. The extraction and digestion were achieved in a yield of 96.1%. Comparison of the results of the roasted coffee residues and green coffee beans (Table 1) showed that the general results were similar. The extractions by autoclaving with 0.1 M NaOH were rich in mannose, but arabinose was not detected. The first cellulase second alkali extraction, but galactose was found. The arabinose and galactose ratio of the residue after the secondary alkali treatment was 1:2.6. The ratio of the neutral sugar in the final residue was similar to that in the green coffee beans. The ratio of arabinose and galactose in the final residue was also 1:2.6. The glucose and mannose were found in the ratio 1:11.6. Xylose was found in the final residues.

【砕かれたものと、焙煎し脱脂したコーヒー粉の連続したアルカリ処理とセルラーゼ消化】

Table 2 は砕かれ脱脂した焙煎されたコーヒー豆のために抽出されたものを、Table 1 に逐次実験の結果を示します。

抽出と分解の条件は焙煎されていないコーヒーと同じでした。

各手順の比較の減量も同様でした。

抽出と分解は96.1%の収率を得られました。

焙煎されたコーヒー残渣の生豆(Table 1) 結果の比較は、一般的な結果が同様である事を示しました。

0.1M 水酸化ナトリウムを持つ高圧蒸気滅菌法による抽出はマンノースに富むが、アラビノースは検出されませんでした。

第2のアルカリ処理が1:2.6であった後に、最初のセルラーゼ第2アルカリ抽出であるがガラクトースは見つかり、残渣のアラビノースとガラクトース比率でした。

最終的な残渣中の中性糖の比率は生豆の中に類似していました。

最終的な残渣中のアラビノースとガラクトースの比率は再び1:2.6でした。

グルコースとマンノースは比率1:11.6において発見されました。

キシロースは最終的な残渣の中で発見されました。

Change in the Cell Walls of Green Coffee Beans by Sequential Treatment of Alkali Extraction and Cellulase Digestion. Figure 4 shows the microscopy photos of the residues of the sequential treatments described above by staining of toluidine blue O (column A), Yavir reagent (column B), and calcofluor reagent (column C). The cell walls were completely broken by milling, and the body complexes in the cell were removed to solubilize. The cell walls only were clearly detected, and the characteristic holes of the cell walls were also detected. The cell walls gradually became thin by digestion of the cellulase. The characteristic hump junctions of the cell walls were well stained with all of the reagents. The alkali treatment decreased the staining parts of the cell walls (Figure 4A-2,B-2). The cell wall covered with a membrane was found after the first cellulase digestion, and the membrane was well stained by Yavir reagent (Figure 4B-3). The membrane became thin by the extraction of the second alkali treatment (Figure 4B-4). The residual cell walls were further digested by the second cellulase digestion (Figure 4A-5,B-5,C-5). In the final residue, the cell walls and the membrane became very thin (Figure 5). The cell walls were very easily broken into small pieces by finger pressing (Figure 4A-6,B-6,C-6). The final residue (Figure 4C-5) and the broken pieces of the cell walls (Figure 4C-6) were stained with calcofluor. The broken pieces of the cell walls were again well stained by Yavir reagent (Figure 6).

【セルラーゼ分解と逐次アルカリ処理による生豆の細胞壁の変化】

Fig 4 はトルイジンブルーO(カラム A)、ヤリブ試薬(カラム B)、および Calcofluor 試薬(カラム C)の染色によって逐次処理した残渣の顕微鏡使用写真を示します。

細胞壁は、砕かれた事によって完全に壊されていて、細胞の中の体複合体は可溶化するために取り除かれました。細胞壁はただはっきりと検出されて、細胞壁の独特な穴が検出されました。

細胞壁は徐々にセルラーゼの分解によって薄くなりました。

細胞壁の独特な丘接合点は試薬のすべてでよく染色されていました。

アルカリ処理は、細胞壁(Fig 4A-2、B-2)の染色部分を減少させました。

膜によってカバーされた細胞壁は最初のセルラーゼ分解の後で見つかり、膜はヤリブ試薬(数値 4B3)によってよく染色されました。

膜は2番目のアルカリ処理(数値 4B4)の抽出によって薄くなりました。

残りの細胞壁は2番目のセルラーゼ分解(Fig 4A-5、B-5、C-5)によってさらに分解を促進しました。

最終的な残渣の中で、細胞壁と膜は非常に薄く(Fig 5)になりました。

細胞壁は、指圧で(Fig 4A-6、B-6、C-6)小片へと非常に容易に分割されました。

最終的な残渣(数値 4C-5)と細胞壁(数値 4C-6)の壊れた断片は calcofluor によって染色されました。

細胞壁の壊れた断片はヤリブ試薬(Fig 6)によって再びよく染色されました。

DISCUSSION

【考察】

The efficient digestion of the cell walls of the green and roasted coffee beans was achieved, and the characteristics of the cell walls were investigated. The cell walls are insoluble and thick, and the digestion has been very difficult for a long time (2, 8, 9). The compositions mainly contain galactomannan, arabinogalactan, and cellulose, but their detailed characteristics and distributions are not yet clarified (2-10). Their efficient digestion is only slightly known. Especially, the characteristics or the localization of the strong binding of arabinogalactan (protein) and the (galacto) mannan-cellulose are important, but not totally known (2-9). We carried out the efficient digestion of the cell walls of the coffee beans by evaluating the results of the efficient digestion and extraction of the soybean seeds (15-17). The essential cell structures, such as the cell wall, body complex, and oil drop, are similar to each other, but the single cells could not be found by autoclaving, and the same procedures could not be adapted. However, the cellulase screening and microscopic observation led us to solve this problem. In the cracked coffee beans and the coffee residues, the cells were not completely broken, and the body complexes were not completely solubilized by the autoclaving with alkali. They remained in the cellulase digestion, and the digestion yields were low. The milling of the coffee beans and the alkali solubilization of the body complex in the cells were effective for the efficient digestion and observation of the cell walls. Most of the cells were broken. The contents of the cells, which are body complexes, were easily removed with cell breaking and the alkali treatment. In this experiment, removal of the body complexes was done not by the alkaline protease but by the alkali extraction (17). The alkali treatment effectively removed the body complexes or residual coffee brew (17). The cell walls only were clearly observed. Autoclaving with alkali produced a better cellulase digestion than boiling in the milled powders and the sliced sections, and the breakup of the cell walls was observed (Figure 2B and 4).

生、焙煎されたコーヒー豆の細胞壁の効率的な分解は確立されて、細胞壁の特徴は調査されました。

細胞壁は不溶性で、厚く、分解は長い間非常に難しい事が判りました。(2,8,9)

混合物は主にガラクトマンナン、アラビノガラクトン、およびセルロースを含んでいたが、それらの詳細な特徴と存在化はまだ明確化されていません(2-10)。

それらの効率的な分解はわずかに知られているだけです。

特に、特徴的なアラビノガラクトン(たんぱく質)と(ガラクト)マンナンセルロースの強い結合の局在化は重要であるが、まったく知られているわけではありません(2-9)。

効率的な分解の結果と大豆の種(15-17)の抽出を評価することによって、私達はコーヒー豆の細胞壁の効率的な分解を実行しました。細胞壁、体複合体、およびオイル抽出などの必須の細胞の構造は互いに類似しているが、単一の細胞は高圧蒸気滅菌法によって見つけられることができず、同じ手順は適応することができませんでした。しかし、セルラーゼスクリーニングと顕微鏡観測によって、この問題を解決しました。ひびが入ったコーヒー豆とコーヒー残渣の中で、細胞は完全に壊れていたわけではなく、体複合体はアルカリによって高圧蒸気滅菌法によって完全に可溶化されたわけではありません。彼らはセルラーゼ分解にとどまっています、分解収率は低かった。

コーヒー豆と細胞の中で複雑なボディのアルカリ可溶化は細胞壁の効率的な消化と観察のために効果的でした。セルのほとんどは壊れていました。

体複合体である細胞の内容は細胞壊れとアルカリ処理によって容易に取り除かれました。

この実験において、体複合体の除去はアルカリプロテアーゼによってではなくアルカリ抽出(17)によってされました。アルカリ処理は効果的に体複合体または残りのコーヒーの抽出(17)を取り除きました。細胞壁ははっきりと観察されただけでした。

アルカリを持つ高圧蒸気滅菌法は破砕粉体とスライスされた部分を煮沸させ、よりよいセルラーゼ分解を引き起こし、細胞壁の崩壊が観察されました(Fig 2B, 4)。

Mannase would be expected for the digestion of coffee beans (25), but the food-processing cellulase from *Trichoderma* sp. was very effective, whereas the other cellulases containing mannanase activity were not effective. The selected cellulase is the same food-processing enzyme found in the efficient in the efficient digestion of the previously reported soybean seeds and soybean milk residues (15-17). The cellulase showed a strong glycosidase activity that acted on the raw soybean cells (16). The sugar degree of polymerization of the digestion of the coffee beans was also short, and the average was 2.2-2.5 (Figure 4). The cellulase could well act on the xylan or cellulose powder. Konjac mannan could be digested, but the galactomannan from locust beans of *Coretonia siliqua* seeds and gum guar were very weakly digested by the cellulase. The cellulase containing a strong mannanase activity such as GM5 from *Aspergillus oryzae* could digest the galactomannan and the konjac mannan, but was not effective for the digestion of the coffee cell walls (data not shown). The real key activities of the enzyme for the digestion of the coffee beans were not clear. The main sugar compositions could not always lead to the expected enzymes; thus, the real

screening of the enzymes should be carried out (16,17).

マンナーゼはコーヒー豆(25)の消化のために利用されているであろうが、トリコデルマ sp.からの食品加工セルラーゼは非常に効果的であったのに対して、マンナーゼ活動を含んでいる他のセルラーゼは効果的ではありませんでした。選択されたセルラーゼは以前に報告された大豆の種と大豆ミルク残渣(15-17)の効率的な分解において効率的なものにおいて発見された物と同じ食品加工酵素です。

セルラーゼは、生の大豆細胞(16)に作用した強いグリコシダーゼ活動が認められました。

コーヒー豆が、また、短絡することであり、その平均であった分解の砂糖重合度は2.2-2.5(Fig 4)でした。

セルラーゼはキシランまたはセルロース粉末に作用する可能性が十分あります。

こんにやくマンナンは体系化されることができたが、コレトニア長角果種のイナゴマメからのガラクトマンナンとゴムクラスタマメはセルラーゼによって非常に弱く体系化されました。

麹菌から GM5 などの強いマンナーゼ活動を含んでいるセルラーゼは、ガラクトマンナンを体系化できて、こんにやくマンナンはコーヒー豆分解のために酵素のコーヒー細胞壁(示されなかったデータ)の真の活動分解のために効果的ではなかったことは明らかになりました。

主要な糖組成は予想される酵素を判明させる事は出来ませんでした。

従って、酵素の本当のスクリーニングを実行されるべきです(16, 17)。

The arabinogalactan protein or arabinogalactan covalently cross-linking proteins was proposed in the coffee beans(2, 6-9). The α Arabinogalactans of the coffee beans are hard to extract (2, 6-9). Redgwell et al. recently reported the chemical and alkali extractions from the fine milled coffee beans, and the extracted arabinogalactans were positive to Yariv reagent (8, 9). All of the extractions contained the arabinogalactan protein [AI] of the residues of the cell walls in our examination were also well stained with Yariv reagent, and these stainings agreed with the results of several stepwise extractions of arabinogalactan (proteins) by Redgwell et al. (8,9). Although the extraction of the strong adhesive arabinogalactan was reported to require a strong alkali such as 5 M NaOH or 8 M KOH (2,9,9), dilute alkali (0.1 M) was enough in our sequential extraction and digestion. However, the strongly binding arabinogalactan proteins still existed in the residual cell walls (Figure 6); therefore, further localization and its characteristics should be studied in the future. The outer cellulose-rich layer was first removed in our digestion by cellulase, and then the naked arabinogalactan protein (Figure 4B-3) could be easily extracted by the second alkali treatment (Figure 4B-4). The second alkali extraction was clearly rich in arabinose and galactose with the ratio of 1:3.8, whereas mannose was not detected in the extraction. The 1:2.5 ratio of arabinose and galactose was detected in the residue, and the ratio of the final residue was found to be 1:3.7 (Table 1). The ratios agreed well with the ones reported by Redgwell et al. (8,9). The residual cell walls after the first cellulase digestion was well stained, and the membrane was detected by Yariv reagent (Figure 4B-3). The inner membrane or the layer could be mainly composed of arabinogalactan proteins (Figure 4B-3). The fractionated pieces of the final residues were also again well stained by Yariv reagent (Figure 6). These results showed that the arabinogalactan proteins also existed in the central deep regions of the cell walls. The first and second cellulase digestions were well done after the heated alkali treatment. The arabinogalactan proteins may prevent cellulase digestion. The central parts of the cell walls were strongly attached to each other and shared with the cell walls of the next cells (Figure 1B). We think that this unique structure and the compositions could be a reason for no single cell formation. After autoclaving (121 °C, 10 min) with the dilute alkali extraction was completed, the second digestion by the same cellulase was done again. As a result, the residual cell walls became very thin, and then a drastic breakup by finger pressing was observed (Figure 4 and 6). This breaking of the cell walls was also found in the sliced green coffee (Figure 2). The second autoclaving with alkali would then be effective for the extraction and swelling of the final residues. The boiling with alkali was not sufficiently effective as described above. A similar effect of autoclaving was found for the primary cell walls of the soybean digestion. The cellulase could not digest the raw soybean seed because the adhesives in the middle lamella stopped the cellulase digestion, but the naked single cells formed by autoclaving with water were easily digested (15-17). The final residues of the coffee beans seemed to be the outer part or layer of the residual cell walls (Figures 2 and 4A-6). The final residue of the cell walls of the coffee beans was not easily hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid or 1 M NaOH; therefore a further analysis should be completed. Arabinose decreased during the roasting (2). It was noted that the second alkali extraction did not give arabinose in the roasted coffee beans, but the residue had arabinose and galactose in the ratio of the 1:2.6. The arabinose of the arabinogalactan (protein)-rich membrane (Figure 4B-3) could be predominantly lost during the roasting (Table 2) (2).

コーヒー豆の (2, 6-9) アラビノガラクトタンにおいて、アラビノガラクトタンたんぱく質またはアラビノガラクトタン共有結合するクロスリンクたんぱく質が見出された。最近、優れた粉碎粉されたコーヒー豆から化学薬品とアルカリ抽出を報告したレグウェル等は、取り出しづらく(2, 6-9) 取り出されたアラビノガラクトタンは、抽出のヤリブ試薬 (8, 9) 全てに有効でした。私達の調査においても細胞壁の残留物のアラビノガラクトタンたんぱく質を含んでいる事が判明した。

ヤリブ試薬によって染色されて、これらの染色はレグウェル等によるアラビノガラクトタン(たんぱく質)のいくつかの段階のような抽出の結果と合致していました。

強い接着剤のアラビノガラクトランの抽出が、5 M の水酸化ナトリウムまたは 8 M KOH(2, 9, 9)などの強いアルカリを必要とするために別の鉢に植えかえたことであつた(8, 9)。希アルカリ(0.1 M)は私達の連続した抽出と分解において十分でした。

しかし、強く結合するアラビノガラクトランたんぱく質はまだ残りの細胞壁(Fig 6)中に存在していました。従つて、さらなる局在化とその特徴は今後に検討されるべきです。外のセルロースに富むレイヤーは最初に私達の分解においてセルロースによって取り除かれて、それから、裸のアラビノガラクトランたんぱく質(数値 4B-3)は 2 番目のアルカリ処理によって容易に抽出されることができました(数値 4B-4)。2 番目のアルカリ抽出ははっきりと 1:3.8 の比率と表されアラビノースとガラクトースに恵まれていたのに対して、マンノースは抽出には検出されませんでした。

アラビノースとガラクトースの 1:2.5 の比率は残渣に検出され、最終的な残渣の比率は、1:3.7 (Table 1)であることを発見されました。比率はレグウェル等などによって報告されたものとよく合致していました(8, 9)。最初のセルロース分解がうまく傷つけられて、膜がヤリブ試薬(数値 4B-3)によって検出され内膜または皮が主にアラビノガラクトランたんぱく質から構成されることができた後の残りの細胞壁(最終的な残渣の 4B-3)。細分された断片がまた再びヤリブ試薬によって染色をされたと思つてくださいます(Fig 6)。これらの結果は、アラビノガラクトランたんぱく質がまた細胞壁の中心的な深い部分で存在していたことを示しました。1 回目と 2 回目のセルラーゼ分解は加熱アルカリ処理の後に出来がよかつた。アラビノガラクトランたんぱく質はセルロース分解を防止するかもしれません。

細胞壁の中央部は、互いに強く付着し (Fig 1B)、この無類のものが構造化し、混合物が無単細胞の構成の理由であるかもしれないと思われる次のセルの細胞壁と共有されていました。

薄めのアルカリ抽出を持つ高圧蒸気滅菌法(121 °C, 10 分)が完成した後に、同じセルラーゼによる 2 番目の分解は再び行われました。

結果として、残りの細胞壁は非常に薄くなり、指圧による大幅な崩壊が観察されました(Fig 4, 6)。

細胞壁のこの壊れはスライスされ焙煎されていないコーヒー(Fig 2)中で発見されました。

アルカリを持つ 2 回目の高圧蒸気滅菌法は最終的な残渣の抽出に効果的でしょう。上で説明されるように、アルカリ煮沸は十分に効果的ではありませんでした。

高圧蒸気滅菌法の同様な効果は大豆分解の一次電気分解に見つかりました。

中葉の中の接着剤がセルラーゼ分解を止めたので、セルラーゼは生の大豆の種を分解することが出来なかつたが、水によって高圧蒸気滅菌法によって形成された裸の単一のセルは容易に分解されました(15-17)。

コーヒー豆の最終的な残渣は、残りの細胞壁の外部分またはレイヤーであるようでした(コーヒー豆の細胞壁の(Fig 2 と 4A-6)。最終的な残渣は 2 M のトリフルオロ酢酸または 1 M 水酸化ナトリウムによって容易に加水分解されませんでした。従つて、さらなる分析で判明するでしょう。

アラビノースは焙煎(2)の間に減少しました。

2 回目のアルカリ抽出が焙煎されたコーヒー豆の中でアラビノースを与えなかつたことは注目されたが、残留物は 1:2.6 の比率においてアラビノースとガラクトースを持っていました。

アラビノガラクトランたんぱく質が豊かな膜(数値 4B-3)のアラビノースはロースト(Table 2)(2)の間に主に失われることができました。

Most of the glucans in the coffee beans are proposed to be cellulose; its existence was proposed as the mannan-cellulose in the coffee beans (2). The glucose was rich in the first cellulose digestion after the alkali treatment. The outer layer of the cell walls was easily digested by the selected cellulase. Staining by the iodide-H₂SO₄ was clearly positive, and the cell walls were swollen with a blue color (22) (data not shown). The residues of the cell walls were not stained by the iodide-H₂SO₄ method, and the glucose was not detected after the short hydrolysis (2 h) by the trifluoroacetic acid, but was detected after the long hydrolysis (24 h). Glucose was also detected in the second cellulase digestion. The glucose was also detected in the final residue; the ratio of glucose to mannan was 1:17.4. This result could indicate the existence of glucogalactomannan, but the calcofluor staining was clear in the residues of all treatments of the final residues (Figure 4C). The cellulose of the residual cell walls remained after the final cellulase digestion. These results would be due to the structural localization of the cellulose. The glucose could be from the mannan-cellulose. Layers or unique structures may exist. The cell walls of the coffee are composed of multiple mannan layers by the staining with the mannan antibody as done by Redgwell et al. (8). Our results agreed with their results. The results showed that there were at least four kinds of layers in the cell walls. The layers of the cell walls were composed of galactomannan-cellulose in the central deep part, which was very tightly bound to the next cell wall, the covering arabinogalactan protein layer or membrane, the cellulose-rich galactomannan as the outer layer, and the outer layer was again covered with arabinogalactan-protein (8). Plants are organically structured carbohydrates proteins, and so on (26). The complete structural and compositional understanding or their uses is difficult. Information about the chemical composition is essential for digestion or use, and the microscopic observations and the screening of the enzymes are assessment important tools. The efficient digestion of the cell walls of the coffee beans would be useful for the high extraction of a coffee brew or use of the residue of the roasted coffee (8, 12, 13). Exploring the food functions (14) of the digested galactomannan of the

coffee beans would be possible using our results.

コーヒー豆中のグルカンのほとんどは、セルロースであるために提供されます。その存在はコーヒー豆(2)中のマンナンセルロースとして提供されました。

グルコースはアルカリ処理の後に第1セルロース分解に富んでいました。

細胞壁の外層は選択性セルラーゼによって容易に体系化されました。

ヨウ化物 H_2SO_4 によって染色ははっきりとポジティブで、細胞壁は青色の色(22)(示されなかったデータ)によって膨張しました。細胞壁の残留物はヨウ化物 H_2SO_4 の方法によって染色出来ず、グルコースは短い加水分解(2 h)後にトリフルオロ酢酸によって検出されず、長い加水分解(24 h)後に検出されました。グルコースはまた2回目のセルラーゼ分解に検出されました。

グルコースはまた最終的な残渣に検出されました。マンナンへのグルコースの比率は17.4でした。

この結果はグルコガラクトマンナンの存在を示すことができたけれども、Calcofluor 染色は最終的な残渣(Fig 4C)は全ての処理物の残渣中に判明しました。残りの細胞壁のセルロースは最終的なセルラーゼ消化の後に残っていました。これらの結果はセルロースの構造配置によるでしょう。

グルコースはマンナンセルロースからであるかもしれません。皮またはユニークな構造が存在するかもしれません。レグウェル等などによって、コーヒーの細胞壁はマンナン抗体で染色する事によって複数のマンナンレイヤーから構成されています(8)。

私達の結果はそれらの結果と合致していました。

結果は、細胞壁の中に少なくとも4種類のレイヤーがあったことを示しました。

細胞壁のレイヤーは、中心的な深い部分(それは次の細胞壁、カバーアラビノガラクトタンパク質レイヤー、または膜と非常に強く結合した)のガラクトマンナンセルロースから構成されていて、外層と外層としてのセルロースに富むガラクトマンナンは再びアラビノガラクトタンパク質(8)によってカバーされていました。プラントは有機的に構造化された炭水化物たんぱく質などです(26)。

構造で完成し、合成的にそれらの用途は、化学の構成についての重要な情報が分解または使用と顕微鏡観測に必須で、酵素のスクリーニングが重要な評価手段であることです。

コーヒー豆の細胞壁の効率的な消化は抽出されたコーヒーまたは焙煎されたコーヒー(8, 12, 13)の残渣の使用に有益でしょう。

コーヒー豆の体系化されたガラクトマンナンの食物機能(14)を探究することは、私達の結果を使って可能でしょう。

Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method

マイクロ波照射方法による純度の高いナノサイズヒドロキシアパタイトの合成

Nano-sized hydroxyapatite powders were synthesized by a microwave-hydrothermal method using H_3PO_4 and $Ca(OH)_2$ as starting materials in a closed-vessel microwave device at 600 psi and 300 point for 30 min.

The applied microwave powers and mole ratio of Ca/P served as powerful factors in the synthesis of calcium phosphate. In the case of relatively low microwave power of 450W and Ca/P ratio of 1.57, mixed calcium phosphate compounds such as $Ca(OH)_2$, $CaHPO_4$ and HAp were detected in the synthesized powders.

But in the case of running at 550W, 1.67, synthesized powder showed the monophase of HAp having two kinds of morphologies. One was a needle shape with 4-15 nm in width and 20-50 nm in length, and the other was a spherical shape of 10-30 nm in diameter.

The purity of nano-sized HAp powder was determined as 99.995% by ICP-MS.

ナノサイズの Hap 粉末は、30 分間 600psi と 300°C で閉容器マイクロ波装置の中で素材として H_3PO_4 と $Ca(OH)_2$ を使って、電子レンジ熱水の方法を用いて合成を行った。

適用されたマイクロ波粉と Ca/P の比率はリン酸カルシウムの強力なファクターとして役立ちました。450W の比較的低いマイクロ波パワーと 1.57 のカルシウム/リン比の場合に、 $Ca(OH)_2$ 、 $CaHPO_4$ 、Hap 粉末などの混じったリン酸カルシウム化合物は合成した粉に検出されました。しかし、550W、1.67 で動く場合に、合成した粉は 2 種類の形態学を持っている Hap 粉末の単相を示しました。一方は幅 4-15nm と長さ 20-50nm を持つ針形であり、他は直径 10-30nm の球形の形でした。ナノサイズの Hap の純粋さは 99.995% と ICP-MS によって決定されました。

カルシウムリン酸塩は Ca/P と周辺の条件の比率に従って多種類の誘導体を含みます。

単カルシウムリン酸塩一水化物(MCPM、 $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot (H_2O)$ 、Ca/P 白歯率=0.5)、二カルシウムリン酸塩 (DCPD、 $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 、Ca/P=1.0)、二カルシウムリン酸塩無水物(DCPA、 $CaHPO_4$ 、Ca/P=1.0)(カルシウムピロリン酸塩 (CPP、 $Ca_2P_2O_7$ 、Ca/P=1)があります。(x-トリカルシウムリン酸塩/β-トリカルシウムリン酸塩 ((x-/13-TCP、 $Ca_3(PO_4)_2$ 、Ca/P=1.5)、テトラカルシウムリン酸塩 (TTCP、 $Ca_4(PO_4)_2O$ 、Ca/P=2.0)、およびヒドロキシアパタイト(Hap、 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 、今後 HAp と評される(Ca/P=1.67)。

それらの間で、HAp は最も有用なカルシウムリン酸塩の 1 つであり、自然な骨格と歯へのその類似性による回復した歯と整形外科のインプラントなどの臨床アプリケーションとして使われて、それが、カルシウムリン酸塩のため純度の高い HAp をオッセオ合成[1-31.バイオ類縁と向上は多くの誘導体と反応条件に強く依存しているカルシウムリン酸塩の合成を含みます。従って、酸塩基反応、促進、水熱法、およびゾルゲルなどの多くの種類の HAp 合成の方法は導入された[4-8]でした。

一般に、これらの商業用の方法は長い時間がかかりすぎて、退屈な仕事、低い品質管理、および化学汚染によって引き起こされたいくつかの問題を持っています。

これらの欠点を克服する 1 つの方法はマイクロ波照射方法です([9, 10].この方法がメディア、急速加熱、速い反応、高利回り、素晴らしい再現性、狭い粒子分布、高純度、および高い効率的なエネルギー変化[11-15]にわたって加熱などのいくつかの利点を持っている短期労働時間の間極端な不確かさと高い効率を合成するために、それは可能にします)。

マイクロ波照射が閉容器マイクロ波装置に応用される時に、マイクロ波は、数秒の間の 300°C より上の高温と同様に同時に高压で 600psi 以上を生成することを可能にされた反応槽の中を吸収している誘電的性質と分子双極子モーメント[151]電子レンジを持っている素材の回転と移住を引き起こします。

それゆえ、反応レートはドラマチックに、個々の反応物の間の共謀の増加のため強化されて、[15-17]マイクロ波加熱が、均質に回転素材の間の衝突による熱エネルギーへのマイクロ波エネルギー転送による素材のコアと表面の両方を熱するために可能にすることができることでした。

従って、マイクロ波加熱は一般的な加熱過程[18-20]のそれより効率的な熱せられた素材の中で熱応力と温度勾配を減らすことができます。

この働きは、マイクロ波照射方法を使って、磷酸と水酸化カルシウムから合成されました。マイクロ波エネルギーとカルシウム/リン比に依存している HAp の構成は実行されました。さらに、マイクロ波照射方法を使って、ナノサイズの HAp 合成において前例がありませんでしたが、はっきりと、合成反応、HAp のカルシウム/リン比、純粋さ、および結晶構造のプロセスが ICP-MS、FT-IR、および XRD によって測定されました。

2. 実験操作

HAp 合成のために使われた出発物質は水酸化カルシウム(Ca(OH)₂、オールドリッチ化学薬品、99.995%)と磷酸(85.0-87.0%の H₃PO₄)、Dongwoo 精製化学製品、電子グレードでした。

合成のためのマイクロ波照射機構は商業証券(特性 D マイクロ波、マイルストーン、イタリア)中で実行されました(それは 1200W の出力によってデュアルマグネトロン機器によって生成されて、2.45GHz の頻度マイクロ波放射を使います)。

動作電力は Windows の@ベースのコントロールソフトウェアによって 250-1000W に自動的に適合させられて、閉鎖合成容器の中の内部の温度と圧力はそれぞれまた 200-600psi、85-300°C 監視されます。

反応物は 1.17-1.77 のモル比において重量測定されて、各サンプルの中のカルシウムとリンの量 Table 1 に示されました。重量測定されたサンプルはテフロンによって作られた閉容器マイクロ波装置の中で移動し、3ml の脱イオン水を加えました。

これらの容器継ぎ目草は 5-10 分間マイクロ波照射によってふたとして働いていて、封印し、熱くなりました。ナノサイズ HAp を合成するために、最初のステップは 2 分間 250W で発生した暖機運転プロセスであり、第 2 段階は 4 分間 250-650W で発生した主要な反応プロセスであり、最終ステップは 20 分間の冷却法です。

HAp の合成を終えた後に、製品の中の残余の除去と粉の結晶化の両方は 3 分間の 250W) 波加熱過程によって運ばれました。

合成した HAp のカルシウム/リン比と不純物はそれぞれ帰納的に結合されたプラズマ原子排出分光法(ICP-AES, Optima 3000, Perkin-Elmer 米国)と帰納的に結合されたプラズママス分光法(ICP-MS, エラン 6000, Perkin-Elmer 米国)によって決定されました。

サンプルの機能的なグループを評価するために、FT-IR スペクトルは、合成された HAp の FT-IR 分光計 (Mode1580, Perkin-Elmer 米国) .熱分析において KBr ペレットを使って実行されました その加熱レートでアルゴンの 1300°C まで室温の間の TG/DTA (SDT Q600, TA 機器)を使う外で運ばれた。10 °C min⁻¹ . サンプルの結晶構造は、エックス線回折 (D/SEM (JSM-635Jcol) と TEM(JEM-2010, Jeol)を使って、調査された HAp のマックス・250 個) 理学、形態学、および微小組織によって識別されました。

3. 結果と議論

Table 1
Components of starting materials

| Ca/P ratio | 1.17 | 1.37 | 1.47 | 1.57 | 1.67 | 1.77 |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Ca(OH) ₂ | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g |
| H ₃ PO ₄ (85%) | 0.533 g | 0.455 g | 0.424 g | 0.396 g | 0.373 g | 0.352 g |

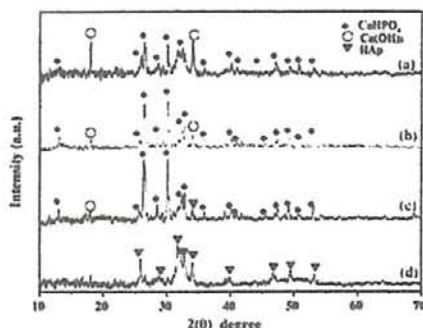


Fig. 1. XRD patterns of HAp powders depending on the microwave energies: (a) 250 W, (b) 350 W, (c) 450 W and (d) 550 W.

図 1 は HAp 合成の X 線回折パターンがマイクロ波エネルギーに依存している 1.67 の Ca/P モル比を使うの

を見せます。

4分間の250Wでのマイクロ波照射の後の粉のXRDパターンにおいて、図1(a)の中で、結晶構造は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 CaHPO_4 、およびHApの混合相によって検出されました。

マイクロ波エネルギーが図1(b)と(c)、二カルシウムのリン酸塩無水物 a) CPAにおいて350と450Wで増大した時に、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ フェーズが正反対に減らされる間、 CaHPO_4 フェーズは顕著に増大しました。

しかし、少量のHApフェーズは存在していました。

図1(d)の場合に、4分間550Wでマイクロ波エネルギーに光をあてて、HApの1つのフェーズだけが存在していて、 CaHPO_4 ピークは検出されませんでした。

図2は4分間550Wのマイクロ波照射でカルシウム/リン比に依存しているHApのXRDパターンを示します。図2(a)の中の1.17のカルシウム/リン比を持つ場合に、結晶構造は二カルシウムリン酸塩無水物のフェーズだけによって検出されました。

カルシウム/リン比が図2(a)(d)の中で1.37から1.57によって増大した時に、二カルシウムリン酸塩フェーズはまだ1.57のカルシウム/リン比まで存在していたけれども、HApフェーズは出現しました。

しかし、図2(e)の中の1.67のカルシウム/リン比を持つHAp合成は CaHPO_4 ピークなしでHApフェーズだけを検出しました。

図2(f)、1.77のカルシウム/リン比場合に、合成の残りがカルシウム量を超過して存在していた時に、HApピークが主に検出されて、 CaHPO_4 は小さな一部でした。

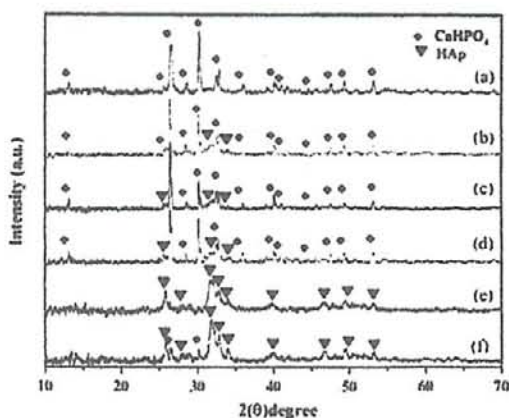


Fig. 2. XRD patterns of HAp powders depending on the Ca/P ratio at 550 W microwave irradiations: (a) 1.17, (b) 1.37, (c) 1.47, (d) 1.57, (e) 1.67 and (f) 1.77.

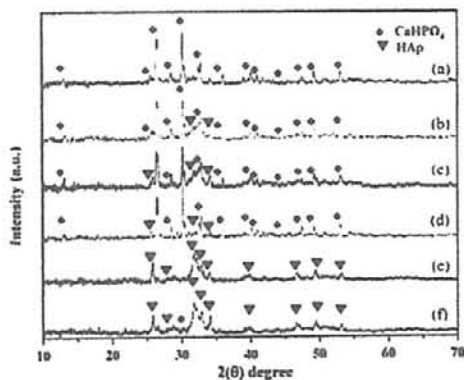


Fig. 3. XRD patterns of HAp powders depending on the Ca/P ratio at 650 W microwave irradiations: (a) 1.17, (b) 1.37, (c) 1.47, (d) 1.57, (e) 1.67 and (f) 1.77.

図3は、マイクロ波照射システムによるHAp合成W、傾向が図2の結果の同様なパターンを示したのを合成した粉のXRDプロフィールに650で知らせます。

結果として、私達は、HAp合成のための電子レンジの出力が、上で、550Wで出発物質の中の1.67のカルシウム/リン比の化学量論的なコントロールに必要とされていることであることを要求されると理解することができます。

図4はマイクロ波照射システムによって合成されたHApのTG/DTAサーモグラムを示します。

TG 曲線の中で、急斜面は検出されず、減量のパーセントは全体の測定された温度の範囲でゆっくり 8.5% 減少しました(それは、HAp のほとんどが他の過程によって分解しなかったため、DTA が曲げるその熱の安定性が検出されて、最高 1100°C までの他の吸熱性で、発熱性のピークも示しました)。吸熱性のピークは 1150°C で検出されました。(それは β -TCP フェーズの中に HAp の相関数に概算されていました)。

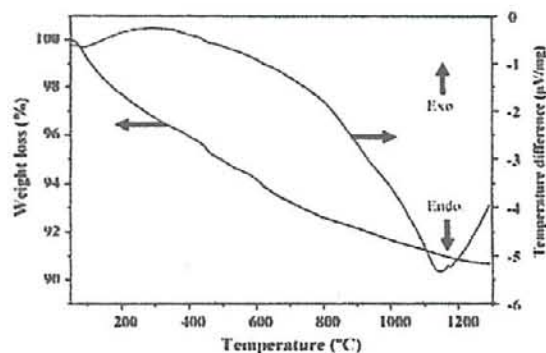


Fig. 4. TG/DTA thermogram of HAp powder synthesized by microwave digestion system.

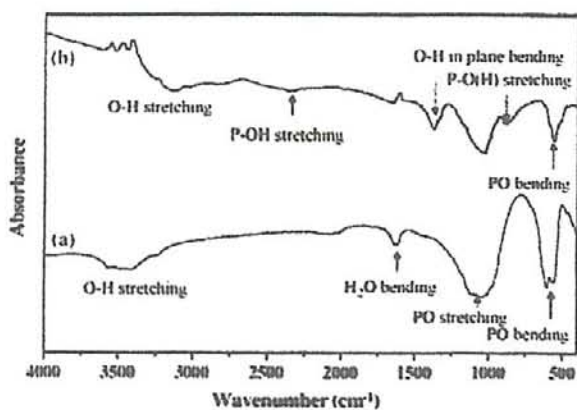


Fig. 5. FT-IR spectra of (a) DCPA and (b) HAp powder synthesized by microwave digestion system.

図5はマイクロ波照射システムによって統合された DCPA/HAp の FT-IR スペクトルを示します。図5(a)に例示するように、P-O 伸びによるバンドは 1030 で強く吸収されて、2360 cm^{-1} の近くの 563 cm^{-1} 広帯域が、895 cm^{-1} のバンドが P-O(H) 伸びによる間伸びている PO-H のために得られました。DCPA 粉出現近い 3100 cm^{-1} において伸びている O-H の広いバンドと、そして 1390 cm^{-1} での吸収のバンドについて O-H と一致していました。興味深い水によると、O-H 伸びは使われたバンドとして 3530 cm^{-1} 近くで出現し、 H_2O の曲線は 1660 cm^{-1} 近くで検出されました。合成 HAp の IR スペクトルは、1040、602、555 cm^{-1} で図5 (b) ピークを示し一致していた PO_4^{3-} 屈折モード、3570、3420 cm^{-1} のピークは、O-H 振動モードに割り当てられました。

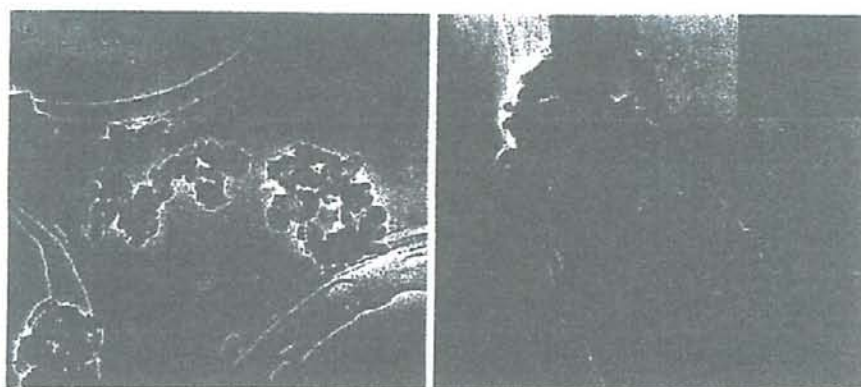


Fig. 6. TEM images of (a) needle shape and (b) spherical shape of HAp powder.

Table 2
Chemical analysis determined by ICP-MS (unit: ppb)

| | |
|----------|---------|
| Li | 25.1 |
| Be | ND |
| B | ND |
| Na | 5158 |
| Mg | 7267 |
| Al | 220.3 |
| Si | ND |
| Ti | 32.4 |
| V | 1876 |
| Cr | 162 |
| Mn | 3330 |
| Co | 579.6 |
| Ni | 3738 |
| Cu | 487.7 |
| Zn | 134.8 |
| Ga | 165.2 |
| Ge | 130.5 |
| As | ND |
| Se | 16.6 |
| Sb | 6.4 |
| Sr | 11980 |
| Zr | 8.8 |
| Mo | 14.3 |
| Pd | 166.6 |
| Ag | ND |
| Cd | 7.3 |
| In | 0.3 |
| Sn | 6.9 |
| Cs | 0.5 |
| Ba | 5006 |
| La | 5.6 |
| Au | 1341 |
| Hg | ND |
| Tl | 1.5 |
| Pb | 138.3 |
| Bi | 3.2 |
| Th | ND |
| U | ND |
| Total | 42009.9 |
| Impurity | 0.004% |

図6はマイクロ波照射システムによって合成されたHApのTEMイメージを示します。凝集粒子の上で、HAp粒子は2タイプの形態学を示します。

図6中に、針と球形の形があります。

針形のサイズは幅における約4-15nmと長さにおける20-50nmです。

拡散したリングパターンと同様に図6(a)中で示された挿入された電子回折図形と鋭いリングパターン。

この観察は、ナノサイズ合成HApが非結晶とクリスタルのフェーズから成っていたことを示します。

図6(b)中で、ほとんどの合成HApはナノサイズの針形によって見られたけれども、少量のそれは直径約10-40nmのナノサイズの球形が見られました。

挿入された電子回折図形において、球形の形を持つHApが素晴らしいサイズの結晶によって存在していたので、多くの場所を含む鋭いリングパターンが観察されました。

しかし、拡散したリングは非結晶のHApフェーズの存在によります。

ナノサイズHApの合成粉末の純粋さの決定のために、不純物の集中はICP-MSを用いました。

定量的な分析の結果はTable.2中で示されます。

結果から、私達は、マイクロ波照射方法によって合成されたHApが50ppm(0.005%)未満の不純物によって極端な高純度の合成HApとして得られたことを確認することができます。

マイクロ波照射方法はまさしくその無類のものであり、合成を有益に、マイクロ波、照射時間、およびCa/P

のアウトプットの上の依存状態にもかかわらずカルシウムリン酸塩は比率を越します。共通の方法によって HAp 合成に時間がかかり反応と低い品質を改善することにおいて、マイクロ波照射方法は考慮されます。

この仕事において、HAp の極端な高純度は分離ステップと浄化ステップなしでマイクロ波照射方法によって合成されました。

さらに、30 分以内に反応の中の全体の反応速度が徐々に減らされました。

(7 分反応、乾燥 3 分、および冷却 20 分)

反応槽の中で、出発物質としての $\text{Ca}(\text{OH})_2$ は H_3PO_4 と混じります。

マイクロ波照射を適用することによって、温度とプレッシャーは $300^\circ\text{C}600\text{psi}$ で数秒の間急速にそれぞれ上げられます。

分解と反応レートは、また、衝突および減少 ギブズの自由エネルギー の番号の増加のため増大します。

しかし、温度が上昇する時に、 CaCO_3 ($K_{sp}=5\times 10^{-9}$)、 $\text{CaC}_2\text{O}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($K_{sp}=2.34\times 10^{-9}$)、 CaSO_4 ($K_{sp}=7.1\times 10^{-5}$)、

および $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($K_{sp}=2.07\times 10^{-33}$) などのカルシウム化合物はより可溶性ではなくなります。

それゆえ、反応の製品は水の中で速く促進され $\text{Ca}(\text{OH})_2$ CaHPO_4 などの反応物の可溶性と反応レートは増大します。最終的に、HAp 合成反応は 10 分以内に終わります。

4. 結論

ナノサイズのヒドロキシアパタイト(HAp)は、マイクロ波照射システムを使って、斬新な方法によって首尾よく合成することが出来ました。

HAp 合成は適用されたマイクロ波能力と Ca/P の比率などの実験パラメータに強く依存していました。

HAp 合成の最適条件は 1.67、550W のマイクロ波エネルギー、4 分の反応速度のカルシウム/リン比として選ばれました。

最初の反応過程で、 CaHPO_4 は H_3PO_4 と $\text{Ca}(\text{OH})_2$ から中間物として得られ、それから中間物は反応の間に溶解したイオンと反応しました。

最終的に、HAp 粉末の単相が得られました。

HAp 粒子は針と球形を形成しました。

針形は幅における約 4-15nm と長さは 20-50nm であり、球形の形は直径約 10-30nm です。

合成した HAp の不完全さは約 50ppm 未満(0.005%)として ICP-MS.によって決定されました。

従って、マイクロ波照射システムは高純度さから極めて細かいサイズを持つ合成 HAp のための有用な方法の 1 つと言えます。

謝辞

この仕事は韓国科学技術部の NRL 研究計画によってサポートされました。



Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method

Jae-Kil Han^a, Ho-Yeon Song^{b,d}, Fumio Saito^c, Byong-Taek Lee^{a,*}

^a School of Advanced Materials Engineering, Kongju National University, 182 Sinkwan-dong, Kongju, Chungnam 314-701, South Korea

^b College of Medicine, Soonchunyang University, 23-20 Bongmyung-dong, Chuman 330-930, South Korea

^c Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2-1-1 Katahira Aoba-ku Sendai 980-8577, Japan

^d Human NanoTech, Kongju National University, 182 Sinkwan-dong, Kongju, Chungnam 314-701, South Korea

Received 13 April 2005; received in revised form 29 July 2005; accepted 21 October 2005

Abstract

Nano-sized hydroxyapatite (HAp) powders were synthesized by a microwave-hydrothermal method using H_3PO_4 and $Ca(OH)_2$ as starting materials in a closed-vessel microwave device at 600 psi and 300 °C for 30 min. The applied microwave powers and mole ratio of Ca/P served as powerful factors in the synthesis of calcium phosphate. In the case of relatively low microwave power of 450 W and Ca/P ratio of 1.57, mixed calcium phosphate compounds such as $Ca(OH)_2$, $CaHPO_4$ and HAp were detected in the synthesized powders. But in the case of running at 550 W, synthesized powder showed the monophase of HAp having two kinds of morphologies. One was a needle shape with 4–15 nm in width and 20–50 nm in length, and the other was a spherical shape of 10–30 nm in diameter. The purity of nano-sized HAp powder was determined as 99.95% by ICP-MS.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Biomaterials; Nanomaterials; Stoichiometric; Hydroxyapatite

1. Introduction

Calcium phosphates have many kinds of derivatives according to the mole ratio of Ca/P and surrounding conditions. There are monocalcium phosphate monohydrate (MCPM, $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot (H_2O)$, Ca/P molar ratio = 0.5), dicalcium phosphate dihydrate (DCPD, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, Ca/P = 1.0), dicalcium phosphate anhydrate (DCPA, $CaHPO_4$, Ca/P = 1.0), calcium triphosphate (CPP, $Ca_2P_2O_7$, Ca/P = 1.13), α -tricalcium phosphate/ β -tricalcium phosphate (α -/ β -TCP, $Ca_3(PO_4)_2$, Ca/P = 1.5), tetracalcium phosphate (TTCP, $Ca_4(PO_4)_2O$, Ca/P = 2.0) and hydroxyapatite (HAp, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, Ca/P = 1.67, hereafter described as HAp). Among them, HAp is one of the most attractive calcium phosphates and used as clinical application such as restorative dental and orthopedic implants because of its close resemblance to the natural bones and teeth, its good bioaffinity and enhancement of osseointegration [1–3]. But it is difficult to make the high purity HAp because of calcium phosphates have many derivatives and

the synthesis of calcium phosphates strongly dependent on the reaction conditions. Therefore, many kinds of HAp synthesis methods such as acid–base reaction, precipitation, hydrothermal method and sol–gel method have been introduced [4–8]. Generally, these commercial methods have some problems induced by long time-consuming, tedious work, low quality control and chemical contamination.

One approach to overcome these drawbacks is the microwave-hydrothermal method, which enables to synthesize the ultra fine and high purity powders for shortening working time [9,10]. This method has some advantages such as heating throughout the media, rapid heating, fast reaction, high yield, excellent reproducibility, narrow particle distribution, high purity and high efficient energy transformation [11–15]. When the microwave irradiation is applied in the closed-vessel microwave device, microwave induces the rotation and migration of materials having dielectric property and molecular dipole moment [15]. By microwave absorbing the inside of reaction vessel enabled to generate simultaneously at high pressure over 600 psi as well as high temperature over 300 °C for several seconds. Hence, the reaction rate was dramatically enhanced due to the increase of collision among the individual reactants [15–17]. The microwave heating can enable to heat homogeneously both

* Corresponding author. Tel.: +82 41 850 8677; fax: +82 41 858 2939.

E-mail address: lbt@kongju.ac.kr (B.-T. Lee).

core and the surface of materials because of the microwave energy transfers to the thermal energy by collision between rotating materials. Therefore, the microwave heating can reduce the thermal stress and the temperature gradient in heated materials more efficient than that of the general heating process [18–20]. In this work, HAp powders were synthesized from phosphoric acid and calcium hydroxide using the microwave-hydrothermal method. The formation of HAp depending on the microwave energies and the Ca/P ratios were carried out. Moreover, there are no previous papers on the synthesis of nano-sized HAp using microwave-hydrothermal method. To clearly understand the process of synthesis reaction, the Ca/P ratio, purity and crystal structure of HAp powders were measured by ICP-MS, FT-IR and XRD.

Experimental procedure

Starting materials used for HAp synthesis were calcium hydroxide (Ca(OH)_2 , Aldrich Chemical, 99.995%) and phosphoric acid (85.0–87.0% P_2O_5 , Dongwoo Fine Chemicals, electronic grade). The microwave-hydrothermal system for synthesis was performed in a commercial instrument (D microwave labstation, Milestone, Italy), which is generated with 1000 W of output power by dual magnetron device and uses a 2.45 GHz frequency microwave radiation. When the operating powers are automatically set to 250–1000 W by Windows[®]-based control software, internal temperatures and pressures in closed synthesis vessel are also monitored 85–300 °C, 400–800 psi, respectively. Reactants are weighed in molar ratio of 1.17–1.77. The amounts of calcium and phosphorus in each sample were presented in Table 1. Weighed samples were transferred in the closed-vessel microwave oven made by perfluoroalkoxy (PFA) Teflon and 3 ml of deionized water was added. These vessels were capped, sealed and heated by the microwave irradiation for 5–10 min. To synthesize the nano-sized HAp powders, the first step is a warming-up process generated at 250 W for 2 min, the second step is a reaction process generated at 250–650 W for 4 min, and the final step is a cooling process for 20 min. After finishing the synthesis of HAp, both the elimination of residuals in products and the crystallization of powders were carried out by microwave heating process at 250 W for 3 min.

The Ca/P ratio and impurity of synthesized HAp powders were determined by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES, Optima 3000, Perkin-Elmer, USA) and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS, Elan 6000, Perkin-Elmer, USA), respectively. To evaluate the chemical groups of samples, FT-IR spectra were performed using KBr pellets on a FT-IR spectrometer (Model 580, Perkin-Elmer, USA). The thermal analysis of synthesized HAp powders were carried out using TG/DTA (SDT Q600, TA instruments) between room temperature to 1300 °C in argon at a heating rate of 10 °C min⁻¹. The crystal structures of samples were identified by X-ray diffraction (XRD, MAX-250, Rigaku). The morphology and microstructure of HAp powders were investigated using SEM (JSM-635F, Jeol) and TEM (JEM-2010, Jeol).

Results and discussion

Fig. 1 shows X-ray diffraction patterns of synthesized powders with Ca/P molar ratio of 1.67 depending on the microwave energies. In the XRD pattern of the powders after microwave irradiation at 250 W for 4 min, in Fig. 1(a), the crystal structure

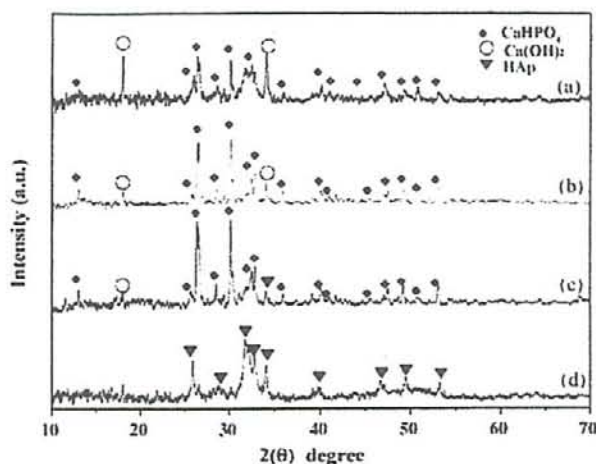


Fig. 1. XRD patterns of HAp powders depending on the microwave energies: (a) 250 W, (b) 350 W, (c) 450 W and (d) 550 W.

was detected with mixed phases of Ca(OH)_2 , CaHPO_4 and HAp. When the microwave energy was increased at 350 and 450 W, in Fig. 1(b) and (c), dicalcium phosphate anhydrate (DCPA, CaHPO_4) phase was remarkably increased while Ca(OH)_2 phase was reduced inversely. But small amount of HAp phase existed. In the case of Fig. 1(d), irradiating microwave energy at 550 W for 4 min, only one phase of HAp existed and CaHPO_4 peaks were not detected.

Fig. 2 shows XRD patterns of HAp powders depending on the Ca/P ratios at 550 W microwave irradiation for 4 min. In the case of powder with Ca/P ratio of 1.17, in Fig. 2(a), the crystal structure of powder was detected with only phase of the dicalcium phosphate anhydrate. As Ca/P ratios increased with 1.37 to 1.57, in Fig. 2(a)–(d), HAp phases appeared although dicalcium phosphate phase still existed up to Ca/P ratio of 1.57. However, synthesized powder with Ca/P ratio of 1.67, in Fig. 2(e), detected only HAp phase without CaHPO_4 peaks. In the case of Fig. 2(f), Ca/P ratio of 1.77, HAp peaks were mainly detected and a small

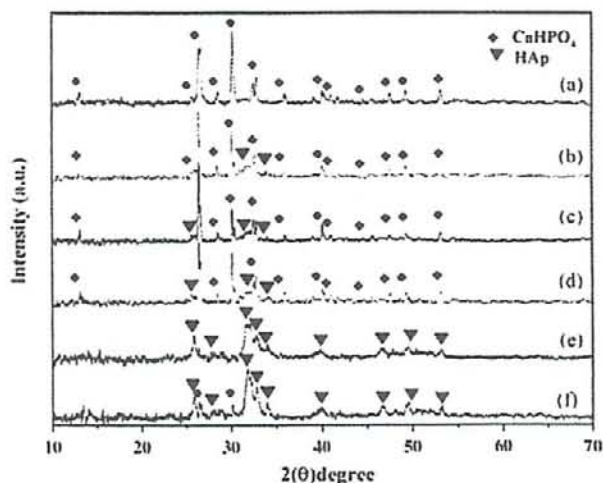


Fig. 2. XRD patterns of HAp powders depending on the Ca/P ratio at 550 W microwave irradiations: (a) 1.17, (b) 1.37, (c) 1.47, (d) 1.57, (e) 1.67 and (f) 1.77.

Table 1
Components of starting materials

| Ca/P ratio | 1.17 | 1.37 | 1.47 | 1.57 | 1.67 | 1.77 |
|-------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Ca(OH)_2 | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g | 0.400 g |
| H_3PO_4 (85%) | 0.533 g | 0.455 g | 0.424 g | 0.396 g | 0.373 g | 0.352 g |

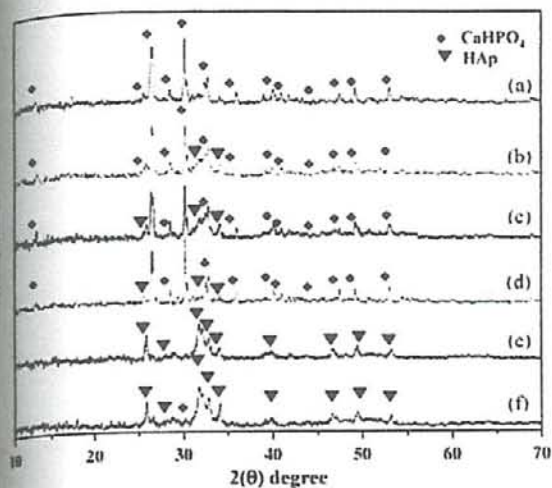


Fig. 4. XRD patterns of HAp powders depending on the Ca/P ratio at 650 W microwave irradiations: (a) 1.17, (b) 1.37, (c) 1.47, (d) 1.57, (e) 1.67 and (f) 1.77.

of CaHPO_4 as the remainder of synthesis existed due to excess of calcium contents.

Fig. 3 shows XRD profiles of synthesized powders at 650 W. The trend of HAp synthesis by microwave digestion system showed a similar pattern of results of Fig. 2. As a result, we can understand that the output power of microwave for HAp synthesis is required to be above 550 W and also is necessitated stoichiometric control of the Ca/P ratio of 1.67 in the starting materials.

Fig. 4 shows the TG/DTA thermogram of HAp powder synthesized by microwave digestion system. In the TG curve, the steep slope was not detected and the percent of weight loss was only decreased by 8.5% at total measured temperature ranges, which indicated its thermal stability. In the DTA curve, no other endothermic and exothermic peaks up to 1100 °C were detected because most of HAp powder did not decompose with other phases. An endothermic peak was detected at 1150 °C, which was estimated to the phase transformation of HAp into the β -CP phase.

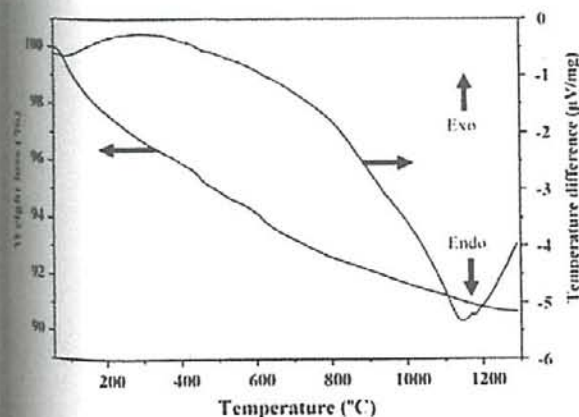


Fig. 4. TG/DTA thermogram of HAp powder synthesized by microwave digestion system.

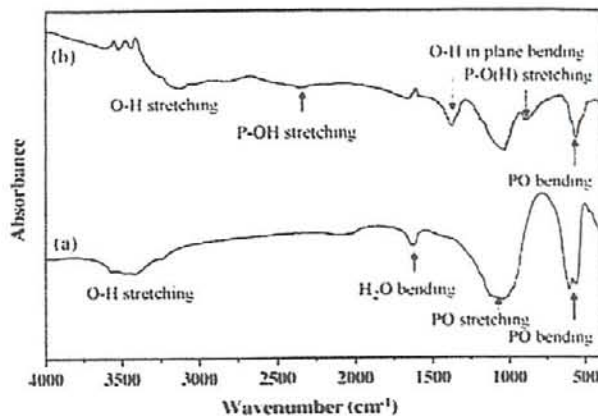


Fig. 5. FT-IR spectra of (a) DCPA and (b) HAp powder synthesized by microwave digestion system.

Fig. 5 shows the FT-IR spectra of DCPA/HAp powders synthesized by microwave digestion system. As shown in Fig. 5(a), the bands due to the PO stretching were absorbed strongly at 1030 and 563 cm^{-1} . The wide band near 2360 cm^{-1} was obtained for PO–H stretching, while the band at 895 cm^{-1} was due to P–O(H) stretching. The broad band of O–H stretching in the DCPA powder appeared near 3100 cm^{-1} and then the band of absorption at 1390 cm^{-1} was corresponded to the O–H in plane bending. According to the absorbing water, the O–H stretching appeared near 3530 cm^{-1} as a split band and the H_2O bending was detected near 1660 cm^{-1} . The IR spectrum of HAp powder shows Fig. 5(b). The peaks at 1040, 602 and 555 cm^{-1} were corresponded to the PO_4^{3-} bending mode and the peaks at 3570 and 3420 cm^{-1} were assigned to the O–H vibration mode.

Fig. 6 shows TEM images of HAp powders synthesized by microwave digestion system. On the agglomerated particles, HAp particles show two types of the morphologies. In Fig. 6, there are the needle and spherical shapes. The size of the needle shape is about 4–15 nm in width and 20–50 nm in length. The inserted electron diffraction pattern shown in Fig. 6(a) and a sharp ring pattern as well as a diffused ring pattern. This observation indicates that HAp nanopowder was comprised of an amorphous and crystal phase. In Fig. 6(b), most HAp powders were seen with a nano-sized needle shape but a small amount of it was seen with a nano-sized spherical shape about 10–40 nm in diameter. In the inserted electron diffraction pattern, the sharp ring pattern including many spots was observed because the HAp powders with the spherical shape existed with fine sized crystals. But the diffused ring is due to the existence of the amorphous HAp phase.

For the purity determination of synthesized HAp nanopowder, concentrations of impurity were determined by ICP-MS. The results of quantitative analysis are shown in Table 2. From the results, we can confirm that HAp powders synthesized by microwave-hydrothermal method were obtained with the ultra high purity HAp powders with impurity below 50 ppm (0.005%). The microwave-hydrothermal method is a very unique and useful to synthesis the calcium phosphates despite the dependency on the output of microwave, irradiation time and Ca/P molar

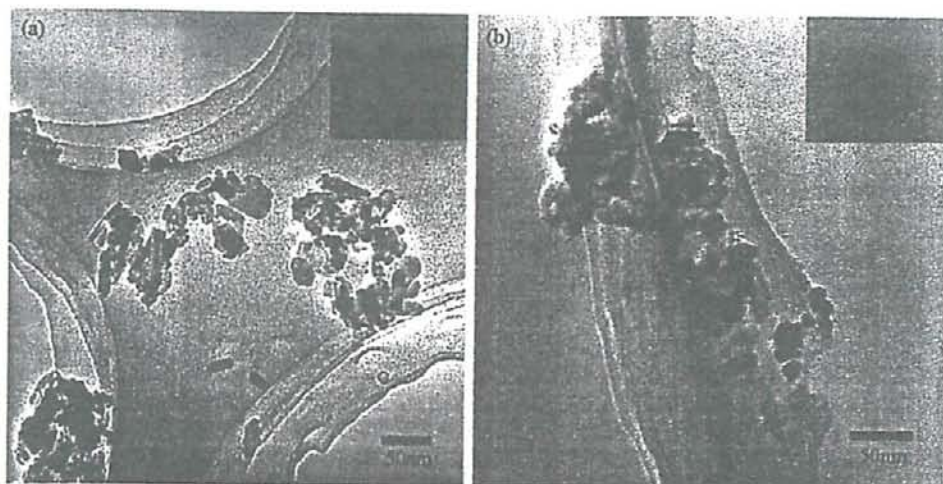


Fig. 6. TEM images of (a) needle shape and (b) spherical shape of HAp powder.

analysis determined by ICP-MS (unit: ppb)

| |
|---------|
| 25.1 |
| ND |
| ND |
| 5158 |
| 7267 |
| 220.3 |
| ND |
| 32.4 |
| 1876 |
| 162 |
| 3330 |
| 579.6 |
| 3738 |
| 487.7 |
| 134.8 |
| 165.2 |
| 130.5 |
| ND |
| 16.6 |
| 6.4 |
| 11980 |
| 8.8 |
| 14.3 |
| 166.6 |
| ND |
| 7.3 |
| 0.3 |
| 6.9 |
| 0.5 |
| 5006 |
| 5.6 |
| 1341 |
| ND |
| 1.5 |
| 138.3 |
| 3.2 |
| ND |
| ND |
| 42009.9 |
| 0.004% |

ratio. In improving the time-consuming reaction and low quality of HAp synthesized by common methods, a microwave-hydrothermal method is considered.

In this work, the ultra high purity of HAp powder was synthesized by microwave-hydrothermal method without the separation step and the purification steps. Moreover, the total reaction time of in situ reaction was dramatically reduced within the 30 min: 7 min of reaction, 3 min of drying and 20 min of cooling. In the reaction vessel, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as a starting material is mixed with H_3PO_4 . By applying microwave irradiation, the temperature and pressure is rapidly increased for several seconds at 300 °C, 600 psi, respectively. The dissolution and reaction rate are also increased due to the increase in the number of collision and the decrease the Gibbs free energy. But calcium compounds such as CaCO_3 ($K_{sp}=5 \times 10^{-9}$), $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($K_{sp}=2.34 \times 10^{-9}$), CaSO_4 ($K_{sp}=7.1 \times 10^{-5}$) and $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($K_{sp}=2.07 \times 10^{-33}$) become less soluble as the temperature increases. Hence, products of reaction are fast precipitated in the water. The solubility and the reaction rate of reactants such as $\text{Ca}(\text{OH})_2$ CaHPO_4 are increased. Finally, the reaction of HAp synthesis is finished within 10 min.

4. Conclusion

The nano-sized hydroxyapatite (HAp) was successfully synthesized by a novel method using the microwave digestion system. The synthesis of HAp was strongly dependant on the experimental parameters such as the applied microwave powers and mole ratio of Ca/P. Optimal conditions of HAp synthesis were selected as Ca/P ratio of 1.67, 550 W of microwave energy and 4 min of reaction time. In the initial reaction step, CaHPO_4 was obtained as an intermediate from H_3PO_4 and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and then the intermediate reacted with dissolved ions during the reaction. Finally, the monophase of HAp powder was obtained. HAp particles consisted of the needle and the spherical shape. The needle shape is about 4–15 nm in width and 20–50 nm in length, and the spherical shape is about 10–30 nm in diameter. The total impurity of HAp synthesized was determined as nearly below

50 ppm (0.005%) by ICP-MS. Therefore, microwave digestion system is one of the attractive methods for HAp synthesis with high purity and ultrafine size.

Acknowledgements

This work was supported by NRL research program of the Korean Ministry of Science and Technology.

References

- [1] A. Morancais, F. Louvet, D.S. Smith, J.P. Bonnet, *J. Euro. Ceram. Soc.* 23 (2003) 1949;
- E.W. White, E.C. Shors, *Dental. Clin. N. Am.* 30 (1986) 49.
- [2] E.C. Shors, E.W. White, G. Kopchok, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 110 (1989) 211.
- [3] M. Fabbri, G.C. Celotti, A. Ravaglioli, *Biomaterials* 15 (1994) 474.
- [4] Z. Amjad, P.G. Koutsoukos, P.L. De Bruyn, *J. Coll. Inter. Sci.* 80 (1981) 225.
- [5] P. Koutsoukos, Z. Amjad, M.B. Tomson, G.H. Nacollas, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 1553.
- [6] P.W. Brown, M. Fulmer, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 934.
- [7] D.K. Agrawal, Y. Fang, D.M. Roy, K. Roy, *Mater. Sci. Symp. Proc.* 269 (1992) 231.
- [8] F. Chen, Z.C. Wang, C.J. Lin, *Mater. Lett.* 57 (2002) 858.
- [9] F. Fang, D.K. Agrawal, D.M. Roy, R. Roy, *J. Mater. Res.* 9 (1994) 180.
- [10] F. Fang, D.K. Agrawal, D.M. Roy, R. Roy, *Mater. Lett.* 23 (1994) 147.
- [11] Y.B. Kholam, A.S. Deshpande, A.J. Patil, H.S. Potdar, S.B. Deshpande, S.K. Date, *Mater. Chem. Phys.* 71 (2001) 304.
- [12] X. Xu, Y. Bao, C. Song, W. Yang, J. Lin, L. Lin, *Micropor. Mesopor. Mater.* 75 (2004) 173.
- [13] H. Yang, C. Huang, X. Li, R. Shi, K. Zhang, *Mater. Chem. Phys.* 90 (2005) 155.
- [14] S.B. Deshpande, Y.B. Kholam, S.V. Bhoraskar, S.K. Date, S.R. Sainkar, H.S. Potdar, *Mater. Lett.* 59 (2005) 293.
- [15] J. Liu, K. Li, H. Wang, M. Zhu, H. Yan, *Chem. Phys. Lett.* 396 (2004) 429–432.
- [16] B. Vaidyanathan, K.J. Rao, *Bull. Mater. Sci.* 19 (1996) 1163.
- [17] J.P. Cheng, D.K. Agrawal, S. Komarneni, M. Mathis, R. Roy, *Mater. Res. Innova.* 1 (1997) 44.
- [18] J.D. Katz, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 22 (1992) 153.
- [19] D.E. Clark, W.H. Sutton, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 26 (1996) 299.
- [20] J. Xu, I.S. Butler, D.F.R. Gilson, *Spectrochim. Acta A* 55 (1999) 2801.

マイクロ波照射方法による純度の高いナノサイズヒドロキシアパタイトの合成

ナノサイズの Hap 粉末は、30 分間 600psi と 300°C で閉容器マイクロ波装置の中で素材として H_3PO_4 と $Ca(OH)_2$ を使って、電子レンジ熱水の方法を用いて合成を行った。

適用されたマイクロ波粉と Ca/P の比率はリン酸カルシウムの強力なファクターとして役立ちました。450W の比較的低いマイクロ波パワーと 1.57 のカルシウム/リン比の場合に、 $Ca(OH)_2$ 、 $CaHPO_4$ 、Hap 粉末などの混じったリン酸カルシウム化合物は合成した粉に検出されました。しかし、550W、1.67 で動く場合に、合成した粉は 2 種類の形態学を持っている Hap 粉末の単相を示しました。一方は幅 4-15nm と長さ 20-50nm を持つ針形であり、他は直径 10-30nm の球形の形でした。ナノサイズの Hap の純粋さは 99.995% と ICP-MS によって決定されました。

カルシウムリン酸塩は Ca/P と周辺の条件の比率に従って多種類の誘導体を含みます。

単カルシウムリン酸塩一水化物(MCPM, $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot (H_2O)$ 、Ca/P 白歯率=0.5)、二カルシウムリン酸塩 (DCPD, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 、Ca/P=1.0)、二カルシウムリン酸塩無水物(DCPA, $CaHPO_4$ 、Ca/P=1.0)(カルシウムピロリン酸塩 (CPP, $Ca_2P_2O_7$ 、Ca/P=1)があります。(x-トリカルシウムリン酸塩/ β -トリカルシウムリン酸塩 ((x-/13-TCP, $Ca_3(PO_4)_2$ 、Ca/P=1.5)、テトラカルシウムリン酸塩 (TTCP, $Ca_4(PO_4)_2O$ 、Ca/P=2.0)、およびヒドロキシアパタイト(Hap, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 、今後 HAp と評される(Ca/P=1.67)。

それらの間で、HAp は最も有用なカルシウムリン酸塩の 1 つであり、自然な骨格と歯へのその類似性による回復した歯と整形外科のインプラントなどの臨床アプリケーションとして使われて、それが、カルシウムリン酸塩のため純度の高い HAp をオッセオ合成[1-31.バイオ類縁と向上は多くの誘導体と反応条件に強く依存しているカルシウムリン酸塩の合成を含みます。従って、酸塩基反応、促進、水熱法、およびゾルゲルなどの多くの種類の HAp 合成の方法は導入された[4-8]でした。

一般に、これらの商業用の方法は長い時間がかかりすぎて、退屈な仕事、低い品質管理、および化学汚染によって引き起こされたいくつかの問題を持っています。

これらの欠点を克服する 1 つの方法はマイクロ波照射方法です[9, 10].この方法がメディア、急速加熱、速い反応、高利回り、素晴らしい再現性、狭い粒子分布、高純度、および高い効率的なエネルギー変化[11-15]にわたって加熱などのいくつかの利点を持っている短期労働時間の間極端な不確かさと高い効率を合成するために、それは可能にします)。

マイクロ波照射が閉容器マイクロ波装置に應用される時に、マイクロ波は、数秒の間の 300°C より上の高温と同様に同時に高压で 600psi 以上を生成することを可能にされた反応槽の中を吸収している誘電的性質と分子双極子モーメント[15]電子レンジを持っている素材の回転と移住を引き起こします。

それゆえ、反応レートはドラマチックに、個々の反応物の間の共謀の増加のため強化されて、[15-17]マイクロ波加熱が、均質に回転素材の間の衝突による熱エネルギーへのマイクロ波エネルギー転送による素材のコアと表面の両方を熱するために可能にすることができるとして。

従って、マイクロ波加熱は一般的な加熱過程[18-20]のそれより効率的な熱せられた素材の中で熱応力と温度勾配を減らすことができます。

この働きは、マイクロ波照射方法を使って、燐酸と水酸化カルシウムから合成されました。

マイクロ波エネルギーとカルシウム/リン比に依存している HAp の構成は実行されました。

さらに、マイクロ波照射方法を使って、ナノサイズの HAp 合成において前例がありませんでしたが、はっきりと、合成反応、HAp のカルシウム/リン比、純粋さ、および結晶構造のプロセスが ICP-MS、FT-IR、および XRD によって測定されました。

2. 実験操作

HAp 合成のために使われた出発物質は水酸化カルシウム($Ca(OH)_2$ 、オールドリッチ化学薬品、99.995%)と燐酸(85.0-87.0%の H_3PO_4)、Dongwoo 精製化学製品、電子グレードでした。

合成のためのマイクロ波照射機構は商業証券(特性 D マイクロ波、マイルストーン、イタリア)中で執行されました(それは 1200W の出力によってデュアルマグネトロン機器によって生成されて、2.45GHz の頻度マイクロ波放射を使います)。

動作電力は Windows の@ベースのコントロールソフトウェアによって 250-1000W に自動的に適合させられて、閉鎖合成容器の中の内部の温度と圧力はそれぞれまた 200-600psi、85-300°C 監視されます。

反応物は 1.17-1.77 のモル比において重量測定されて、各サンプルの中のカルシウムとリンの量 Table1 に示されました。重量測定されたサンプルはテフロンによって作られた閉容器マイクロ波装置の中で移動し、3ml の脱イオン水を加えました。

これらの容器継ぎ目草は 5-10 分間マイクロ波照射によってふたとして働いていて、封印し、熱くなりまし。ナノサイズ HAp を合成するために、最初のステップは 2 分間 250W で発生した暖機運転プロセスであり、第 2 段階は 4 分間 250-650W で発生した主要な反応プロセスであり、最終ステップは 20 分間の冷却法

です。

HAp の合成を終えた後に、製品中の残余の除去と粉の結晶化の両方は 3 分間の 250W) 波加熱過程によって運ばれました。

合成した HAp のカルシウム/リン比と不純物はそれぞれ帰納的に結合されたプラズマ原子排出分光法(ICP-AES, Optima 3000, Perkin-Elmer 米国)と帰納的に結合されたプラズママス分光法(ICP-MS, エラン 6000, Perkin-Elmer 米国)によって決定されました。

サンプルの機能的なグループを評価するために、FT-IR スペクトルは、合成された HAp の FT-IR 分光計 (Model 1580, Perkin-Elmer 米国) .熱分析において KBr ペレットを使って実行されました その加熱レートでアルゴンの 1300°Cまで室温の間の TG/DTA (SDT Q600, TA 機器) を使う外で運ばれた。10 °C min⁻¹ . サンプルの結晶構造は、エックス線回折 (D/SEM (JSM-635Jeol) と TEM(JEM-2010, Jeol)を使って、調査された HAp のマックス-250 個) 理学、形態学、および微小組織によって識別されました。

3. 結果と議論

拡散したリングは非結晶の HAp フェーズの存在によります。

ナノサイズ HAp の合成粉末の純粋さの決定のために、不純物の集中は ICP-MS を用いました。

定量的な分析の結果は Table.2 中で示されます。

結果から、私達は、マイクロ波照射方法によって合成された HAp が 50ppm(0.005%)未満の不純物によって極端な高純度の合成 HAp として得られたことを確認することができます。

マイクロ波照射方法はまさしくその無類のものであり、合成を有益に、マイクロ波、照射時間、および Ca/P のアウトプットの上の依存状態にもかかわらずカルシウムリン酸塩は比率を越します。

共通の方法によって HAp 合成に時間がかかり反応と低い品質を改善することにおいて、マイクロ波照射方法は考慮されます。

この仕事において、HAp の極端な高純度は分離ステップと浄化ステップなしでマイクロ波照射方法によって合成されました。

さらに、30 分以内に反応の中の全体の反応速度が徐々に減らされました。

(7分反応、乾燥3分、および冷却20分)

反応槽の中で、出発物質としての Ca(OH)₂ は H₃PO₄ と混じります。

マイクロ波照射を適用することによって、温度とプレッシャーは 300°C600psi で数秒の間急速にそれぞれ上げられます。

分解と反応レートは、また、衝突および減少 ギブズの自由エネルギーの番号の増加のため増大します。

しかし、温度が上昇する時に、CaCO₃(K_{sp}=5×10⁻⁹)、CaC₂O₄·2H₂O(K_{sp}=2.34×10⁻⁹)、CaSO₄(K_{sp}=7.1×10⁻⁵)、および Ca₃(PO₄)₂ (K_{sp}=2.07×10⁻³³)などのカルシウム化合物はより可溶性ではなくなります。

それゆえ、反応の製品は水の中で速く促進され Ca(OH)₂ CaHPO₄ などの反応物の可溶性と反応レートは増大します。最終的に、HAp 合成反応は 10 分以内に終わります。

4. 結論

ナノサイズのヒドロキシアパタイト(HAp)は、マイクロ波照射システムを使って、斬新な方法によって首尾よく合成することが出来ました。

HAp 合成は適用されたマイクロ波能力と Ca/P の比率などの実験パラメータに強く依存していました。

HAp 合成の最適条件は 1.67、550W のマイクロ波エネルギー、4 分の反応速度のカルシウム/リン比として選ばれました。

最初の反応過程で、CaHPO₄ は H₃PO₄ と Ca(OH)₂ から中間物として得られ、それから中間物は反応の間に溶解したイオンと反応しました。

最終的に、HAp 粉末の単相が得られました。

HAp 粒子は針と球形を形成しました。針形は幅における約 4-15nm と長さは 20-50nm であり、球形の形は直径約 10-30nm です。合成した HAp の不完全さは約 50ppm 未満(0.005%)として ICP-MS.によって決定されました。従って、マイクロ波照射システムは高純度さから極めて細かいサイズを持つ合成 HAp のための有用な方法の 1 つと言えます。

謝辞

この仕事は韓国人科学技術部の NRL 研究計画によってサポートされました。

Coffee carbohydrates

コーヒー炭水化物

Robert Redgwell and Monica Fisher

Braz. J. Plant Physiol., 18 (1) : 165-174, 2006

This review summarises recent advances in the chemistry, physiology, and molecular properties of coffee carbohydrates with a particular focus on the cell wall polysaccharides. The results of detailed chemical studies have demonstrated novel structural features of both the galactomannans and the arabinogalactan polysaccharides of the green and roasted coffee bean. For the first time immunological probes based on monoclonal antibodies for specific polysaccharide epitopes were used to reveal the patterns of distribution of the galactomannans, arabinogalactans and pectic polysaccharides in the coffee bean cell wall. Finally, the results of physiological and molecular studies are presented which emphasise the growing awareness of the potential role the metabolic status of the green bean may play in final coffee beverage quality.

Key words: *Coffea*, cell wall, beverage quality, seed

1. 序論

コーヒー中の炭水化物の重要性は、豆中の炭水化物の高濃縮という事だけでなく、焙煎過程中に起こる複雑な変化も重要と考えられています。この数年間でコーヒー生豆の進展は生理学や生化学にて育まれ、コーヒーの品質への役割も果たしています。しかし、生理学側からのコーヒー炭水化物について大きく発表はされていません。この研究では、細胞壁多糖類に焦点をあててコーヒー炭水化物の化学、生理学、分子の特性をまとめました。

2. 実験・結果

1) 発達中粒の炭水化物の状態

①遊離糖（グルコースやフルクトースなど）

シヨ糖が主要な糖

②多糖類

生豆の乾物重量の 50%以上（マンナン、ガラクトマンナン、アラビノガラクトマンタンパク質）

少量のペクチン質多糖類、キシログリカン

③ガラクトマンナン

開花期が 21-26 週後にガラクトマンナンの Gal/Man 比が減少を始め、遊離ガラクトースが増加

④他の多糖類

Table 1. Monosaccharide composition of alcohol-insoluble residue from coffee bean endosperm at several stages of development

| WVI | Monosaccharide composition (mole %) | | | | | | | |
|-----|-------------------------------------|------|-----|------|------|------|------|------|
| | Rha | Arb | Xyl | Man | Gal | Glc | GlcA | GalA |
| 11 | 3.7 | 18.9 | 1.9 | 9.3 | 23.9 | 21.7 | 6.6 | 14.0 |
| 15 | 4.7 | 17.3 | 3.6 | 13.4 | 21.7 | 20.8 | 4.7 | 11.0 |
| 21 | 1.7 | 14.7 | 6.5 | 17.6 | 19.1 | 21.7 | 3.4 | 9.3 |
| 26 | 0.5 | 10.1 | 9.4 | 37.0 | 27.7 | 18.2 | 2.4 | 3.6 |
| 31 | 0.1 | 8.6 | 1.1 | 45.4 | 23.0 | 15.9 | 2.4 | 3.2 |
| 37 | 0.6 | 9.1 | 1.0 | 48.6 | 23.2 | 13.7 | 1.9 | 4.1 |

(Redgwell et al., 2002)

2) 多糖類の化学

化学分析によりアラビノガラクトタン・ガラクトマンナンの構造上の特色に焦点をあてました。

①アラビノガラクトタン

生豆からのアラビノガラクトタン抽出は 100°C で 20% NaOH を用いた方法・8M KOH と NaClO₂ を用いた方法では 45% 存在が確認でき、水と EDTA、4M NaOH を用いた方法では多糖類の 10% が遊離しました。

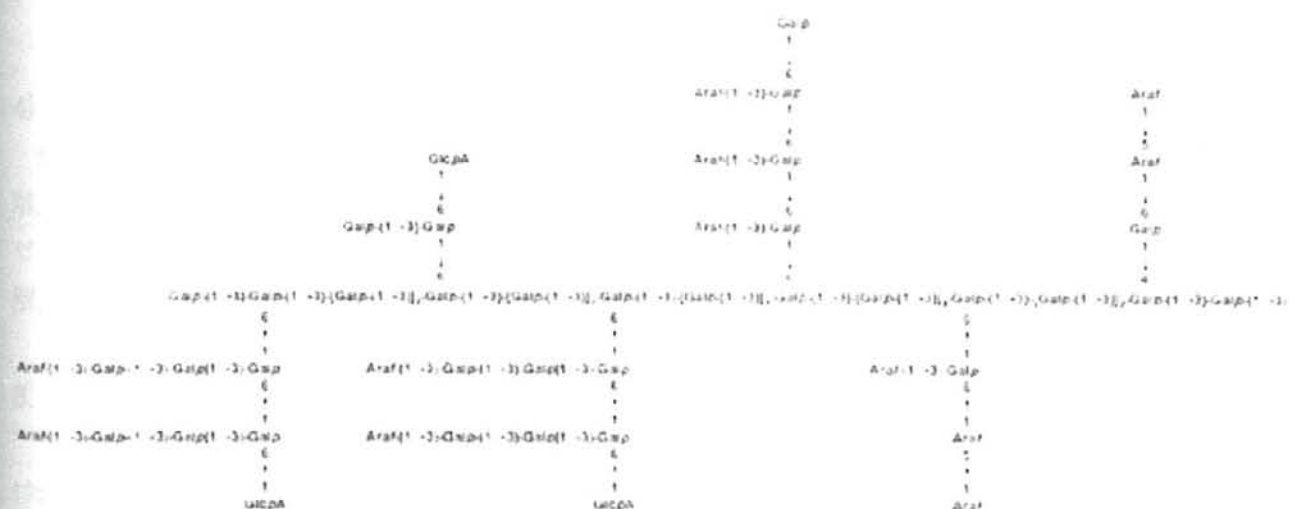


Figure 1. Possible structure of arabmogalactan moiety of coffee AGP (Redgwell et al., 2002a)

②ガラクトマンナン

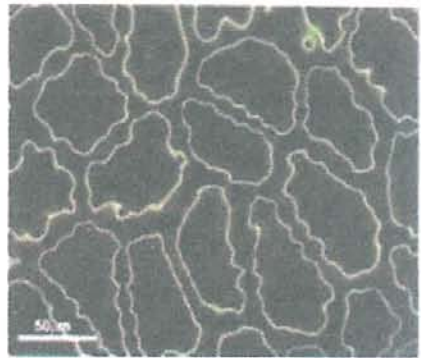
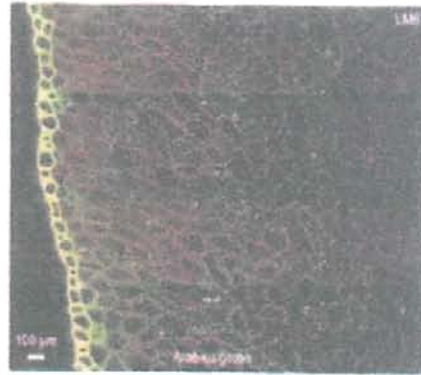
コーヒー細胞壁の主成分。化学・酵素処理より溶解。

3) 細胞壁多糖類の細胞化学と免疫標識

生豆の胚乳部細胞壁に含まれる、アラビノガラクトタンタンパク質・マンナン・ペクチン質多糖類を明らかにしました。

① アラビノガラクトタンタンパク質(AGPs)

β -グリコシル・ヤリブ試薬とモノクローナル抗体 LM 2 の標識の結果、細胞壁の全体を染色。標識パターン異なる LM 6 は、表皮細胞の壁だけを染色。(Fig. 2)



② マンナン

β -1,4-マンナン モノクローナル抗体 BGM C6 で細胞全体の壁を標識。

③ ペクチン質多糖類

モノクローナル抗体 JIM 7 と JIM 5 を用いて標識の結果、JIM 7 だけが胚乳内部を標識。

4) 焙煎コーヒー

焙煎過程はコーヒーの成分の変化に大きく関わり、低分子の糖は焙煎後、ほとんどが分解。また、焙煎過程にガラクトマンナンが可溶化しコーヒー豆中の含有量が減少。アラビノガラクトタンの重合体は、熱に不安定なアラビノフラノシル残基を持つため分解。

3. 結論

この5年間は、コーヒー豆細胞壁を化学的に理解することに安定した進展が見られました。けれど、この研究の大部分はただ多糖類の分離にだけ焦点をあてたものです。コーヒー炭水化物部と他の分子(タンパク質やメラノイジン)の相互作用の合成配列を明らかにするための研究が必要です。

生理学側では、収穫前と収穫後の段階でのコーヒー炭水化物の物質代謝についての知識が欠けています。それらの発達段階のコーヒー炭水化物は最終的に飲料の品質中でどんな重要な役割を持っているのでしょうか。

生豆での炭水化物の状態がコーヒー品質と関わりがあるなら、収穫処理後は今後の研究で重要となるでしょう。

Coffee carbohydrates

Robert Redgwell* and Monica Fischer

Nestlé Research Centre, Lausanne, Vers-Chez-Les-Blanc, P.O. Box 44, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland. *Corresponding author: robert.redgwell@rdls.nestle.com

This review summarises recent advances in the chemistry, physiology and molecular properties of coffee carbohydrates with a particular focus on the cell wall polysaccharides. The results of detailed chemical studies have demonstrated novel structural features of both the galactomannans and the arabinogalactan polysaccharides of the green and roasted coffee bean. For the first time immunological probes based on monoclonal antibodies for specific polysaccharide epitopes were used to reveal the patterns of distribution of the galactomannans, arabinogalactans and pectic polysaccharides in the coffee bean cell wall. Finally, the results of physiological and molecular studies are presented which emphasise the growing awareness of the potential role the metabolic status of the green bean may play in final coffee beverage quality.

Key words: *Coffea*, cell wall, beverage quality, seed.

Carboidratos do café: Este artigo sumariza os mais recentes desenvolvimentos nas áreas de química, fisiologia e propriedades moleculares dos carboidratos do café, com um particular interesse nos polisacarídeos presentes nas paredes celulares. Os resultados dos estudos químicos detalhados demonstraram novas características estruturais tanto nos galactomananos como nos polisacarídeos dos arabinogalactanos do grão de café verde ou torrado. Pela primeira vez, estudos imunológicos baseados em anticorpos monoclonais foram usados para revelar a distribuição dos galactomananos, dos arabinogalactanos e dos polisacarídeos pectídicos na parede celular do grão de café. Finalmente, os resultados dos estudos fisiológicos e moleculares são apresentados de maneira a sublinhar a influência do status metabólico do grão verde do café na qualidade final da bebida.

Palavras-chave: *Coffea*, parede celular, qualidade da bebida, semente.

INTRODUCTION

The importance of carbohydrates in coffee can be attributed to not only their high concentration in the bean but also to the complex changes they undergo during the roasting process which contribute to the organoleptic appeal of the coffee beverage. In this review we will focus on the coffee carbohydrate literature of the last 5 years. Before this time, an excellent summary of coffee carbohydrates was reported in the volume, "Coffee, Recent developments" (Bradbury, 2001). It included a detailed report of the low molecular weight sugars in green and roasted coffee beans of many varieties of Arabica and Robusta, which will not be repeated in the present review. In the last few years interest has grown in the physiology and biochemistry of green coffee bean development and the role this could play in coffee quality. This includes work to understand sugar metabolism in coffee in relation to sink-source relationships during bean

development. However, to date there is very little published literature relating to the carbohydrate physiology of coffee. What there is will be covered in the present review but of necessity the major focus will be the polysaccharides of the coffee bean cell wall, where significant advances in understanding their chemistry, biochemistry and distribution within the endosperm have been made in the last 5 years.

Carbohydrate status of developing grains

Free sugars: The driver for coffee research has been to consider the various components of the coffee grains as potential precursors of coffee beverage flavour and aroma. Whether focusing on the low molecular weight sugars or the polysaccharides, the great majority of such studies have been done on the mature grains of Arabica and Robusta coffee. There is a lack of information on the evolution of

the carbohydrate profile of the grain during its growth and development and the postharvest stages of bean processing. The metabolic status of the green bean at these stages will affect the final chemical composition of the mature green bean and the influences which modulate this metabolic status are factors which impinge on coffee bean quality.

Rogers et al., (1999) conducted a study of the changes to the content of sugars, and sugar alcohols in developing grains from varieties of Robusta and Arabica. The grains were harvested between 12–30 weeks after flowering (WAF) for Arabica and 18–40 WAF for Robusta. In the early stages of development, up to the halfway stage of maturation, glucose and fructose were the major free sugars with glucose consistently twice the concentration of fructose. Glucose levels were higher in the Arabica varieties (between 8–12 % dry weight) than in Robusta (2–4 % dry weight). At the end of grain development concentrations of glucose and fructose had decreased for both species to 0.03 and 0.04 % dry weight respectively, while sucrose at 5–12 % of the dry weight was essentially 100 % of the total free sugars in mature grains.

A more detailed analysis in one variety of Arabica was done by separating the perisperm tissues from the endosperm and analysing the free sugar concentration in each. The higher concentrations of glucose and fructose compared to sucrose in the early stages of development were always associated with perisperm tissue. In the endosperm even at the earliest stages of maturation, sucrose was the dominant sugar.

The authors speculated that the catabolism of sucrose in the perisperm would be consistent with the requirement by the tissue for an increase in osmotic pressure to enable both the initial expansion within the locular space and a sink function.

Results of the analysis of sugar alcohols (mannitol) and oligosaccharides (raffinose, stachyose) did not show any discernible trend that would indicate fundamental changes to the metabolism of these compounds during grain development.

Another recent study (Geromel et al., 2004) investigated the biochemical and molecular characterisation of sucrose synthase (Susy EC2.4.1.13) and invertase during coffee bean development. The objective of this work was to understand sugar metabolism in coffee in relation to sink-source relationships during bean development. To this end they measured the sugar concentrations and activities of the two enzymes in the pulp, perisperm and endosperm from *Coffea arabica* at stages of bean development. Susy was more active

than invertase functioning more towards sucrose degradation than synthesis. This was supported by the fact that no expression of invertase-encoding genes was observed in any of the tissues tested. The Susy activity peaked in the final stages of perisperm development suggesting that the tissue played a role in controlling bean size and in the build up of sugars in the green bean. At the molecular level 2 cDNAs were cloned encoding Susy isoforms which showed differences in their spatial and temporal expression in coffee fruits.

The importance of seed metabolism during postharvest processing methods as it relates to coffee quality has been emphasised by Mazzafera and Purcino (2004). They drew attention to the postharvest physiology of the coffee bean and described changes to several groups of metabolites, including the carbohydrates, which are likely to be influenced by the nature of the postharvest processing methods. Just to what extent the final beverage quality is influenced by the metabolic status of the bean at harvest has yet to be determined but it remains an area which needs more attention from coffee researchers.

Polysaccharides: The polysaccharides which make up ~50 % of the green bean's dry weight, consist of three major types: mannans or galactomannans, arabinogalactan-proteins (AGPs) and cellulose. In addition, there are small amounts of pectic polysaccharides (Redgwell et al., 2002a) and recently xyloglucan was also shown to be present (Oosterveld et al., 2003).

Galactomannans: If there is little information on the biosynthesis of free sugars during coffee bean development there is even less on the biosynthesis of the cell wall polysaccharides. Nevertheless, with the advent of molecular techniques there is now heightened interest in the mode of biosynthesis of coffee cell wall polymers. This is particularly pertinent in relation to the galactomannans, the solubilisation of which is a critical factor in determining the yield of soluble coffee powder during commercial extraction (Clifford, 1985). Cellulose apart, the most resistant polymers to solubilisation are the galactomannans. One of the principal determinants of galactomannan solubility is the frequency of substitution of the mannan backbone with galactose residues. In theory an increase in the degree of galactosylation of the mannans may increase the degree of solubilisation of the galactomannans.

In order to manipulate the final structure of the galactomannans it is necessary to understand the metabolic steps involved in their synthesis. In particular, what are the

crucial steps which dictate the final degree of galactosylation? It is known that in some plants, the final degree of galactosylation is determined by the action of an α -galactosidase which cleaves galactosyl residues from the primary synthetic product. If such a mechanism operated in the coffee bean, then down regulation of the α -galactosidase gene could result in coffee beans with a higher Gal/Man ratio. Fischer et al. (1999) determined the monosaccharide composition of coffee bean cell walls 12, 17 and 29 WAF and reported that early in development the galactomannans were more highly substituted than at maturity. In a more detailed study Redgwell et al. (2003), isolated and characterised galactomannans from the endosperm of coffee beans 11, 15, 21, 26, 31 and 37 WAF. At the earliest stage of development the galactomannans accounted for ~10 % of the polysaccharides but were highly substituted, with Gal/Man ratios between 1:2 and 1:7. At maturity the galactomannan became the predominant polysaccharide accounting for ~50 % of the total endosperm polysaccharides but their degree of substitution decreased with Gal/Man ratios between 1:7 and 1:40. The decrease in the Gal/Man ratio of the galactomannans commenced between 21 and 26 WAF and was in synchrony with a rise in free galactose. It was concluded that the final Gal/Man ratio was to an extent the result of galactose removal from the primary synthetic product by an α -galactosidase.

Other polysaccharides: Of the other polysaccharides in the coffee bean cell wall little has been reported on the subject of developmental changes to their structural features. In the same study which reported developmental changes to the galactomannans (Redgwell et al., 2003) data was published for the monosaccharide composition of the cell wall material at different stages of development (table 1). Making the

reasonable assumption that the arabinose and galactose are derived mostly from the arabinogalactans and the rhamnose and galacturonic acid are structural components of the pectic polysaccharides, some discernible trends can be deduced for the structural features of these polymers during grain development. The Gal/Ara ratio of the arabinogalactans in the earliest stage of growth was 1.3:1 but this gradually increased during grain growth and reached 2.6:1 at maturity. In addition, at the earliest growth stage the arabinogalactan accounted for ~50 % of the total polysaccharides but this decreased to 34 % in the mature grain.

In the case of the pectic polysaccharides the endosperm of the youngest growth stage contained ~20 % of its weight as pectic polymers, which dropped dramatically in the mature grain (~4 %). This is to be expected, as the earliest formed layer during the period of rapid growth and cell division is the cell plate, which is rich in pectic polymers.

In summary during growth and development of the coffee bean cell wall there is a progressive change in both the relative content of the different polysaccharide types and their structural features. At the earliest stages of growth, cellulose and arabinogalactan appear to be the primary products of cell wall synthesis with the former the predominant polysaccharide (Fischer et al., 1999). During the middle stages of growth, cellulose synthesis appears to cease and there is a progressive increase in mannan synthesis relative to the other wall polysaccharides as the grain approaches maturity. The close stereochemistry of cellulose and mannan prompts the speculation that perhaps the same catalytic membranes, which lead to cellulose synthesis, are also involved in mannan synthesis later in the growth of the endosperm with the additional intervention of an enzyme capable of interconverting GDP-mannose and GDP-glucose such as GDP-mannose-2-epimerase.

Table 1. Monosaccharide composition of alcohol-insoluble residue from coffee bean endosperm at several stages of development

| WAF | Monosaccharide composition (mole %) | | | | | | | |
|-----|-------------------------------------|------|-----|------|------|------|------|------|
| | Rha | Ara | Xyl | Man | Gal | Glc | GlcA | GalA |
| 11 | 3.7 | 18.9 | 1.9 | 9.3 | 23.9 | 21.7 | 6.6 | 14.0 |
| 15 | 3.7 | 17.5 | 3.0 | 13.4 | 25.7 | 20.8 | 4.7 | 11.0 |
| 21 | 1.7 | 14.7 | 0.5 | 19.6 | 33.1 | 21.7 | 3.3 | 5.3 |
| 26 | 0.5 | 10.1 | 0.4 | 37.0 | 27.7 | 18.2 | 2.4 | 3.6 |
| 31 | 0.5 | 8.9 | 1.1 | 45.4 | 23.0 | 15.9 | 2.1 | 3.2 |
| 37 | 0.6 | 9.1 | 1.0 | 45.6 | 23.2 | 15.7 | 1.9 | 3.1 |

(Redgwell et al., 2003)

Molecular and biochemical characterisation of polysaccharide modifying enzymes

Once the function and expression of the enzymes responsible for the biosynthesis and breakdown of coffee polysaccharides is understood, targeted manipulation of the morphological properties of the bean becomes a realistic proposition. To date there has been little published data on the biochemical or molecular characterisation of the endogenous enzymes governing polysaccharide metabolism in the coffee bean. Those that have been targeted include endo- β -mannanase and α -galactosidase, two enzymes which mediate changes to the galactomannans. Biochemical studies involving endogenous enzymes of coffee, which specifically promote metabolic changes to the arabinogalactans, have not been reported.

The galactomannans play a dominant role in the physicochemical properties of the coffee grain, a major factor influencing industrial extractability. The two major enzymes concerned with modification of the galactomannans are α -galactosidase and β -(1 \rightarrow 4) endo-mannanase. Both have been fairly well characterised in relation to their biochemical and molecular properties. Zhu and Goldstein (1994) reported the cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean α -galactosidase and demonstrated that the enzyme had a preference for α -1,3- and 1,4-glycosidic linkages. If, as the results of Redgwell et al. (2003) suggested, α -galactosidase is involved in the determination of the final galactose content of coffee endosperm galactomannans, then potentially, coffee plants transformed by down regulation of the α -galactosidase gene could contain galactomannans with a higher degree of substitution than the wild type. The opposite effect has already been demonstrated by Joersbo et al. (2001), who cloned and transformed the α -galactosidase gene expressed in immature senna seeds into a species of guar (*Cyamopsis tetragonoloba*). Approximately 30% of the guar transformants produced endosperm with galactomannans where the galactose content was significantly reduced.

Until recently reports on endo- β -mannanase activity in coffee grains were limited to two studies. Dirk et al., (1995) reported multiple isozymes of the enzyme in dry and imbibed seeds while Giorgini and Comoli (1996) measured the effect of growth regulators on the activity of the enzyme during germination. The first molecular characterisation was reported by Marraccini et al. (2001) who cloned and sequenced two endo- β -mannanase cDNAs (man A and man B) from germinating coffee grains (*Coffea arabica* L.). Northern hybridizations with man A- and man B-specific

probes showed that mRNA transcripts for both cDNAs were present during the same periods of bean germination, with expression peaking 20 days after imbibition of water. Activity and mRNA levels appeared to be tightly coordinated and unlike the reports of Dirk et al. (1995) they stated that enzyme activity did not exist in grains prior to germination. Thus, transcripts of the enzyme were not detected during grain maturation or in other tissues of the plant (roots, leaves, stems, flowers). The enzyme showed no activity with mannotriose or mannobiose and required oligomers with at least 5 or more units for maximum efficiency.

Despite the obvious potential to manipulate the physicochemical properties of coffee beans by using transformation technology, which can change the polysaccharide structure of the grain cell wall, it is unlikely that the approach will yield any significant benefits to the coffee industry in the short to medium term. Primarily this is because the relationship between genetically induced changes and the biochemistry, physiology and quality traits of the coffee bean is far from being elucidated. In addition, since the FLAV SAVR tomato became the first genetically engineered whole fruit to become commercially available, the application of biotechnology in agriculture has been intensively discussed, and consumer polls, particularly in Europe, have shown a general ambivalence and some hostility in attitudes (Schibeci et al., 1997).

Chemistry of the polysaccharides

Advances in our knowledge of the chemistry of coffee bean polysaccharides during the last 5 years has focused primarily on elaborating the detailed structural features of the arabinogalactans and the (galacto)-mannans. Some additional information has also been revealed on the structural features of the pectic and hemicellulosic polysaccharides. The availability of a range of immunological probes, which are specific for certain epitopes of the polysaccharides has permitted localisation studies to reveal additional information on the architecture of the coffee bean cell wall. To date there has been no published work on the characteristics of coffee cellulose.

Arabinogalactans: Several structural studies have revealed that the type II arabinogalactans in the coffee bean consist for the most part of a backbone of β -(1 \rightarrow 3)-linked galactosyl residues, substituted at intervals in the 0-6 position with various combinations of arabinosyl and galactosyl residues (Bradbury, 2001). Redgwell et al., (2002a) reported two important additional pieces of structural information. Firstly,

that the polysaccharides carried a negative charge due to the presence of up to 10 % of their structure as glucuronosyl residues which occurred as non-reducing terminal units on a 1→6 linked galactosyl side chain. Secondly, all or some of the arabinogalactans are in fact arabinogalactan-proteins (AGPs). The existence of a covalent link between the arabinogalactan moiety and protein was premised on the continued association of carbohydrate and protein during purification, the positive reaction to the β-glucosyl-Yariv reagent and the amino acid composition of the protein moiety which was hydroxy-proline rich, a characteristic of many reported AGPs (Clarke et al., 1979). The protein content of three different AGP fractions isolated from Arabica Yellow Caturra was 0.4, 1.1 and 1.9 %. The AGPs were shown to exist in several varieties of both Arabica and Robusta coffee beans.

Previous studies characterised coffee arabinogalactans, which represented only fractions of the total cell wall polymer. This can be attributed to the fact that the arabinogalactans are not readily extractable from green beans despite the fact that they and AGPs in general are extremely water-soluble. Bradbury and Halliday (1990) used 20 % NaOH at 100°C to extract arabinogalactan from green beans and reported that 45 % remained in the insoluble fraction. Fischer et al. (2001a,b) used a sequence of extractants, which included 8M KOH and NaClO₂ with similar results. Oosterveld et al., (2003) used water, EDTA and 4 M NaOH and released less than 10 % of the polysaccharides. Bradbury (2001) speculated that the insolubility of coffee arabinogalactan was evidence that it was covalently linked to a less soluble component of the cell wall (e.g. cellulose or mannan). However, a second

possibility is that the compact structure of the coffee cell wall, which is made up mostly of the insoluble polymers cellulose and mannan, entraps much of the AGP within its structure, rendering it effectively insoluble. Evidence to support this idea was provided by Redgwell et al. (2002a) who were able to solubilise almost all the AGPs in green beans by treating the insoluble residue remaining after 8 M KOH treatment with a mixture of cellulase and mannanase enzymes. The 8 M KOH treatment was necessary to render the mannan/cellulose polymers more susceptible to the enzymes and probably did this by causing the cellulose/mannan fibrils to swell, making them more accessible substrates.

Redgwell et al. (2002a) reported that the AGPs existed as an extremely heterogeneous mixture containing between 6-10 % glucuronic acid and possessing a Mw average of ~650 kDa. The heterogeneity related particularly to their degree of branching and monosaccharide composition of their side chains. Five different AGP fractions were isolated with Gal/Ara ratios which varied markedly. For Arabica Caturra, Catimor and Sarchimor the Gal/Ara ratios ranged from 0.9 to 3.1, 1.5 to 3.2 and 1.2 to 3.0, respectively. For Robusta Indes, Conillon and Ivoire the values were 0.9 to 3.1, 1.1 to 3.0 and 0.9 to 3.1, respectively. The putative structural features of the major arabinogalactan fraction which was liberated only following enzyme treatment of the insoluble residue of CWM isolated from Arabica Yellow Caturra, is given in figure 1.

The wide heterogeneity of coffee arabinogalactans supported the earlier findings of Fischer et al. (2001a,b) which reported that Robusta contained a highly soluble arabinogalactan which possessed more branch points and more

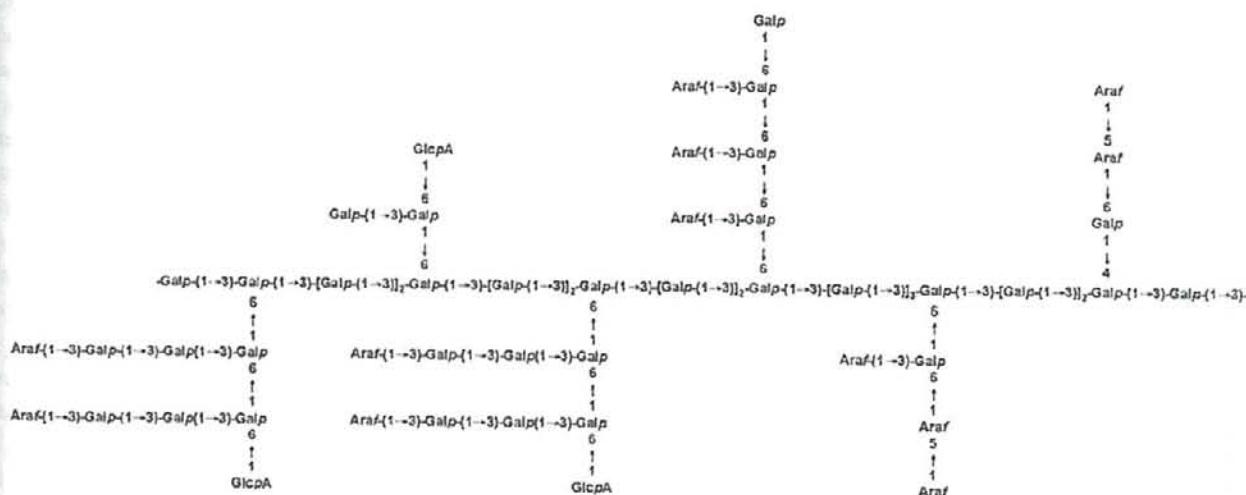


Figure 1. Possible structure of arabinogalactan moiety of coffee AGP (Redgwell et al., 2002a).

extended side chains than those found in Arabica and argued that this may be the reason why the arabinogalactans from Robusta are more easily solubilised than those of Arabica.

Galactomannans: The galactomannans are the predominant components in the coffee bean cell wall accounting for 50 % of the polysaccharides. Recent research has provided information on the degree of galactosylation of the mannans, the presence and distribution of other substituents (e.g. acetyl groups), the possibility that other sugar residues exist in the primary structure of the molecule (e.g. arabinose and glucose) and the location of the mannans in the endosperm of the cell wall.

Coffee bean mannan consists for the most part of linear chains of β 1 \rightarrow 4-mannosyl residues with single galactose units α -linked at C-6 of a mannosyl residue. The literature reports wide-ranging degrees of substitution from 47:1 (Wolfrom and Patin, 1961), 130:1 (Bradbury and Halliday, 1990), 30:1 (Fischer et al., 2001a), 1:7 and 1:40 (Redgwell et al., 2003) and 3:1 and 9:1 (Oosterveld et al., 2004). It is likely that the mannan molecules in coffee consist of a heterogeneous mixture of substituted and unsubstituted polymers but definitive data on the exact nature of this mixture is not available. One of the reasons for this is that most of the linkage analyses for coffee mannans have been done only on fractions of the total wall mannan, usually those which can be solubilised by various forms of solvent extraction. Invariably they consist of the more galactosylated galactomannan fractions which are more readily soluble than the less substituted molecules which remain in the insoluble residue. This is confirmed by the study of Redgwell et al., (2003) where almost all the mannan was solubilised from mature grains by a combination of chemical and enzymatic treatments. The chemically solubilised polymers (8 M KOH) possessed Man/Gal ratios of 7:1. The 8 M KOH-insoluble residue was solubilised by enzymic hydrolysis with a mixture of cellulase and mannanase. The arabinogalactan which was solubilised at the same time was easily removed by dialysis allowing the Man/Gal ratio (40:1) of the galactomannan fragments derived from the insoluble residue to be determined.

A pure mannan is able to form a hard insoluble structure much like cellulose because of interchain hydrogen bonding. One of the principal effects of galactose substitution is to disrupt the interchain hydrogen bonding and this can lead to increased solubility. However, galactose is not the only substituent, which could induce such an effect. The presence

of other moieties (e.g. acetyl groups) could also disrupt interchain hydrogen bonding and may be an explanation for why some galactomannans with an apparently low degree of galactose substitution are relatively soluble. Oosterveld et al. (2004) reported that galactomannans extracted from green Arabica coffee beans were acetylated. In this study the galactomannans were extracted in water at 90°C for 1 h. The galactomannans were separated into two neutral fractions by anion-exchange chromatography which suggested that other mechanisms such as molecular weight must also have played a part in the separation. One neutral fraction of average molecular weight of 2000 kDa possessed both a high degree of galactosylation (30 %) and acetylation (9 % of the mannose groups were acetylated). The second neutral fraction had a molecular weight average of 20 kDa and the degree of galactosylation and acetylation was much lower (11 % and 4 % respectively). The results of Oosterveld et al. have been reinforced in a study by Nunes et al. (2005) who reported that the galactomannans in hot water infusions of green coffee beans are acetylated at a level of 11 mole %. They provided evidence that the acetyl groups were attached to the O-2 and O-3 positions (sometimes both) on the mannose residue. Contiguously acetylated mannosyl residues were also found.

Another possibility for disrupting interchain hydrogen bonding would be the interruption of the mannan backbone with glucose residues and/or the substitution of the mannan backbone with sugar residues other than galactose. Navarini et al., (1999) reported the possibility that the galactomannans were substituted with arabinose. These structural features were looked for, but not found, in the Oosterveld et al. study (2004). However, the Nunes et al. report (2005) provided evidence that terminally linked arabinosyl residues (2 mole %) were attached at O-6 of the mannose residues. In addition, they stated that β -(1 \rightarrow 4)-linked glucosyl residues (6 mole %) were present in the mannan backbone and concluded that green coffee mannans extracted with hot water contained acetylated arabinogalactoglucomannans.

Cytochemical and immunolabelling of cell wall polysaccharides

Chemical analysis has revealed an increasingly sophisticated picture of the coffee cell wall polymers. Just how these different types of polysaccharide and different structural forms of the same type of polysaccharide, contribute to the architecture of the wall has until recently been largely unknown. Sutherland et al. (2004) used a range of cytochemical and immunological probes to reveal the spatial arrangement

of the arabinogalactan-proteins, galactomannans and pectic polysaccharides in the cell wall of the endosperm of green coffee beans (*Coffea arabica* L. Yellow Caturra).

Arabinogalactan-proteins: AGPs were localised by labelling with the AGP-specific β -glucosyl Yariv reagent and the monoclonal antibody LM2 (Sutherland et al., 2004) which recognises a carbohydrate epitope containing glucuronic acid. Glucuronic acid has been shown to occupy terminal positions on some of the side chains of coffee AGPs (Redgwell et al., 2002a). Both forms of labelling showed a widespread distribution of the AGP across the cell wall. However, there was more intense staining with the Yariv reagent in the region adjacent to the cell lumen. The labelling pattern for LM6, a monoclonal specific for several contiguous arabinosyl residues, was quite different to that of LM2. Whereas LM2 labelled across the whole wall, LM6 was found in two specific locations (figure 2). LM6 gave intense labelling of the epidermal cells across the whole width of the cell wall indicating that these cells were enriched in 1,5- α -arabinan compared to the endosperm cells. The second location was in a compact band adjacent to the cell wall lumen of the endosperm cells. No label was found in the main body of the cell wall. This indicated the existence of a different structural form of arabinan polymer in the region adjacent to the cell wall lumen, which was absent in the rest of the cell wall. Since the Yariv reagent also showed increased staining in this location one explanation could be that the AGPs in this region have more 1,5- α -arabinosyl residues incorporated into their side chains. However, all antibody data must be interpreted with caution, as there is a possibility that the antibody LM6 is reacting with similar epitopes on completely unrelated molecules (e.g. rhamnogalacturonans and AGPs). An alternative explanation is that LM6 was labelling a rhamnogalacturonan type molecule which carried side chains of 1,5- α -arabinosyl residues. The presence of rhamnogalacturonans in coffee bean cell walls which contain moderate amounts of 1,5- α -arabinosyl residues has been demonstrated (Redgwell et al., 2002a). The argument for the arabinosyl residues being structural features of some pectic polysaccharides is supported by the fact that LM6 does not cross react with the AGP in gum acacia. On the other hand chemical analysis of the coffee bean does indicate the presence of a mixture of AGPs which are polydisperse with regard to their 1,5-arabinosyl residue content. In addition, the inhibition of LM6 labelling by similar concentrations of pure 1,5 arabinan and a pectin-depleted AGP fraction from coffee, suggested that coffee AGPs do cross-react with LM6.

Mannans: When mannans were labelled with the β -1,4-mannan-specific monoclonal antibody BGM C6, the antibody labelled across the entire wall. However, there was a variation in intensity of the labelling across the wall with more intense staining adjacent to the lumen of the cell and the middle lamella. These two zones were separated by a region of only moderately intense staining (Sutherland et al., 2004). Evidence that galactomannans with different degrees of galactosylation were located at different sites in the wall was provided by the use of BS-1 lectin, which is specific for

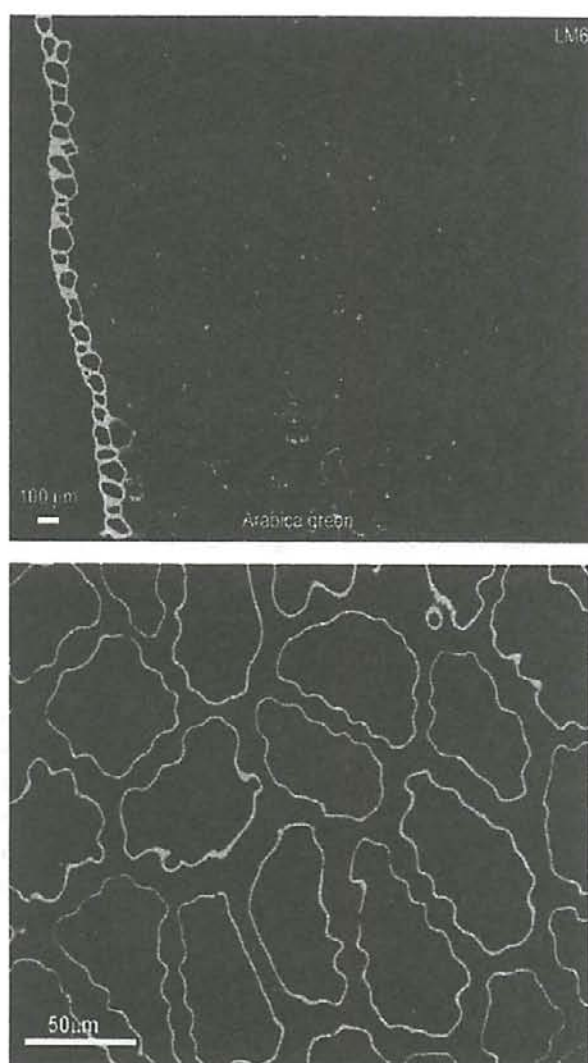


Figure 2. Localisation of 5-linked arabinan with monoclonal antibody LM6 (Sutherland et al., 2004. Upper: Low magnification showing intense labelling of epidermal layer. Lower: High magnification showing labelling of layer adjacent to the cell lumen.

terminal α -galactose (Hayes and Goldstein, 1974). In contrast to the BGM C6 monoclonal antibody, the lectin did not uniformly label the cell walls. The lectin appeared to be concentrated in a compact band adjacent to the cell wall lumen in the single layer of epidermal cells and in the inner zone of the endosperm cells. The lectin did not label across the whole wall as the BGM C6 did. Assuming that all the α -galactose is associated with galactomannans and that the intensity of staining is related to the frequency of galactose substitution of the mannan backbone, the result suggested that structural forms of galactomannan with different degrees of substitution are differentially located in the wall.

Pectic polysaccharides: Location of the pectic polysaccharides was determined by the use of the monoclonal antibodies JIM 5 and JIM 7 which are specific for homogalacturonan type pectic polysaccharides. The monoclonal antibody JIM 7 only labelled the middle lamella area of the endosperm. JIM 5 did not bind to any sites within the wall. Differences in the degree of esterification do not significantly effect JIM 7 binding over the range from 15 to 80 %, whereas JIM 5 binding increases markedly by esterification levels up to 40 % (Willats et al., 2000).

Roast coffee

The roasting process is of central importance, both for flavour development and for the subsequent extractability of the coffee bean for the production of soluble coffee. The relevance of these two areas to the coffee in industry has encouraged continued research into understanding the relationship between roasting and changes to the sugars and cell wall polysaccharides in the coffee bean which accompany the roasting process (Clarke and Vitzthum, 2001).

It has been well documented that low molecular weight sugars are almost totally degraded and minimal amounts remain in the beans after roasting. By contrast the structural features of the cell wall polysaccharides, although modified in some cases, remain largely intact in others, although a significant amount of degradation does take place (Clarke and Vitzthum, 2001). Studies during the last 5 years have focused on providing more details on the nature of roasting induced changes to the polysaccharides and the extent of their degradation at different roasting times. These studies can be separated into two categories. Those which looked at the polysaccharide profile in water soluble extracts of roasted beans and those which attempt to characterise the

effect of roasting on the total polysaccharide content of the coffee cell wall. In addition, the roasting induced changes to the structure of the cell wall and the distribution of the polysaccharides within it, have been studied at the cellular level by microscopic methods and immunolabelling.

Nunes and Coimbra (2001, 2002a,b) made a series of reports which described the chemical characterisation of the high molecular weight material extracted with hot water infusions from green and roasted coffee. They reported the degree of polymerisation and the degree of branching of the galactomannans decreased with the increase of degree of roasting. The amounts of terminally linked arabinosyl residues of the arabinogalactans decreased during roasting as did the average molecular weight of the polymers.

Redgwell et al. (2002b) and Oosterveld et al. (2003) reported studies on the changes to the total cell wall polysaccharide content of Arabica beans during roasting. Redgwell et al. (2002b) reported that up to 40 % of the polysaccharides were degraded after a long roast and these results were confirmed by Oosterveld et al. (2003). Based on linkage data the latter reported a decrease in molecular weight of the galactomannans during roasting. At the same time they stated that extracts from roasted coffee contained galactomannans with a greater molecular size than in green bean extracts. This was attributed to the possibility that the roasting process allowed the solubilisation of galactomannans with a higher molecular weight. This idea would support the findings of Redgwell et al., (2002b) which reported no change in the molecular weight of galactomannans extracted by 8M KOH from green and roasted beans.

Coffee arabinogalactans are known to be the most susceptible of the polysaccharides to degradation during roasting, particularly the more heat labile arabinofuranosyl residues. The polymers are depolymerised showing a sharp decrease in molecular weight after a light roast which represented at least a 10-fold reduction in molecular weight (Redgwell et al., 2002b). Although longer roasting continued to degrade the polymer, the extent of further structural modification was only moderate compared to that which followed the initial roast (Redgwell et al. 2002b). The magnitude of the molecular weight decrease was more than could be predicted from the loss of arabinosyl residues from the side chains and must therefore have resulted from fission of the galactan backbone. Oosterveld et al. (2003) reported that the debranching of the arabinose sidechains occurred more rapidly than hydrolysis of the galactan backbone

The carbohydrate-protein link of the AGP appeared to remain intact to some degree. Even after a dark roast AGP purified from the roasted beans still gave a clear positive result for the Yariv test (Redgwell et al., 2002b).

The fate of the AGPs during roasting was also followed by immunolabelling using the monoclonal antibody LM6 which is specific for contiguous 5-linked arabinosyl residues. Both Arabica and Robusta beans showed a pattern of label reduction for LM6 even after the lightest roasting. At a medium roast only the epidermal layer labelled. At the lighter roasts it was apparent that the labelling for 1,5-arabinan first decreased in the inner regions of the cell wall and near the mucilage cells (Redgwell et al., 2004). Why the 1,5-arabinan should be more rapidly degraded in the inner cells of the wall during roasting when obviously the surface of the bean suffers a much more rapid rise in temperature is not clear. One possibility is that there is more trapped free water in the internal structure which as it heats becomes a more effective agent for hydrolysing the arabinan side chains.

Undoubtedly the degradation of the cell wall polysaccharides plays a key role in the increased solubilisation of coffee polysaccharides. This degradation takes two forms. Hydrolysis of the polysaccharide backbones resulting in a significant decrease in their molecular weight and removal of sidechain sugars which results in a linearisation of the polymers. As a consequence the degree of entanglement between the AGPs, galactomannans and the mannan/cellulose matrix is not as marked allowing their easier solubilisation by aqueous extraction. However, roasting conditions also have a major impact on the structural properties of the bean at the multicellular level. Schenker et al. (2000) used volumetry, mercury porosimetry and electron microscopy to study structural product properties. Following roasting, the beans showed greater bean volume, and larger micropores in the cell walls compared to green or low temperature roasted coffees. Thus, there is an increased accessibility of the cell wall polymers to any extractant which favours greater solubilisation of polysaccharides.

Conclusion

The last five years have seen steady progress in understanding the complex chemistry of the coffee bean cell wall. The discoveries that the arabinogalactans are AGPs and that the galactomannans may in some instances contain sugar residues other than galactose and mannose are major advances in the continuing effort to define the structural features of coffee carbohydrates. However, most

of this work has focused solely on the polysaccharides in isolation. More work needs to be done to reveal the complex array of interactions between the carbohydrate fraction of the coffee bean and other molecules (proteins, melanoidins) which take place during the roasting process and just what role these interactions play in both flavour development and extractability of the bean. On the physiology side there is a dramatic lack of knowledge on the metabolism of coffee carbohydrates both in the immediate pre-harvest and post harvest stages. The carbohydrate status of the bean at these phases of development may play an important role in the final coffee beverage quality. Before the roasting stage the coffee bean is a living, dynamic structure. If the carbohydrate status of the green bean is a contributing factor to coffee quality then the degree to which postharvest treatments mediate this status becomes an important area for further study.

REFERENCES

- Bradbury AGW, Halliday DJ (1990) Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 38:389-92.
- Bradbury AGW (2001) Carbohydrates. In: Clarke RJ, Vitzthum OG (eds), *Coffee Recent Developments*, pp.1-17. Blackwell Science, Oxford.
- Clarke AE, Anderson RL, Stone BA (1979) Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry* 18:521-540.
- Clarke RJ, Vitzthum OG (2001) *Coffee, Recent Developments*. Blackwell Science, Oxford.
- Clifford MN (1985) Chemical and Physical Aspects of Green Coffee and Coffee Products. In: Clifford MN, Willson KC (eds), *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*, pp305-374. The AVI Publishing Company Inc., London, Sydney.
- Dirk LMA, Griffen AM, Downie B, Bewley JD (1995) Multiple isozymes of endo- β -mannanase in dry and imbibed seeds. *Phytochemistry* 40:1045-1056.
- Fischer M, Reimann S, Trovato V, Redgwell RJ (1999) Structural aspects of polysaccharides from Arabica Coffee. In: *Proceed. 18th ASIC Colloquium, Helsinki*, pp.91-94.
- Fischer M, Reimann S, Trovato V, Redgwell RJ (2001a) Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydr. Res.* 330:93-101.
- Fischer M, Redgwell RJ, Reimann S, Trovato V (2001b) Polysaccharides Composition in Arabica and Robusta green coffee beans : Similar but different? In: *Proceed. 19th ASIC Colloquium, Trieste*.
- Geromel C, Ferreira LP, Cavalari AA, Pereira LFP, Vieira LGE, Leroy T, Mazzafera P, Marraccini P (2004) Sugar metabolism during coffee fruit development. In: *Proceed. 20th ASIC Colloquium, Bangalore*.

- Giorgini JF, Comoli E (1996) Effect of embryo and exogenous GA₃ on endospermic endo-β-mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8:43-49.
- Hayes CE, Goldstein IJ (1974) An α-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J. Biol. Chem.* 249:1904-1914
- Joersbo M, Marcussen J, Brunstedt J (2001) In vivo modification of the cell wall polysaccharide galactomannan of guar transformed with a α-galactosidase gene cloned from senna. *Mol. Breed.* 7:211-19.
- Marracini P, Rogers WJ; Allard C; Andre ML; Caillet V; Lacoste N; Lausanne F; Michaux F (2001) Molecular and biochemical characterization of endo-β-mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213: 296-308.
- Mazzafera P, Purcino RP (2004) Post harvest processing methods and physiological alterations in the Coffee fruit. In: *Proceed. 20th ASIC Colloquium, Bangalore.*
- Navarini L, Gilli R, Gombac V, Abatangelo A, Bosco M, Toffanin R (1999) Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. *Carbohydr. Polym.* 40:71-81.
- Nunes FM, Coimbra MA (2001) Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted Arabica coffee. *J. Agric. Food Chem.* 49:1773-1782.
- Nunes FM, Coimbra MA (2002a) Chemical characterization of the high-molecular-weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffees as affected by the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.* 50:7046-7052.
- Nunes FM, Coimbra MA (2002b) Chemical characterization of galactomannans and arabinogalactans from two coffee infusions as affected by the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.* 50:1429-1434.
- Nunes FM, Domingues MR, Coimbra MA (2005) Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. *Carbohydr. Res.* 340:1689-1698.
- Oosterveld A, Coenen GJ, Vermeulen NCB, Voragen AGJ, Schols HA (2004) Structural features of acetylated galactomannans from green *Coffea arabica* beans. *Carbohydr. Polym.* 58:427-434.
- Oosterveld A, Harmsen JS, Voragen AGJ, Schols HA (2003) Extraction and characterisation of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. *Carbohydr. Polym.* 52:285-296.
- Redgwell RJ, Curti D, Fischer M, Nicolas P, Fay LB (2002a) Coffee bean arabinogalactans: Acidic polymers covalently linked to protein. *Carbohydr. Res.* 337:239-253.
- Redgwell RJ, Trovato V, Curti D, Fischer M (2002b) Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydr. Res.* 337:421-431.
- Redgwell RJ, Curti D, Rogers J, Nicolas P, Fischer M (2003) Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. *Planta* 217:316-326.
- Redgwell RJ, Fischer M, Curti D, Sutherland P, Hallett I, Macrae E (2004) Galactomannans and arabinogalactan-proteins in the Coffee bean cell-wall: Heterogeneity and localisation. In: *Proceed. 20th ASIC Colloquium, Bangalore*
- Rogers WJ, Michaux S, Bastin M, Bucheli P (1999) Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Sci.* 149:115-123.
- Schenker S, Handschin S, Frey B, Perren R, Escher F (2000) Pore structure of coffee beans affected by roasting conditions. *Journal of Food Science* 65:452-457.
- Schibeci R, Barns I, Kennealy S, Davison A (1997) Public attitudes to gene technology: the case of the MacGregor's tomato. *Public Understanding of Science* 6:167-183.
- Sutherland PW, Hallett IC, MacRae E, Fischer M, Redgwell RJ (2004) Cytochemical and immunolocalisation of cell wall structures and polysaccharides in the endosperm of green Arabica coffee beans. *Protoplasma* 223:203-211.
- Willats WGT, Knox JP, Limberg G, Christensen TMIE, Mikkelsen JD, Buchholt HC, Van Alebeek GJ, Voragen A, Benen J, Visser J (2000) Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* 327:309-320.
- Wolfrom ML, Laver ML, Patin DL (1961) Carbohydrates of the coffee bean. II. Isolation and characterization of a mannan. *J. Org. Chem.* 26:4533-4535.
- Zhu, Goldstein IJ (1994) Cloning and functional expression of a cDNA encoding coffee bean alpha-galactosidase. *Gene* 140:227-231.

この研究は、最近進展した、細胞壁多糖類に焦点を合わせたコーヒー炭水化物の化学、生理学、分子的な特性を要約する。詳細な化学研究の結果は、コーヒーの生豆と焙煎豆に含まれるガラクトマンナンとアラビノガラクトタン多糖の両方の新しい構造特徴を証明した。初めて、免疫調査に基づいた特定の多糖類エピトープのモノクローナル抗体を用いて、コーヒー豆の細胞壁中のペクチン多糖、ガラクトマンナン、アラビノガラクタンの配分パターンが明らかにされた。最後に、生理学的な分子の研究結果は、生豆の物質代謝の状態がコーヒー飲料の質を認識させ、強調していると提出された。

1. 導入

コーヒー豆中の炭水化物の重要性は、コーヒー豆中の高濃度ばかりではなく、錯体変化も考えられ、コーヒー飲料の味覚の刺激は焙煎加工の間にその物質が作られる。この研究によって、5年間でコーヒー炭水化物の論文に集中するだろう。以前、コーヒー炭水化物の大変優れた要約が、"Coffee Recent developments" (Bradbury, 2001) の本に提出された。これは、アラビカ種やロブスタ種の色々な生豆又は焙煎コーヒー豆中の低分子の糖が詳しく述べられているが、この研究は繰り返し載せていない。この数年間の関心は、コーヒーの生豆の発達とコーヒーの質を扱い、生理学、生化学にて育まれてきた。これは、コーヒーの発展間の sink-source に関するコーヒー中の知られている糖の物質代謝に関する研究も含まれている。しかし、生理学側からのコーヒー炭水化物について大きく発表はされていない。これらも現在の研究に繋がるが、コーヒー豆の細胞壁多糖類に多くの焦点を当てる必要がある。そこで、知られている胚乳内の化学、生理学、配列の重要性が促進するよう、5年間で行っていきたい。

2. 成長している粒の炭水化物の状態

(1) 遊離糖

コーヒーの研究では、コーヒー1粒に含まれる数種類の成分は、コーヒー飲料の味と香りの可能性があるとして考えられてきた。注目している低分子量の糖であろうと、多糖類であろうと、いくつかの研究の大部分はアラビカ種とロブスタ種のコーヒーの熟した1粒でのこととされてきた。それらは、成長、発展、豆の加工段階のポスト・ハーベスト（収穫後の農業処理）での1粒の炭水化物の発展情報が不足している。それらの段階で、生豆の物質代謝の状態は、熟した生豆とこの物質代謝状態の調整が、コーヒー豆に質を与える要因となる影響力は、最後の化学構成で影響するだろう。

Rogersらは、アラビカ種とロブスタ種から成長している1粒中の糖アルコールが、糖の

項目を変える研究を導いた (1999)。その粒のアラビカ種は、開花期後の 12~30 週、ロブスタ種は、18~40 週後に収穫された。成長の早い段階、熟成の半分の段階で、グルコースとフルクトースは、フルクトースの濃縮で 2 回絶えずグルコースと大部分の遊離糖となっている。グルコース量は、アラビカ種 (8~12% 乾量) の方がロブスタ種 (2~4% 乾量) よりも高い。グルコースとフルクトースの粒の濃度は、成長終期にはそれぞれ 0.03%、0.04% に減少したが、乾量 5~12% のスクロースは、基本的に熟した粒中の全遊離糖で 100% だった。

アラビカ種の多くの詳細な分析結果は、胚乳由来の外乳組織が分解した為、それぞれの高純度の遊離糖が分析された。成長の早い段階でより高濃度のグルコースとフルクトースは、毎回外乳組織と結びつけていた。胚乳でも、成熟の早期段階でスクロースは主要な糖だった。

この著者らは、外乳におけるスクロースの異化作用が、組織による浸透圧の増加と、初期膨張での小スペースの減少の両者を可能にする必要条件と一致していると、推測した。

糖アルコール (マンニトール) とオリゴサッカロイド (ラフィノース、スタチノース) の分析結果は、どれも粒の発達中のそれらの結合が物質代謝の基本的な変化である事が認められ、示せない。

他の最近の研究は (Geromel et al., 2004)、スクロース・シンターゼ (Susy EC2.4.1.13) の分子評価とコーヒー豆の発達間の転化を行っていた。この課題の目標は、豆発達間の低下の原因に関係する、コーヒー中の知られている糖物質代謝だ。この終わりは、糖濃度と果肉中の 2 の酵素の活性、アラビカ種の成長段階での胚乳と外乳を評価した。Susy は、転化作用よりも活性化し、スクロースの減少よりも合成を行っている。これは、転化を取り巻く遺伝子の発現がない事が、分析したいくつかの組織により観察された事実によって、サポートされている。Susy の活性は、その組織が豆の大きさを支配し、生豆中の糖を集める役割をしている事が示唆され、外乳発達の最終段階に達した。分子レベル 2 の cDNAs は、符号化している (コーヒー果実におけるそれら空間の表現は異なる) Susy 異性体は、複製された。

コーヒー品質に関連するとき、ポスト・ハーベスト処理法中の種子物質代謝の重要性は、Mazzafera と Purcino によって強調された (2004)。彼らは、コーヒー豆の収穫後の生理学に注意を向け、含んでいる炭水化物 (ポストハーベスト処理法によって性質に影響を及ぼしているだろう)、物質代謝のいくつかのグループ変化を説明した。最終飲料の品質の程度は、収穫したコーヒー豆の物質代謝により影響を及ぼされたと、まだ決定は出来ない。しかし、これはコーヒー研究に対しより多くの注意が必要な領域が残っている。

(2) 多糖類

多糖類は、生豆の乾重量の 50% までを占め、大きく分類するとマンナン又はガラクトマンナン、アラビノガラクタン-プロテイン (AGPs)、セルロースの 3 から構成される。加え

て、少量のペクチン質多糖類 (Redgwell et al., 2002a) と、近年になってキシログリカンもまた発表された (Oosterveld et al., 2003)。

(3) ガラクトマンナン

コーヒー豆が成長間の遊離糖による生合成上にかすかな情報があるならば、細胞壁多糖類による生合成上に情報は無い。それにも関わらず、分子技術の出現により、現在コーヒー細胞壁重合体の生合成方法に関心が高められた。これは特に、粉末化した市販のコーヒーエキスの可溶化の割合の要因となる、溶解性とガラクトマンナンの特に適切な関係を示す。セルロースは別として、可溶化のほとんどの妨害重合体は、ガラクトマンナンである。溶解性ガラクトマンナンの主な決定因子の1つは、ガラクトース残基を含んだマンナン骨格の置換頻度である。仮説では、マンナンのガラクトシル化の割合が増えると、ガラクトマンナン溶解度合も増えると考えられている。

ガラクトマンナンの最終的な構造をうまく処理する為に、それらの合成に影響している物質代謝を理解する必要がある。特に、ガラクトシル化の最終的な割合を決める重要段階は何か。いくつかの植物では、ガラクトシル化の最終的な割合が主要な合成生成物からのガラクトシル残基を切る α -ガラクトシダーゼの作用で決定する事が知られている。もし、そのようなメカニズムがコーヒー豆中で作用するならば、 α -ガラクトシダーゼ遺伝子の減少は、コーヒー豆のより高いガラクトース/マンノース比の結果が得られる。Fischerらは、開花の12, 17及び29週間後にコーヒー豆の細胞壁の単糖類の構成が決定し、ガラクトマンナンの発達は早く、高代理品よりも成熟期で得られると、報告した(1999)。より詳細な研究を行ったRedgwellらは、開花の11, 15, 21, 26, 31, および37週間後にコーヒー豆の胚乳に含まれるガラクトマンナンを特徴付け、単離した(2003)。最も早い段階でガラクトマンナンは成長すると、多糖類が10%まで含まれていることから証明されたが、ガラクトース/マンノース比が1:2, 1:7の間で高く代用された。成熟期のガラクトマンナンは全胚乳の多糖類の50%までが証明されている主な多糖類であるが、それらの代理の割合はガラクトース/マンノースの比が1:7と1:40の間となり減少した。ガラクトマンナンのガラクトース/マンノースの比が減少するのは、開花の21から26週間の間に始まり、遊離ガラクトースが増加した。最終ガラクトース/マンノースの比は、 α -ガラクトシダーゼによる初めの合成生成物からガラクトースが除去された結果の割合と結論された。

(4) 他の多糖

コーヒー豆細胞壁の他の多糖類は、少しだけ発達の変化に対する報告がなされている。いくつかの研究は、ガラクトマンナンの発達変化データが、発達している難段階の細胞壁材料の単糖構成物を発表されたと、報告した。アラビノガラクトタン、ラムノース、ガラクトロニック酸から主に得られているアラビノース、ガラクトースは、ペクチン質多糖類の構造上の結合で、粒の発達の間、それらは重合体として構造を決める傾向を持つと推定で

きた。早い成長段階のアラビノガラクトンのガラクトース/マンノースの比は、1.3:1 だが、これはだんだんと、粒が成長中に増え、成熟期には、2.6:1 までに達した。加えて、早期成長段階でアラビノガラクトンは、全多糖類の 50% までとなるが、粒が熟した時には、34% にまで減った。

若い成長段階の胚乳中のペクチン質多糖類の場合、ペクチン質重合体として重さが 20% まで含んでいた。

要約すると、コーヒー豆細胞壁は成長し、発達している間、新しい構造と難しい多糖類のタイプの相対的な含有量は、両者とも、進展的变化であった。GDP-マンノースと GDP-グルコースは GDP-マンノース-2-エピメラーゼとして、酵素能力を持っている。

3. 多糖を修飾する酵素の分子的、生化学的な特性

コーヒー多糖類の生合成と分解の要因となる酵素の発現と作用が理解出来た。コーヒー豆の特性を形態学的に操作する事が現実となるよう目標に定めた。

コーヒー豆の多糖類の物質代謝が抑制される内因性の酵素の生化学又は分子学の特徴のデータは、小規模で発表された。

それらはエンド-β マンナーゼと α-ガラクトシダーゼを含み(この 2 つの酵素はガラクトマンナンを変化させる)目標に定められてきた。

生化学の研究はコーヒーの内因性の酵素(アラビノガラクトンの物質代謝の変化を促進させるため)を必要としてきか、まだ報告はされていない。

ガラクトマンナンはコーヒー粒中の多糖類の特徴における優性な役割を持ち、産業上の抽出に大きな要因だ。

ガラクトマンナンの修飾と関係した二つの主要な酵素は、α-ガラクトシダーゼと β-(1-4)-エンド-マンナーゼだ。

両方とも、それらの分子・生化学上の特性はかなりよく関連していた。

クローンと cDNA の発現作用 コード化したコーヒー豆 α-ガラクトシダーゼと証明したと報告された。酵素は α-1,3-と、1,4-グルコシディック結合を優先的に持っていた。

α-グルコシダーゼはコーヒー胚乳中のガラクトマンナンの含有量は最終ガラクトースの測定に関与した。

そのとき、潜在的に、野生型よりも高い置換の程度のガラクトマンナンを含む α-ガラクトシダーゼ遺伝子の制御により、コーヒーは変成した。

反対の効果は以前に報告された。グワ種類中の未完熟なセンナ 種が発現した α-ガラクトシダーゼ伝子のクローン化と変成を。

おおよそ、グワ変成の 30% がガラクトマンナンと胚乳へと生成した。ガラクトースの内容物は著しく減少した。

最近の研究まではコーヒー粒中にエンド-β-マンナーゼ活性が二つの研究によって制御

された。

発芽中の酵素活性の制御要因が、乾いた酵素の多様なアイソザイムで、効果的に育っていることを測定したと報告した。

はじめの分子特性は報告された。クローン化し、発芽コーヒー粒由来の cDNA の連続した二つのエンド- β -マンナーゼ。

ノーザンプロット異種交配と manA, manB 特異的プロンプが両 cDNA からの転写 mRNA は、発芽豆の同期間に行われると提供された。

4. 多糖の化学

この 5 年間でコーヒー豆多糖類の化学は、アラビノガラクトタンとガラクトマンナンの詳細な構造の特徴を詳しく述べることに焦点を合わせてきた。

いくつかの追加情報は、ペクチンとヘミセルロースタンパク質の構造上の特徴も明らかにされてきた。

免疫学の調査範囲での有効性、特異的な多糖類エピトープは、コーヒー豆細胞壁の構造上明らかになった追加情報の局在化の研究を可能にした。

このコーヒーセルロースの特徴の研究は今まで公表されていなかった。

(1) アラビノガラクトタン

いくつかの構造の研究は、コーヒー豆の Type II アラビノガラクトタンは、ガラクトシル残基が β -1-3 結合した基盤のほとんどの部分から成り立ち、アラビノシルとガラクトシル残基の様々な組み合わせで 0-6 位置の感覚で置換した。

抽出

・アラビノガラクトタン抽出 → 生豆を 100°C の 20% NaOH で抽出。不溶性の部分に 45% 存在。

・連続した方法 → 上記同様。8M KOH と NaClO₂ で抽出

・水、EDTA、4M NaOH を使って、多糖類の少なくとも 10% を遊離。

・コーヒーアラビノガラクトタンは不溶性と推測。(セルロースとマンナンの不溶性重合体、その内部に AGPs を確保)

・立証；マンナーゼ酵素とセルラーゼを混ぜ、8M KOH 処理で不溶性残基が処理されたことにより、生豆のほとんど全ての AGPs は溶かすことが出来た。

8M KOH 処理は、より影響を与えるため、マンノース/セルロース重合体に酵素を加え、原繊維の膨潤により、利用しやすい気質を生成。

ロブスタ種は、高い可溶性アラビノガラクトタンから見つかったそれらよりも、所持していたことは、おそらくロブスタ種由来のアラビノガラクトタンは、これらのアラビカ種よりも早く可溶したと報告した。

(2) ガラクトマンナン

- ・ コーヒー細胞壁の多糖類が 50%となる原因。
- ・ コーヒー豆マンナンはほとんど β -1-4 マンノシル残基の直鎖部、C-6 マンノシル残基の単ガラクトースユニットの結合から成る。

生豆のマンナンは、熱水で、継続したアセチル化したアラビノガラクトグルコマンナン抽出できると結論付けた。

5. 細胞壁多糖類の細胞化学と免疫標識

化学的な分析はコーヒー細胞壁の重合体を徐々に詳細に明らかにしてきた。異なったタイプの多糖類が細胞壁の構造に貢献する事は最近まで知られていなかった。Sutherlandsらは、細胞化学と免疫学の範囲でこれらを研究し、生豆中の胚乳部細胞壁にあるアラビノガラクトタン・プロテイン、ガラクトマンナン、ペクチン質多糖類を明らかにした。

(1) アラビノガラクトタン・プロテイン

AGPs は、AGP-Specific- β -グルコシル・ヤリブ試薬とモノクローナル抗体 LM2 (炭水化物エピトープに含まれるグルクロン酸で認識する) の標識化をし、局在化された。グルクロン酸は、コーヒーAGPs のいくつかの側鎖末端位置を占めていることが示された。両種類の標識化は、細胞壁にわたり AGP の分布は広範囲に示された。しかしながら、細胞腔内に隣接する領域をヤリブ試薬は、強く染色した。LM6 (いくつかの隣接するアラビノシル残基に特異的なモノクローナル) の標識化パターンは、LM2 と完全に異なる。LM2 は壁の全体にわたり、標識化されたが、LM6 は 2 つの特有な部位が見つけた。LM6 は、細胞壁と、それらの細胞は胚乳細胞と比較して 1,5- α -アラビナンが豊富に示された全体にわたって、上皮細胞を強烈に標識化した。2 つ位置は、胚乳細胞と細胞内腔が隣接する密な結合だった。標識しないものからは、細胞壁の主な組織体を見つげられた。これは、細胞壁内腔の隣接する範囲内のアラビナン重合体からの異なった構造の存在があらわされた。細胞壁の残部分には存在しなかった。ヤリブ試薬以来、この部分の染色が増加した 1 つの説明として、この部位の AGPs は、より 1,5-アラビノシル残基を側鎖に組入れられるということもまた示した。しかしながら、全抗体のデータは、慎重に判断しなければならない。抗体 LM6 は、完全に無関係な分子 (ラムノガラクトタン AGPs) の同類エピトープと反応している可能性がある。LM6 は、ラムノガラクトロナムタイプの分子を、1,5- α -アラビノシル残基の側鎖を保有し標識化した。1,5- α -アラビノシル残基を含んだコーヒー豆細胞壁のラムノガラクトロナンの存在が、説明されてきた。いくつかのペクチン質多糖類の構造上の特徴となる、アラビノシル残基の根拠は、LM6 はアラビアゴム中の AGP と反応しないという事実によって報告された。コーヒー豆の他の化学分析で、AGPs (それらの 1,5-アラビノシル残基内容物に関して多分散) の混合物の存在を示した。加えて、同類の純 1,5-アラビナンとコーヒーからのペクチン質が枯渇した AGP 断片を濃縮したことにより、LM6 の標

識化の抑制し、コーヒーAGPsはLM6と反応するので提案した。

(2) マンナン

マンナンは、 β -1,4-マンナン-スペシフィックモノクローナル抗体 BGM C6 より標識化され、抗体は全体の壁を標識化した。しかし、細胞腔と中心のラメラ部に隣接すると、より強く染色し、壁の標識化も強くなることには差異がある。それら 2 つの地帯は、ただ適度な強い染色による範囲によって、分離された。証拠は、ガラクトシレイションの異なった地帯のガラクトマンナンが α -ガラクトース末端に特異的な BS-1 レクチンを用いた事によって、供給された細胞壁の異なった部位に位置づけられた。BGMc6 モノクローナル抗体と対照的に、レシチンは細胞壁を均一に標識化しない。レシチンは、胚乳細胞の内部と上皮細胞の単一層の細胞壁空孔と隣接する密な結合が濃縮し、存在した。レシチンは、BGMc6 を使用すると、全壁の標識化をしない。仮定すると、全ての α -ガラクトースはガラクトマンナンと関連付けて、強烈なガラクトマンナンと異なった度合いの置換する構造上の形状は、壁の違いを位置づけたと証明した。

(3) ペクチン質

ペクチン質多糖類の位置付けは、モノクローナル抗体の JIM5 と JIM7 (ホモガラクトロナンタイプのペクチン質多糖類に特徴的である) を用いて決定された。モノクローナル抗体 JIM7 だけ胚乳の内部ラメラ領域を標識化した。JIM5 は壁内でいくつかの部位を結合しなかった。異なったエステル化の度合いは、JIM7 が結合している 15~80 % 著しく効果がないことから、エステル化の度合いが 40% 上がったことにより、JIM5 の結合は著しく増加した。

6. 焙煎コーヒー

焙煎加工は最も重要だ。(風味発達と可溶性コーヒー生成の為の、コーヒー豆の抽出)

コーヒー産業におけるこれら 2 つの領域からの関連性は、焙煎加工を伴ったコーヒー豆中の細胞壁多糖類と糖の変化、焙煎加工間に継続した研究を奨励した。

低分子量の糖は、焙煎後のコーヒー豆中でほとんど分解し、ごく少量残存する事が記録されている。対照的に細胞壁多糖類の構造上の特徴は、いくつかの場合修飾したにも関わらず、他の変化しない大部分は残った。重要な分解の量が起こるにも関わらず、ここ 5 年間の研究で、自然な焙煎が異なった焙煎時間でのそれらの分解程度と多糖類の変化を誘発した多くの供給の詳細に焦点をおいた。それらの研究は、2つのカテゴリーに区別できた。焙煎豆の水溶性抽出での多糖類の特性に目を向けることと、焙煎によるコーヒー細胞壁の多糖類含有量への効果の特徴付けを試みた。加えて、焙煎する事は細胞壁の特徴とその内部の多糖類の配列を変えることが、微視的方法や免疫標識を用いて細胞レベルで研究されてきた。

Nunes と Combra は、生豆と焙煎したコーヒー豆から熱水を注入し、抽出した高分子量の物質化学的特徴を記述した一連の報告書を作成した。彼らは、ガラクトマンナンの重合体と分枝度が焙煎する度合いの増加により減少したと報告した。アラビノガラクトタン末端に繋がったアラビノシル残基の量は、重合体の平均分子量のように焙煎している間に減少した。

Redgwell らと Oosterveld らは、焙煎している間のアラビノ種の全細胞壁多糖類の含有量は、変化したと報告した。Redgwell らは、多糖類の 40%までが長い焙煎後に減少したと報告し、それらの結果は Oosterveld らにより確証された。関連データに基づいた後者が、焙煎している間のガラクトマンナン分子量の減少を報告した。同時に彼らは、焙煎したコーヒー抽出物は、生豆の抽出物よりも大きい分子サイズのガラクトマンナンを含んでいると報告した。これは、焙煎過程で高分子のガラクトマンナンの可溶化を可能性に起因した。この提案は、ガラクトマンナンの分子量は変化せず、生豆と焙煎豆から 8 M KOH によって抽出したことを報告した Redgwell らの研究でサポートされた。

コーヒーのアラビノガラクトタンは、焙煎している間に多糖類の分解に最も影響されやすい事が知られている。この重合体は、軽い焙煎後急な減少が見られ、脱重合した。これは、分子量の少なくとも 10 倍量の還元を意味した。より長い焙煎をすることは、重合体の分解をし続けるにも関わらず、さらに進んだ構造上の変化の程度は、最初の焙煎で続いたものと比較し適度な量であった。減少した分子量の大きさは、側鎖のアラビノシル残基欠損から予想されたもの以上で、それゆえにガラクトタン骨格の分裂の結果を生じた。Oosterveld らは、脱分枝のアラビノース側鎖は、ガラクトタン骨格の加水分解より早く生じたと報告した。

AGP の炭水化物プロテイン結合は、ある程度残存したように思われた。さらに、深煎り後の AGP は焙煎した豆より精製した上、ヤリブテストで明確な結果を与えた。

焙煎している間の AGP の運命は、5-結合したアラビノシル残基の連続が、特異的であるモノクローナル抗体 LM6 を用いた免疫標識に伴った。アラビカ種もロブスタ種も浅煎り後の LM6 では、還元標識パターンを示した。浅い中煎りは、上皮層を標識しただけだった。浅煎りでは、1,5-アラビナンが標識化され、細胞壁と近くの粘液細胞の内部部位がはじめに減少したということが明白となった。なぜ、1,5-アラビナンは焙煎している間、壁の内側細胞よりはやく分解するのか。そのとき、温度が急上昇し更に多く、豆の表面が被害を受けたかは明確ではない。1つの可能性は、内側の構造中により固定された自由水の熱がアラビナン側鎖の加水分解により有効な試薬になることがいえる。

間違いなく、細胞壁多糖類の分解は、コーヒー多糖類の可溶化の増加においてカギとなる役割を果たすだろう。この分解は、2つの種類から採取する。多糖類基盤の加水分解は、分子量と糖側鎖の除去が結果としておこる重要な減少である。結果として、AGPs、ガラクトマンナン、マンナン/セルロースマトリックスの絡み度合いは、水の抽出による簡単な可溶化を可能にした特徴付けではない。しかしながら、焙煎している状態もまた多細胞レ

ベルの豆の構造特性の大きな特徴を持っている。Schenkerらは、生成物の特性構造の研究に容積測定、水銀圧力法、電子顕微鏡観察法を使った。従って、細胞壁重合体の多糖類の大きな可溶化に働くいくつかの抽出が影響を受けやすく、増加したといえる。

7. 結論

この5年間は、コーヒー豆の細胞壁の複雑な化学を理解することに安定した進歩が見られた。アラビノガラクトタンはAGPsであり、ガラクトースとマンノース以外の残糖を含む(かもしれない)いくつかの場合のガラクトマンナンの発見は、コーヒー炭水化物の構造上の特徴を定義する試みを継続する為の進歩だ。しかし、この研究の大部分はただ多糖類の分離にだけ焦点を合わせたものである。コーヒー豆の炭水化物分画と他の分子(タンパク質、メライジン)の相互作用の合成配列(焙煎加工中と、豆の抽出も風味発達を行うそれら相互作用がどんな役割をするか行われるところ)を明らかにするための研究が必要である。

生理学側では、即時の収穫前と収穫後の段階でのコーヒータンパク質の物質代謝について、知識が著しく欠けている。それらの発達段階のコーヒー豆の状態での炭水化物は、最終的な飲料品質中の重要な役割を行っているだろう。

コーヒー豆の焙煎段階前では、コーヒー豆は生きていて、ダイナミックな構造をしている。

生豆の炭水化物の状態が、コーヒー品質への要因ならば、収穫後の処理がさらなる研究への重要な領域となるだろう。

〈参考英論文 4〉

Proceedings of the Symposium on Analysis and Related Enzymes, 2007

Are Agricultural Plant Products and the Residues Indigestive Fibers?

農作物とその残された不消化繊維とは？

Naoya Kasai

Efficient enzymatic digestion for soybeans, soybean milk residue (okara), and coffee beans was carried out by a selected food-processing cellulase or pectinase. Enzymatic digestion based on a consideration of cells and cell-wall structures brought about efficient digestion. Cell-walls, components and organs of plant are very complicated. Starch, protein and oil are stocked in the particles of plant cells, and the residues after their extraction are certainly indigestible fibers. These enzymatic digestions are considered to be difficult; however, if the reaction order, pre-treatment conditions, and selection of the enzymes and the combinations are investigated, the digestions will achieve a high yield. The efficient digestion of the cells of soybeans and coffee beans was carried out as model cases. The solution approaches and the components of the cells are shown and discussed.

序論

植物からの多くの種子、作物、葉、および根は私たちの食事、食料品、および加工食品を作り出している。私たちは、植物からのり付け器、油またはジュースを抽出して、使用し、同時に、使用できない農業下位製品として廃棄物を生産する。残りのいくつかは動物性食品に使用されるが、それら大部分は、捨てられるか、燃やされる。最近、私たちはいろいろな問題（例えば人口増加、食物不足、農業汚染と食品加工浪費、食物、地球温暖化とバイオエタノール生産の使用）を考慮している。これらの問題は私たちが使っている食物に結ばれている (Fig.1)。私たちが必要とする情報と知識ははっきりさせられるべきであり、そして、私たちは効率的に食物を使用するべきである。

一般に、私たちは、植物がセルロース、ヘミセルロース、そして/または、ペクチンなどの炭水化物で主に構成されると思うのが簡単であるとわかる。例えば、大豆残渣 (オカラ)、そして、醤油残渣 (SSR) は、日本の典型的な農業廃棄物で、私たちはこれらの分解にセルラーゼを使用する。しかしながら、酵素分解の大部分は望ましい結果を与えないだろう。したがって、私たちは通常、残渣が消化しにくい繊維から成ると理解するかもしれない。しかし、問題はそれほど簡単か?消化しにくい繊維は何が、どこにあるか?植物には、非常に複雑な細胞構造 (Fig.2) がある。私たちは、植物から新しい可能性を使い、探るために大豆の細胞壁の効率的な酵素分解を研究している。この論評では、大豆とコーヒー豆の細胞壁構成に基づく私たちの効率的な酵素分解の結果を示したい。

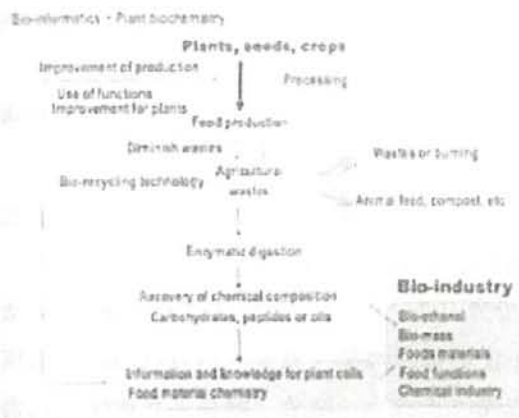


Fig. 1. Strategies and study scopes for food-agricultural processing and biotechnology.

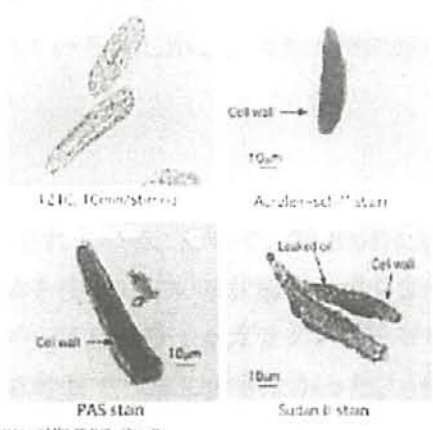


Fig. 2. Single cells of soybeans, and the primary structures.

植物の細胞は、構造が複雑である (Fig.3)。でんぷん、油、またはタンパク質が細胞中に蓄えられている。機械の摩擦のような物理的な損害は細胞を完全に壊すことができず、酵素はこれらの細胞を分解できない。化学的で物理的な処理は酵素分解を助ける。そのため、酵素の選択も重要である。

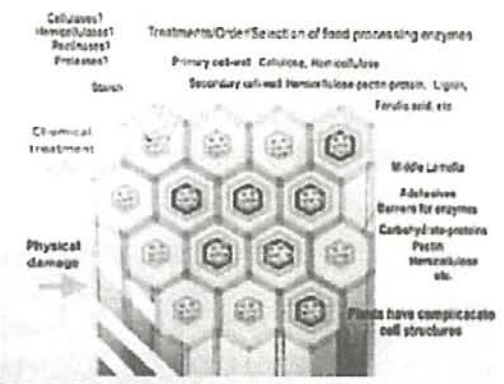


Fig. 3. Illustration of plant structures.

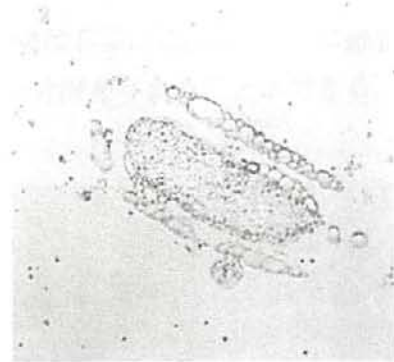


Fig. 4. Cellulose cell wall of the soybean cell of soybeans.

大豆油処理のためのセルラーゼ分解

大豆の単細胞は、容易に 121℃、10 分間のオートクレーブによって見出された。主にセルロースで構成された主要な細胞壁は非常に簡単に分解され、細胞の二次細胞壁は気球のように膨らみ、油滴は二次細胞壁に保たれた (Fig.4)。二次細胞壁はペクチンヘミセルロースタンパク質で構成され、普通、細胞壁の酵素分解は困難である。選別されたペクチナーゼは分解に有効であった。

オカラとは何か?

オカラは、不消化の繊維ではなく、細胞の複合体である。多くの化学分析が報告され、基本的には、タンパク質 25.4-28.4 %、油分 9.3-10.9 %、糖質 3.8-5.3 %、繊維から成り立っている。

残渣と分解された組成、または細胞の構造組成とは何か?

植物細胞は、非常に複雑であり、多くの成分で作られている。しかし、実際の細胞壁は解明されていない。

オカラの酵素分解の以前の報告

オカラのリグニンが可溶化に関する問題であると報告されている。そして、72.3%の産出が10日間セルラーゼや、ペクチナーゼなどの多くの酵素を使用している状態で、オカラの可溶化が行われた。また、酵素溶液がR-L-アラビノシダーゼと α -D-1,4-ガラクトナーゼを含み、オカラを分解したが、それらの酵素の分解物は60時間で50%にすぎなかった。

大豆単細胞の前処理とそれらのセルラーゼ分解

オートクレーブ処理(121°C、10分)は、単細胞分散にとっても効果的であった。単細胞は、Fig.4のように顕微鏡観察された。

組成と構造の考慮を基にしたオカラの酵素分解

豆乳残渣(okara)は、大豆細胞自体で、消化しにくい繊維ではない。硬い細胞は機械式切断刃で簡単にスライスされる。細胞と細胞構造間の中央薄層は容易に検出される。単細胞、セルラーゼ、および選択されたペクチナーゼは、効率的な分解を与えることができる。酵素の高分解は、83-85%で容易に達成された。

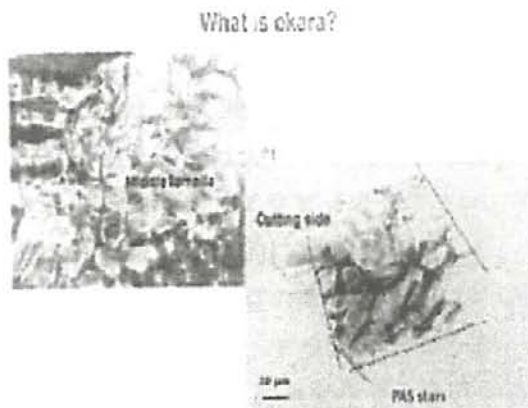


Fig. 4. Microscopy of soybean milk residues.

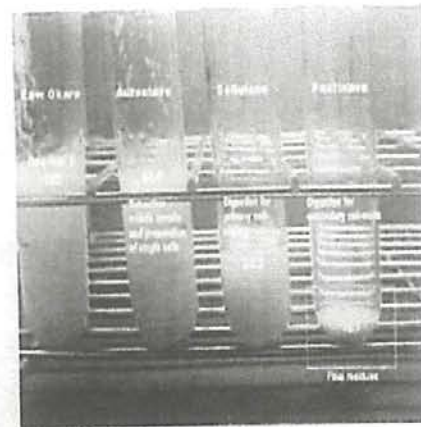


Fig. 6. Efficient sequential digestion of okara.

オカラの加水分解、最終残渣

水高圧蒸気滅菌法(単細胞の前処理)の逐次、主要な細胞壁のためのセルラーゼ分解、および二次細胞壁のための選別されたペクチナーゼ分解はオカラの効率的な分解を与えた。最終残渣は細胞間の油と、油体とフレームであることを決定した。

ペクチナーゼ分解において、アラビノースとガラクトース 1:1.9、キシロースとガラクトースとグルコース 2.6:1.7:1 の比率で見出された。

化学組成は、タンパク質 33.8%、油分 20.0%、糖 22.2%と推測された。ペクチナーゼ分

解の結果（ペクチンのような材料の二次細胞壁）は、アラビノガラクトタン成分（Ara:Gal=1:2）を示すだろう。

大豆細胞の体複合体

大豆の体複合体は、大部分はタンパク質と少量のペクチンの壁から成る。多少のペクチナーゼが、分解し、ボディー粒子を分散させる（Fig.7）。ペクチンはボディー粒子をリンクする。大豆のボディーは、アルカリ耐性タンパク質の壁で包まれている。選別されたアルカリプロテアーゼは、容易に体複合体の主部と骨組みを分解した（Fig.8）。油は、細胞中に分解後で集められ、4または5滴の大きい油を与えた。細胞は、室により分けられるが、構造は報告されていない。



Fig. 7. Dispersion of bodies from the complex from soybean cells.

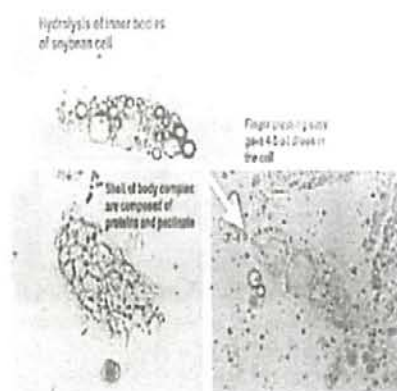


Fig. 8. Enzymatic digestion of soybean cells.

コーヒー豆

コーヒーは、広く親しまれている飲み物である。世界中の生産は、500万トン以上に上る。また、コーヒー豆は大豆と構造的に類似している。しかし、大豆とは違い、硬く、成分はガラクトマンナン、アラビノガラクトタン、セルロースが主である。

両方の豆は、構造的に類似しているが、コーヒー抽出は細胞の主にあぶられたボディーであった。コーヒー豆の厚く消化しにくい細胞が互いにきつく結びつき、単細胞の前処理も可能ではなかった。アラビノガラクトタンタンパク質は、コーヒー豆の場合、炭水化物に架橋構造をとる。8Mの水酸化ナトリウム沸騰などの強アルカリを使用する抽出さえ完全な抽出を実現できない。効率的な酵素分解と細胞壁に関する情報は、ほとんど報告されない。

コーヒー豆の細胞壁は、主にガラクト（グルコ）マンナンで構成される。しかし、マンノースに富むセルラーゼは選別に有効ではなかった。効率的なオカラ消化のための同じセルラーゼが、その結果で選ばれた。

弱アルカリ（0.1M、水酸化ナトリウム）高圧蒸気滅菌法と選別されたセルラーゼ分解は非常に効果的だった。厚くて固い細胞壁は分解され、壊れやすくなった。アラビノガラクトタンタンパク質は細胞壁に多く、ヤリーブ試薬は容易に新たに形成された断片を赤褐色に染色した。

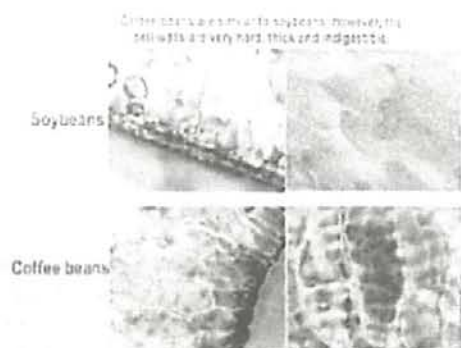


Fig. 9. Microscopy of sliced soybeans and coffee beans.

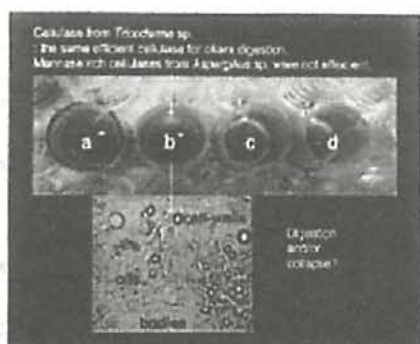


Fig. 10. Screening of enzymes for digestion of coffee beans.

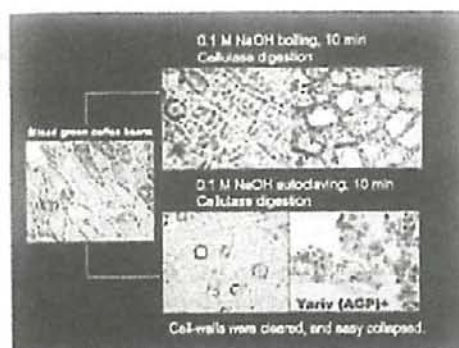


Fig. 11. Enzymatic digestion of coffee beans.

Are Agricultural Plant Products and the Residues Indigestive Fibers?

(Received December 12, 2007; Accepted January 25, 2008)

Naoya Kasai^{1,*}

¹Research Group of Food Material Chemistry, Division of Applied Biological Chemistry,
 Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University
 (1-1, Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai 599-8531, Japan)

Abstract: Efficient enzymatic digestion for soybeans, soybean milk residue (okara), and coffee beans was carried out by a selected food-processing cellulase or pectinase. Enzymatic digestion based on a consideration of cells and cell-wall structures brought about efficient digestion. Cell-walls, components and organs of plant are very complicated. Starch, protein and oil are stocked in the particles of plant cells, and the residues after their extraction are certainly indigestible fibers. These enzymatic digestions are considered to be difficult; however, if the reaction order, pre-treatment conditions, and selection of the enzymes and the combinations are investigated, the digestions will achieve a high yield. The efficient digestion of the cells of soybeans and coffee beans was carried out as model cases. The solution approaches and the components of the cells are shown and discussed.

Key words: cell-wall, soybean, soybean milk residue, okara, coffee bean, enzymatic digestion, pectin, cellulase, pectinase

A large number of seeds, crops, leaves and roots from plants produce our dietaries, food-stuff and processed foods. We extract and use starches, oils or juices from the plants, and simultaneously produce wastes as non-useable agricultural sub-products. Some of the residues are used for animal foods, but most of them are discarded or burned. These days, we are forced to consider various problems such as population increase, food shortage, agricultural pollution and food processing waste, use of food, global warming and bio-ethanol production. These problems are linked to the food we use (Fig. 1). The information and the knowledge we need should be clarified, and we should use food efficiently.

Generally, we find it easy to think that plants are mainly composed of carbohydrates such as cellulose, hemicellulose, and/or pectin. For example, soybean residues (okara) and soy sauce residues (SSR) are typical agricultural wastes in Japan, and we are easy to use cellulases for their digestion. However, most of the enzymatic digestions would not give the desired results. Therefore, we may generally understand that the residues are composed of indigestible fibers. However, is the problem so simple? What and where is the indigestible fiber? Plants have very complicated cell structures (Fig. 2). We have been studying efficient enzymatic digestion of the cell-wall of soybeans to use and explore new possibilities for food-stuff from the compositions of plants. In this review, we would like to show the results of our efficient enzymatic digestion based on the cell-wall compositions of soybeans and coffee beans.¹⁻³⁾

Soybeans.

Soybeans are an important food seed, which contain

good proteins and oil, and many foods and/or foodstuffs are made from them.⁶⁾

Studies of the enzymatic digestion of the cell-wall have investigated the production of soybean oil and the use of soybean milk residues or SSR. A soybean is a cell assembly with a hard shell of the cell-wall, and the oil exists in the oil bodies in the cell (Fig. 3).⁷⁻⁹⁾ Today, soybean oil is generally extracted first with *n*-hexane, and then soybean protein is extracted from the defatted soybeans. Okara is the filtered residue from which soybean milk is separated and is formed in large quantities along with the manufacture of soybean milk, tofu and fried bean curd, especially in Asian areas.¹⁰⁾ Recently, it has become a typical agricultural waste because the reuse of okara or SSR is very difficult, although many trials of its use have been done.¹⁰⁾ Generally, defatted soybeans or okara, soybean residues, are recognized as materials difficult to solubilize because they are composed of high levels of fibers and structures.¹¹⁾ However, is their digestion really difficult?

Cellulase digestion for soybean oil extraction.

We have attempted digestion using cellulase for raw or boiled soybeans and have observed that the digestion of the cell-wall had little or no effect. Considering these facts and reports, we investigated an effective extraction method for soybeans without cell breakage. As a result, we found that single cells of soybeans were easily prepared by autoclaving (121°C for 10 min), the primary cell-wall was easily removed by cellulase, and almost all the oil was retained in the single cell, shrouded by the secondary cell-wall (Fig. 4). There are few reports on oil extraction using the single cells and enzymes. Actual actions of enzymes or the change in soybeans have been little reported, although the information is useful to show not only the possibility of a new strategy for the extraction of soybean oil but also the use or processing of soybeans.¹¹⁾

* Corresponding author (Tel. and Fax. +81-72-254-9459, E-mail: kasai@biochem.osakafu-u.ac.jp).

Bio-informatics • Plant biochemistry

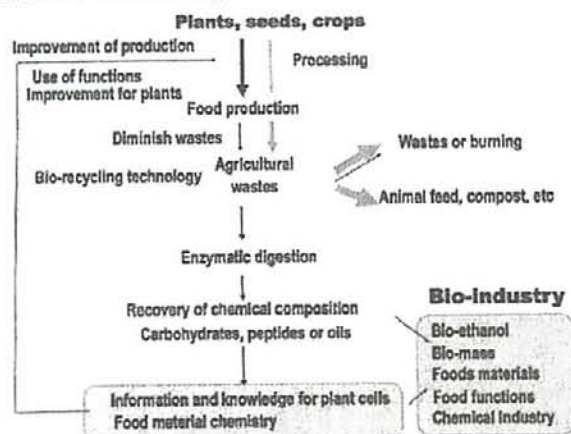


Fig. 1. Strategies and study scopes for food-agricultural processing and biotechnology.

Agricultural plants produce foods for us. Biotechnology, bioinformatics, plant biochemistry, bio-recycling technology, food material chemistry, applied enzymology and bio-industry are overlapped and linked with each other. Multi-scope information also helps each discipline.

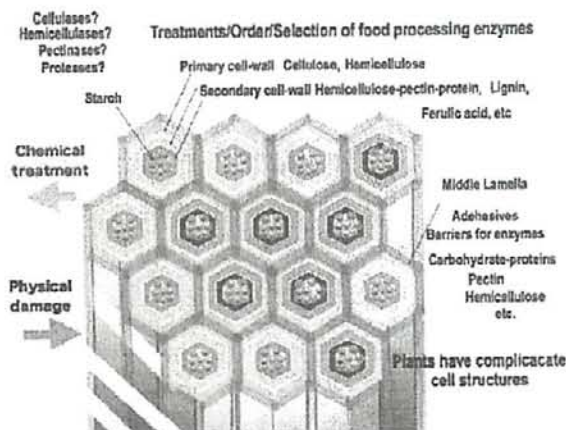


Fig. 3. Illustration of plant structures.

Cells of plant have complicated structures. Starch, oil, or protein is stocked in the cells. Physical damage such as mechanical grinding cannot perfectly break the cells. Enzymes cannot digest these attached cells. Chemical and physical treatments help the enzymatic digestion. Selection of enzymes also is important.

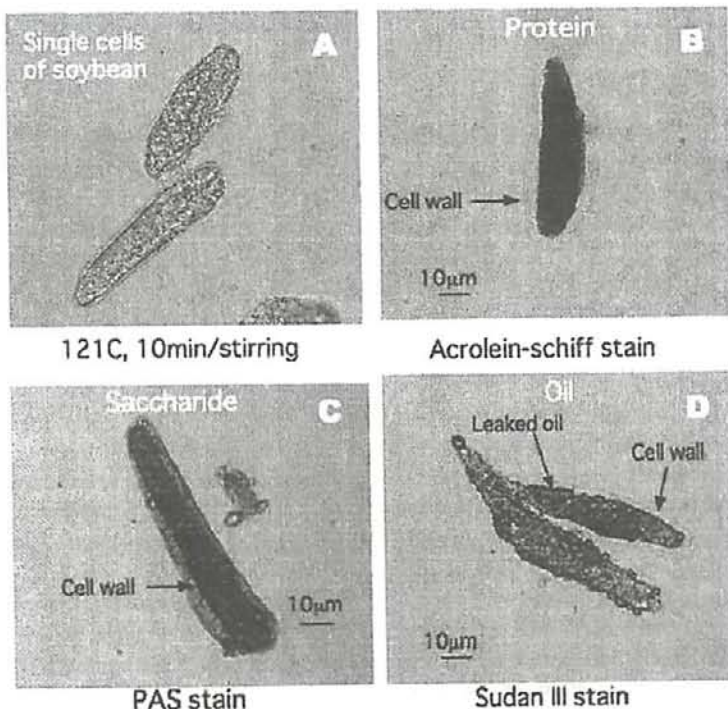


Fig. 2. Single cells of soybeans, and the primary structures.

Soybeans have good quality proteins and oil, and are important seeds. Protein, saccharide and oil are stained respectively. The cell structures are functionally composed; the protein and oil are stocked in the oil and protein bodies in the cells. The cells of the photos are single cells prepared by water-autoclaving (121°C, for 10 min). Cells of plants are attached to each other, and enzymes can not easily digest them.

What are soybean residues (okara)?

Okara does not consist of indigestible fibers but is a complex of soybean cells. It is difficult to study what tissues are digestible and/or indigestible when using mashed okara. The plant organization or cell is actually composed of advanced and complex structures,^{12,13} and okara from soybeans is no exception.

Many chemical analyses of okara have been reported. Okara comes from soybeans essentially; protein and oil from soybeans remain, and the carbohydrates and fibers from the cells of the soybeans also remain.¹⁴⁻¹⁶ There are

many reports on the component analysis of okara; generally, it consists of 25.4–28.4% protein, 3.8–5.3% carbohydrate and 9.3–10.9% oil and fat.¹⁵ These analyses of okara can not clearly show what okara is. The value of protein is higher than that of carbohydrate; however, researchers generally think okara is composed of high fibers which are hard for enzymes to digest. In the case of soy sauce residue, many researchers believe that the residue is composed of the high fibers. According to many projects on residue digestion, the residues are composed of indigestible fibers, and new production of cellulase to digest is

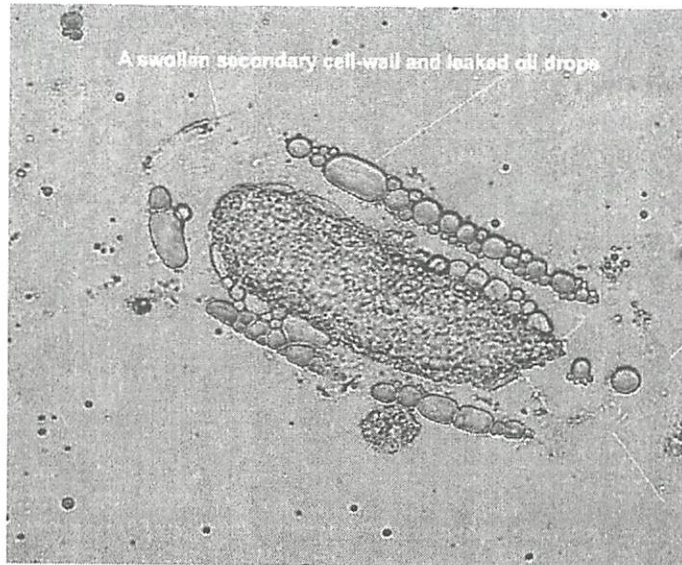


Fig. 4. Secondary cell-wall of the single cell of soybeans.

Primary cell-walls of the single cells, composed of mainly cellulose, were very easily digested, and the secondary cell-walls of the cells were swollen like balloons. Oil drops seeped, and the drops were kept in the secondary cell-walls. The secondary cell-walls are composed of pectin-hemicellulose-protein, and ordinary enzymatic digestion of the cell-walls is difficult. Selected pectinases were effective in digestion.

desired or planned. It is believed that new screening and/or high production of cellulase through genetic modification is a good solution. The problem is not so simple. Most of the researchers did not investigate the okara using microscopy; they did only the chemical analysis and fine-graining for the analysis. Fine-graining is often believed to be very effective for enzymatic digestion. The fine-graining may be somewhat effective for digestion and high-precision analysis which includes physical destruction, but identification of the components is more difficult. Principally, the cells are small, and complete physical destruction is impossible. What is indigestible is indigestible.

What are structural components of the native cells or the digested components and the residues?

This question and the answer are principally described in books on field of plant biochemistry and plant physiology. The plant cells are very complicated and are made of the many components.¹³⁾ Many typical compositions of cell-walls are identified and investigated; however, the actual cell-walls have not been elucidated. Though several models of the cell-walls are described, they are still proposed models.¹³⁾

Previous reports of enzymatic digestion of okara.

Some extractions of soluble polysaccharides from soybeans and okara were reported.¹⁷⁻²¹⁾ However, studies of the solubilization of okara itself are few and have not been reported to be successful yet. Yamaguchi *et al.* reported that the lignin of okara was a problem regarding its solubilization, and enzymatic solubilization of okara was carried out with a yield of 72.3% using many enzymes such as cellulase, pectinase, and lacchase for 10 days.¹¹⁾ Various enzymes and a long reaction time were required. Muzakha *et al.* reported screening to digest okara and the isolation of *Aspergillus niger* var. Tieghe KF-267 as a new okara-liquefying mold. They tried to digest okara

with crude enzyme solutions containing R-L-arabinosidase and endo α -D-1,4-galactanase, but their enzymatic digestion yield was only 50% in 60 h.²²⁾ The new enzymes were produced; however, the digestion yield was not good, and similar digestion would be achieved by ordinary cellulase. Structural study with enzymatic digestion was little known. These reasons motivated the start of our studies.

Preparation of single cells of soybeans and their cellulase digestion.

We investigated the pretreatment of cellulolytic enzyme digestion and found that autoclaved soybeans were easily dispersed as single cells; the single cells were obtained while retaining the soybean oil in the cells.¹⁾ Light microscopic photos of the treated and stained protein, saccharides, and oil of soybean cells are shown in panels of Fig. 3. The autoclave treatment, 121°C for 10 min, was very effective for the single cell dispersion. Most of the cells dispersed as singles; however, the single cells were not fragmented. This treatment and the effect would be obtained by boiling water over 3 h. The surface of the cell was recognized to be a nearly translucent envelope. Generally, adhesive substances between the cells were well-known, such as glycine or hydroxyprolinerich protein or galacturonic polysaccharides.¹²⁾ Autoclaving would solubilize and remove these adhesives between the cells of the soybeans. The internal organization containing the oil bodies was stained purple-red (Fig. 3, protein), the cell-wall was stained in red and covered like a capsule (Fig. 3, saccharide), and the oil present in the cells was stained orange (Fig. 3, oil). The oil was detected both in the oil bodies and as free oil. The free oil was found in the cells, especially in the center part of the soybean, and various drops of oil were observed (Fig. 4). Our prepared single cells have a wide surface area, and the adhesive substance around the cell was removed. The cellulase would more easily digest the cell-wall than the gathered or organized

cells. The secondary cell-walls were not at all digested by the enzymes tested in this experiment.

Enzymatic digestion of okara based on a consideration the components and the structures.

Soybean milk residue, that is "okara", is made from soybeans. This means the okara is not composed of indigestible fibers but of soybean cells. Figure 5 shows the microscopic observation of okara, in which sliced cells of the soybean are found. We reported that single-cell formation from soybeans was very effective in cellulase digestion, and that the primary cell-wall was easily digested but that the secondary cell-wall remained.¹⁾ Therefore, our method and results would be useful in digesting okara, if the secondary cell-wall can be digested. We tried to adapt these results¹⁾ for okara digestion and studied the composition of the secondary cell-wall and the selection of effective enzymes for the digestion of the secondary cell-wall. Enzyme selection for the digestion of the secondary cell-wall was carried out, and Pectinex (food processing enzyme from Novozyme) was selected as the desired enzyme in the result. In addition, a series of enzymatic digestions was adapted to okara, considering its structure and characteristics. An enzymatic high digestion was easily achieved in a yield of 83–85% w/w as a result. Information on the enzymatic soluble structure, its localization, and/or digestible components and the indigestible components were also reported.¹⁾

Composition of remaining cellulase-digested okara.

Comparison of the remaining indigestible okara and cellulase-digested single cells of soybeans was carried out. The primary cell-walls of the single cells of soybeans and okara were digested and removed. In the soybean single cells, it was recognized that the thin secondary cell-wall was swollen and contained inner structured cell bodies (Fig. 4).¹⁾ Similar cell-walls were also found in the okara treated with cellulase digestion. Therefore, the indigestible cell-walls from okara cellulase digestion were identified as the secondary cell-walls of soybeans. The major part of the oil and protein bodies of soybean cells was removed

What is okara?

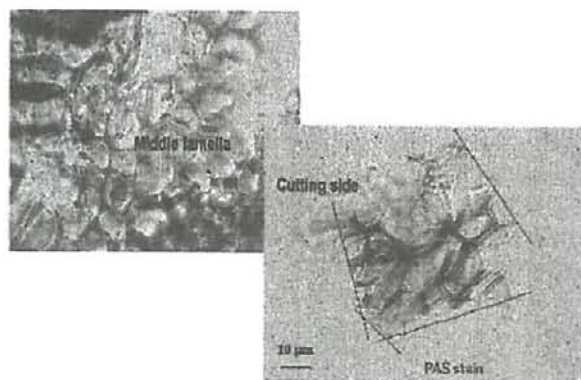


Fig. 5. Microscopy of soybean milk residues.

Soybean milk residues (okara) are soybean cells themselves, and are not indigestible fibers. Hard cells are easily sliced by mechanical cutter blades. Middle lamella between the cells and cell structures are easily detected. Preparation of the single cells, cellulase and the selected pectinase can give efficient digestion.

into the soybean milk in the case of okara, and most of the remaining indigestible okara was considered to be the secondary cell-walls of soybeans.²⁾

Staining with PAS, fast green, and acrolein-Schiff reagent did not produce clear positive staining for the secondary cell-walls; all stainings were pseudo-positive. Alkaline treatment of the remaining okara after the cellulase digestion was done with 1 N sodium hydroxide and boiling for 10 min, and the soluble part was subjected to gel filtration on Toyopearl HW-50 and eluted with water. Total sugar, uronic acid, and protein were detected as one peak of the high molecular weight fraction in the elution profile. The result showed the secondary cell-wall was composed this complex. Therefore, a simple cellulase or hemicellulase could not digest the cell-wall.²⁾

Screening of enzymes for the digestion of remaining okara.

The secondary cell-wall was complex, but the compositions were simple.²⁾ Therefore, we carried out enzyme selection for digestion. Secondary cell-walls from okara after remaining cellulase digestion, and the visible changes in the secondary cell-walls of okara were monitored by light microscopy.²⁾ Most of the tested enzymes were not effective in digesting the remaining secondary cell-walls from okara. Only two enzymes, Pectinex Ultra SP from *Aspergillus aculeatus* and pectolyase from *Aspergillus japonicus*, digested the remaining secondary cell-walls of okara. Pectinex Ultra SP resulted in good digestion.²⁾

Series of enzymatic hydrolyses of okara.

The result is shown in Fig. 6. All digestions produced not only sugar and uronic acid but also protein. The reason for this result would be that many parts of the okara are composed mostly of these complexes such as the secondary cell-walls.

The autoclaving was effective in extracting the structural protein from the cells and the middle lamella.^{1,2)} This extract would be the residual of soybean milk and the materials between cells as determined by HPLC analysis and staining results.³⁾ It is noted that sugar and protein were digested and solubilized as a result, although cellulase digestion was to digest the primary cell-walls of okara. The pectinase digestion produced uronic acid; in addition, neutral sugar and protein were also solubilized and detected. The autoclaving treatment produced mainly carbohydrates of glucose and galactose. The cellulase digestion produced half of the neutral sugars as glucose and also xylose and arabinose. The pectinase digestion was remarkable, showing the same quantity of glucose and galactose, and the ratio of arabinose to galactose was 1:1.9. The indigestible residue was rich in xylose, galactose, and glucose; the ratio was 2.6:1.7:1.²⁾

Three important facts were found in digestion. The first was that a single-cell preparation with autoclaving and agitation was effective for digestion by cellulase. The second was that specification and identification of the enzymatically digestible and indigestible parts of okara were achieved. The last was that identification of the components of the indigestible secondary cell-walls and a useful pectinase to digest the secondary cell-walls were found.

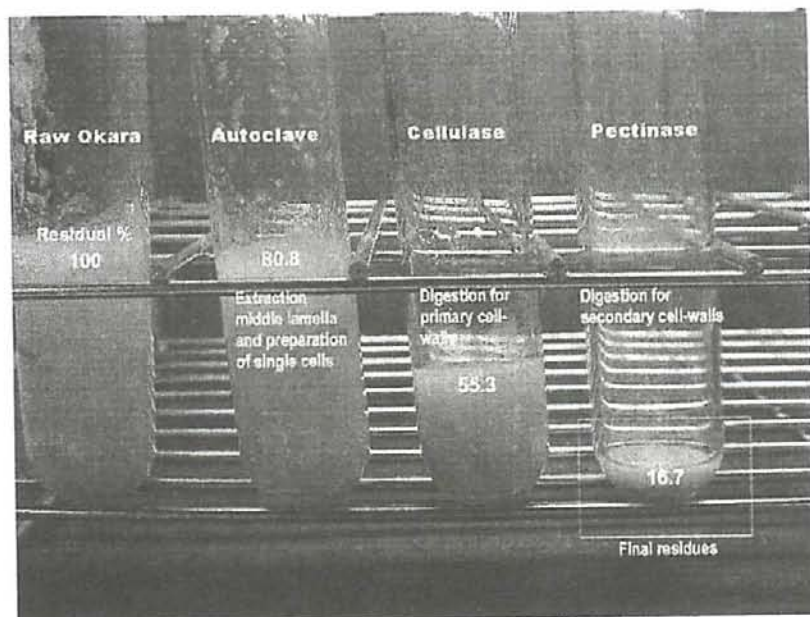


Fig. 6. Efficient sequence digestion of okara.

The sequence of water-autoclaving (preparation of the single cells), cellulase digestion for the primary cell-walls, and selected pectinase digestion for the secondary cell-walls gave efficient digestion of okara. The last residues were determined to be oil, oil bodies and frames between the cells.

The final residues of the digestion of okara.

The residual okara components (Fig. 6) were recognized to be oil, oil bodies in the soybeans cells, and fiber-like organs between the cells under light microscopy.²³ The chemical components were estimated to be 33.8% protein, 20.0% oil and 22.2% sugar. Composition analysis showed the results agreed. This result means that some parts of the cells were not broken in manufacturing soybean milk.²³ Therefore, if a perfect grinding extraction for soybean milk is possible, more okara would be digestible by our method. The ratio of neutral sugar in each digestion and the residue would suggest a typical sugar structure of plants.¹³ The results of cellulase digestion would suggest cellulose and hemicellulose. The results of pectinase digestion, the secondary cell-wall of pectin-like material, would indicate the arabinogalactan component (Ara:Gal=1:2) of pectin.^{13,21} The xylose could come from xylo-galacturonan as characteristic of legumes.^{19,24} The existence of glucose was not accounted for in our examination. The neutral sugar of the residue was remarkable; the main sugar was xylose. The ratio of xylose to galactose to glucose was about 3:2:1; this ratio might be a regular structure. An additional remarkable result was that neutral sugar, uronic acid, and protein were detected in the series of digestions. Digestion by cellulolytic enzymes produced not just those specific saccharides. The residual oil and protein body complexes are composed of protein and saccharides, and the residual fiber-like organ would be composed of protein and cellulose-like material.⁴⁾

Body-complex in the soybean cells.

The body-complex is a structure which contains the protein and oil bodies in the cells. This body, rather than cell-walls, is the main component soy sauce residues. We isolated the body-complex with cellulase and pectinase digestion treatment of the primary and secondary cell-walls.

The main component was protein (105.6% w/w) which was rich in hydrophobic amino acids such as Ala, Gly, Leu, and Val, and a small amount of sugar (1.7% w/w) was found. The SDS-PAGE analysis of the body-complex gave the low molecular protein bands and the broad tailing band of carbohydrates was also found by PAS stain. The sugar would be mainly uronic acid of pectin, and the isolated body-complex was easily dispersed after the pectinase treatment (Fig. 7). The shell of the body-complex mostly consisted of low molecular weight protein, which was mainly 5 kDa, and formed a water-insoluble organ. The body-complex was not soluble below pH 8, and was protease resistant. The alkaline protease (Prolaser from Amano enzyme Inc.) was selected as an efficient enzyme, and it efficiently digests the body⁵⁾ (Fig. 8).

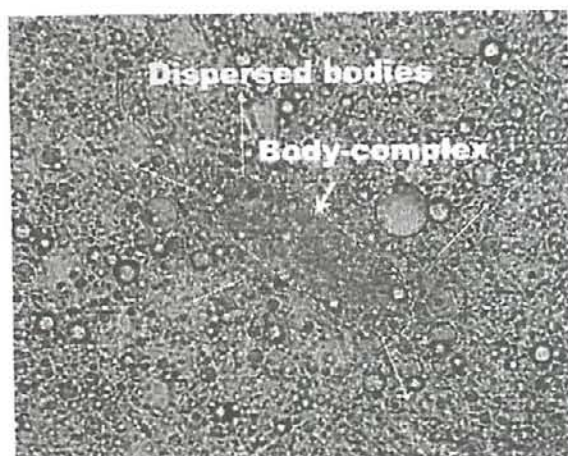


Fig. 7. Dispersion of bodies from the complex from soybean cells.

The body-complex of the soybean is mostly composed of a shell of protein and a small amount of pectin. Some pectinase would give the digestion, and decentralize the body particles. The pectin would link the body-particles.

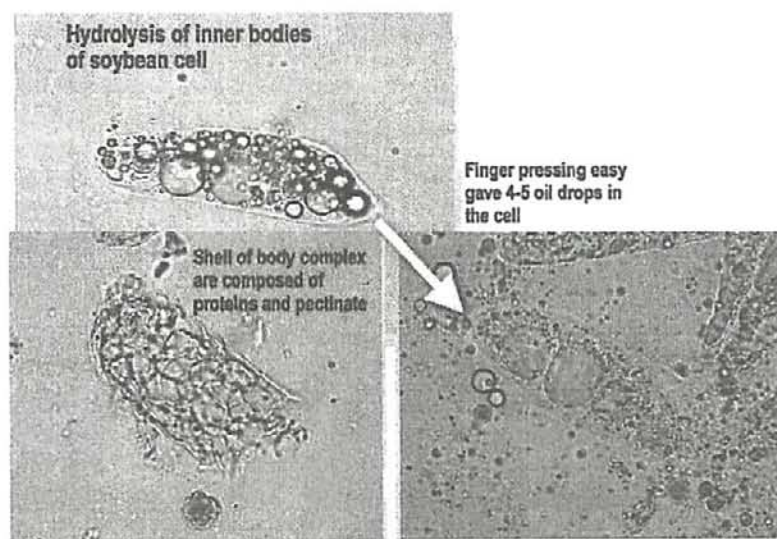


Fig. 8. Enzymatic digestion of the body-complex.

Bodies of soybean are wrapped by a shell of alkali-resistant glued protein. A selected alkali protease easily digested the bodies and the shell of the body complex. Oils were gathered in the cells in the result of the digestion, and gave 4 or 5 big drops of oil. The cell would be divided by rooms. The structure has not been reported.

Weight ratio of the soybean cells.

Cell-part weights are little known. From our several studies of digestion, isolation of the structures such as primary cell-wall, secondary cell-wall, body-complex, heat water soluble extraction and oil of the soybean, each weight was estimated as 9, 8, 27, 36 and 20% respectively.⁵⁾ These values are important for the perfect use of soybeans and for considering their possibilities.

Coffee beans.

Coffee is produced to be a major tasty drink. The worldwide production of coffee beans is >5 million ton-s.²⁵⁾ Coffee beans are a kind of bean, and their structures resemble those of the soybean (Fig. 9).⁸⁾ However, coffee beans are hard, and the beans have insoluble and thick cell-walls (>48% of the beans' weight), which are mainly made of galactomannans, arabinogalactan, and cellulose.²⁶⁻³⁴⁾ The cell-wall has been studied, but its detailed composition is still unclear.^{26,32)} Analysis of the composition requires it to be solubilized or extracted, but the cell-walls are hard to digest or solubilize. The residues after the coffee extraction, which are the cell-walls, are also not able to be used.³²⁾ The residues and the wastes are difficult to treat,^{35,36)} although mannan, galactomannan, and arabinogalactan of the cell-walls are expected for use as a food material.³⁷⁾ Many researchers have been studying the cell-walls such as the chemical extraction of the green and roasted coffee beans, the compositions, and the changes in galactomannan, arabinogalactan, and cellulose or xyloglucan,^{28,29)} or the chemical extraction of the mannan and its structures.²⁷⁾

Coffee beans are also composed of various organs. Redgwell *et al.* reported on arabinogalactan or the arabinogalactan proteins using stepwise chemical and alkaline extraction, and the observation of some mannan layers of the cell-walls using the mannan antibody.^{30,32,33)} These results are important information about the cell-walls of the coffee bean. However, the insolubility of the cell-walls

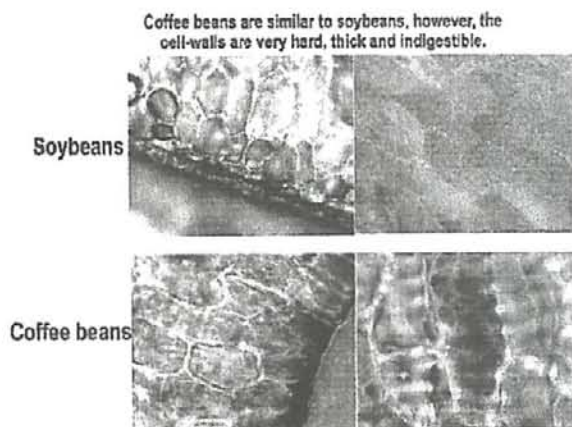


Fig. 9. Microscopy of sliced soybeans and coffee beans.

Both beans are structurally similar. Coffee extraction was mainly roasted bodies of the cells. Thick and indigestible cells of the coffee beans are tightly attached to each other, so hardly any preparation of single cells was possible. Famous conglutinate arabinogalactan protein is tightly cross-linked to the carbohydrates in the case of coffee beans; even extraction using a strong alkali such as 8 M sodium hydroxide boiling for overnight cannot achieve perfect extraction. Efficient enzymatic digestion and information on the cell-walls are little reported.

makes them difficult to analyze and use.^{26,27)} Galactomannan is the main insoluble polymer of carbohydrates.^{28,29)} Some arabinogalactans are very tightly cross-linked with protein (arabinogalactan protein). The alkali extraction of 8 M sodium hydroxide at boiling for overnight only could give about 50% yield.^{26,29-33)} Glucan is proposed to exist as a mannan-cellulose in the cell-walls.²⁷⁾ These characteristic compositions and structures would prevent the digestion and extraction for a long time. We have been studying the efficient digestion of the soybean and its characteristics,¹⁻⁴⁾ and applied to the results and the approaches to coffee beans.

First, we carried out an investigation to determine an effective treatment and enzyme screening for the efficient

digestion of the green and roasted coffee beans and achieved efficient digestion of the cell-walls (over 95%) (Fig. 10).³⁸⁾ We also show an outline and the structural characteristics of the cell-wall based on the results of the efficient enzymatic digestion, the sugar composition from the digestion, the extracts, and the residues or the microscopy observations of the residual cell-walls using toluidine blue O (lignin, hydrophobic part or pectin), Yariv reagent, (arabinogalactan protein) and calcofluor (cellulose or chitin) staining in each procedure.³⁹⁻⁴¹⁾ At least four structures, the galactomannan-cellulose (center part), the membrane of the arabinogalactan protein, the cellulose-rich galactomannan layer and the arabinogalactan protein rich layers (outer part), were found in the cell-wall (Fig. 11). These results may prove useful in exploiting the possibilities of the carbohydrates of coffee beans and the residue after coffee extraction.

The detailed compositions and the structures are now being studied. The characteristics of the cell-walls and the digestion will be clear, and their food functions should be

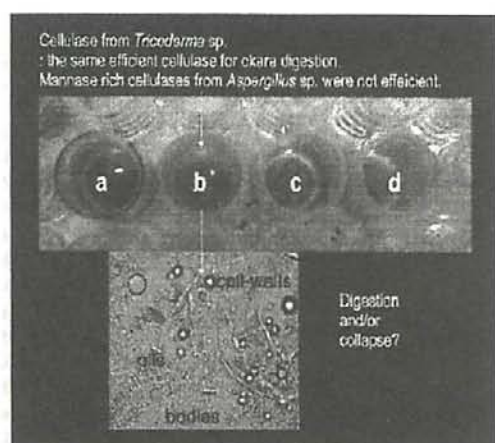


Fig. 10. Screening of enzymes for digestion of coffee beans.

Cell-walls of coffee beans are composed mainly of galacto-(gluco?)-mannan; however, mannose-rich cellulase was not effective in the screenings. The same cellulase as for the efficient okara digestion was selected in the results.

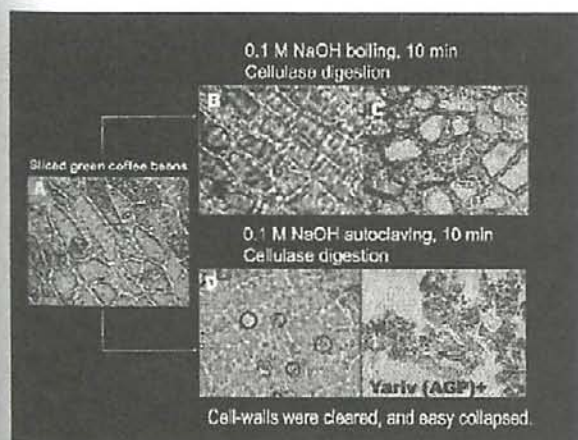


Fig. 11. Enzymatic digestion of coffee beans.

Weak alkali (0.1 M, sodium hydroxide) autoclaving and the selected cellulase digestion were very effective. The thick and hard cell-walls were digested, the cell-walls were cleared and changed to fragile ones. Arabinogalactan proteins were deep in the cell-walls; Yariv reagent easily stained the newly formed fragments red-brown.

useful. Our study of cellulolytic enzymes with information on the structural characteristics and compositions should expand the uses and their possibilities.

The author thanks for their efforts in this study, Mr. Yusuke Imashiro, Mr. Tomohiro Maekawa, Mrs. Aoi Saito, Miss Natsumi Sakurai, Miss Hiroko Ikehara, and Mr. Ryouta Satake, who are graduate students in our research group. This study was partially supported by a grant of Osaka Prefecture, Osaka TLO, and the Ministry of International Trade and Industry, Japan, in the study of enzymatic digestion of soybean residues, and R & D center of UCC Ueshima Coffee Company, Ltd. in the collaborative study of enzymatic digestion of coffee beans. The author appreciates these support measures.

REFERENCES

- 1) N. Kasai, Y. Imashiro and N. Morita: Extraction of soybean oil from single cells. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6217-6222 (2003).
- 2) N. Kasai, A. Murata, H. Inui, T. Sakamoto and I. Kahn: Enzymatic high digestion of soybean milk residue (Okara). *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5709-5716 (2004).
- 3) N. Kasai and H. Ikehara: Stepwise extraction of proteins and carbohydrates from soybean seed. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4245-4252 (2005).
- 4) N. Kasai, R. Satake and H. Ikehara: Isolation and enzymatic digestion of body complex of soybean seed. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 10026-10033 (2005).
- 5) N. Kasai, A. Konishi, K. Iwai and G. Maeda: Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 6336-6342 (2006).
- 6) C. Grieshop, M.C.T. Kadzere, G.M. Clapper, E.A. Flickinger, L.L. Bauer, R.L. Frazier and G.C. Jr. Fahey: Chemical and nutritional characteristics of United States soybeans and soybean meals. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7684-7691 (2003).
- 7) D.J. Murphy and J. Vance: Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 109-115 (1999).
- 8) A.H.C. Huang: Structure of plant seed oil bodies. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 493-498 (1994).
- 9) A. Garcia Serrato: Extraction of oil from soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 157-159 (1981).
- 10) D.K. O'Toole: Characteristics and use of okara, the soybean residue from soybean milk production: a review. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 363-371 (1999).
- 11) Aomori Industrial Research Center, S. Yamaguchi, T. Naraoka, H. Abe, Y. Takatani, M. Uchizawa, J. Ichida and K. Matsue: Report-007 (Japanese): Development of Microbial Technique Effective Use of Okara, *JP H6-287554* (1994).
- 12) I.C. Gladys: Plant cell wall proteins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **49**, 281-309 (1998).
- 13) C. Nicholas and M. McCann: The cell wall. in *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*, B.B. Buchanan, W. Gruissem and R.L. Jones, eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, chapter 2, pp. 52-108 (2000).
- 14) M.C. Bourne, M.G. Clemente and J. Banzen: Survey of the suitability of thirty cultivars of soybeans for soybean milk manufacture. *J. Food Sci.*, **41**, 1204-1208 (1976).
- 15) W.B. Van der Riet, A.W. Wight, J.J.L. Cilliers and J.M. Dattel: Food chemical investigation of tofu and its byproduct okara. *Food Chem.*, **34**, 193-202 (1989).
- 16) C.-Y. Ma, W.-S. Liub, K.C. Kwokb and F. Kwokb: Isolation and characterization of protein from soybean milk residue (okara). *Food Res. Int.*, **29**, 799-805 (1977).
- 17) M.M.H. Huisman, H.A. Schols and A.G.J. Voragen: Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal. *Carbohydr. Polym.*, **38**, 299-307 (1999).
- 18) A. Nakamura, H. Furuta, H. Maeda, T. Takao and Y. Nagamatsu: Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **65**, 2249-2258 (2001).

- 19) A. Nakamura, H. Furuta, H. Maeda, T. Takao and Y. Nagamatsu: Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **66**, 1155-1158 (2002).
- 20) F. Yamaguchi, Y. Ota and C. Hatanaka: Extraction and purification of pectic polysaccharides from soybean okara and enzymatic analysis of their structures. *Carbohydr. Polym.*, **30**, 265-273 (1996).
- 21) A. Nakamura, H. Furuta, H. Maeda, T. Takao and Y. Nagamatsu: Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **66**, 1301-1313 (2002).
- 22) M. Kahar, H. Hayashi, T. Kawaguchi, J. Sumitani and M. Arai: Purification and properties of R-L-arabinofuranosidase and endo- α -D-1,4-galactanase from *Asp. niger* v. Tieghem KF-267 which liquefied the okara. in Genetic, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation, K. Ohmiya, et al., eds., UNI Publishers, Tokyo, pp. 134-143 (1998).
- 23) C.M.G.C. Renard, R.M. Weightman and J.-F. Thibault: The xylose-rich pectins from pea hulls. *Int. J. Biol. Macromol.*, **12**, 155-162 (1997).
- 24) A.L. Goff, C.M.G.C. Renard, E. Bonnin and J.-F. Thibault: Extraction, purification and chemical characterization of xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydr. Polym.*, **45**, 325-334 (2001).
- 25) V.P. Pchelkin: Medicinal plants: natural phenolic and lipophilic complexes of chlorogenic acid. *Pharm. Chem. J.*, **37**, 25-27 (2003).
- 26) A.G.W. Bradbury: Chemistry I: non-volatile compounds, 1A: carbohydrates. in *World Agricultural Series, Coffee: Recent Developments*, R.J. Clarke and O.G. Vitzthum, eds., Blackwell Science, Oxford, U.K., pp. 1-17 (2006).
- 27) M. Fischer, S. Reinmann, V. Trovato and R.J. Redgwell: Polysaccharides of green *Arabica* and *Robusta* coffee beans. *Carbohydr. Res.*, **330**, 93-101 (2001).
- 28) A. Oosterveld, A.G.J. Voragen and H.A. Schols: Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. *Carbohydr. Polym.*, **54**, 183-192 (2003).
- 29) A. Oosterveld, J.S. Harmseb, A.G.J. Voragen and H.A. Schols: Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. *Carbohydr. Polym.*, **52**, 285-296 (2003).
- 30) R.J. Redgwell, D. Curti, J. Rogers, P. Nicolas and M. Fischer: Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications in *in vivo* modification of galactomannan synthesis. *Planta*, **217**, 316-326 (2003).
- 31) P.W. Sutherland, I.C. Hallett, E. MacRae, M. Fischer and R.J. Redgwell: Cytochemistry and immunolocalisation of polysaccharides and proteoglycans in the endosperm of green, *Arabica* coffee beans. *Protoplasma*, **223**, 203-211 (2004).
- 32) R.J. Redgwell, D. Curti, M. Fischer, P. Nicolas and L.B. Fay: Coffee bean arabinogalactans: acidic polymers covalently linked to protein. *Carbohydr. Res.*, **337**, 239-253 (2002).
- 33) R.J. Redgwell, M. Fischer, D. Curti, P. Sutherland, I. Hallett and E. Macrae: Galactomannans and arabinogalactan-proteins in the coffee bean cell wall: heterogeneity and localization. Presented at the 20th International Conference on Coffee Science, Bangalore, India, Oct. 11-15, pp. 88-92 (2004).
- 34) F.M. Nunes and M.A. Coimbra: Chemical characterization of galactomannans and arabinogalactans from two *Arabica* coffee infusions as affected by the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1429-1434 (2002).
- 35) J.F. Calzada, O.R. de Leon, M.C. de Arriola, F. de Miceo, C. Rolz, R. de Leon and J.F. Menchu: Biogas from coffee pulp. *Biotechnol. Lett.*, **3**, 713-716 (1981).
- 36) R.M. Dinsdale, F.R. Hawkes and D.L. Hawkes: The mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of coffee waste containing coffee grounds. *Water Res.*, **30**, 371-377 (1996).
- 37) I. Asano, T. Nakamura, H. Hoshino, K. Aoki, S. Fujii, N. Imura and H. Iino: Use of mannooligosaccharides from coffee mannan by intestinal bacteria. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **75**, 1077-1083 (2001) (in Japanese).
- 38) N. Kasai, A. Konishi, K. Iwai and G. Maeda: Efficient digestion and structural characteristics of cell walls of coffee beans. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5709-5716 (2006).
- 39) K.V. Krishnamurthy: *Methods in Cell Wall Cytochemistry*, CRC Press, Boca Raton, FL (1999).
- 40) J. Yariv, M.M. Rapport and L. Graf: The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochem. J.*, **85**, 383-388 (1962).
- 41) W. Herthl and E. Schnepfl: The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Calcho Protoplasma*, **105**, 129-133 (1980).

未利用農産物は難分解性糖質か？

—大豆（オカラ）、コーヒー豆の場合—

笠井尚哉¹

¹大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

(599-8531 堺市中区学園町 1-1)

未利用農産物の有効利用についての関心が再び高くなっている。これらの多くは、未利用農産物とバイオマス-エタノール生産・化学資源としての有効利用あるいは粕・廃棄物-環境問題としてリンクされてきている。そして、ようやく環境問題やエネルギー問題として改めて検討すべき時代に入ったものと思われる。農産物は古くから食糧や飼料そのものであり、種子・果実は、食品生産のためのデンプンやタンパク質あるいは脂質の給源でもある。しかしながら、農産物がすべて利用できることは実に少ない。タンパク質、糖質、脂質が食品素材として分離・抽出されたあとの農産物は、結局、その多くがいわゆる「粕」として廃棄・燃焼されているのが現状である。特に食品工業が発展して加工食品が大量生産されてからは著しい。たとえば、大豆ではオカラであり、醤油粕でもある。これらは基本的には農産物であるので、当然ある程度の酵素分解は可能であり、可溶化物の利用も可能なはずである。決して活性炭にしかできないような難分解性繊維ではない。また当然ながら大豆であるので多くの有用な大豆成分を未だ多く含んでいる。これらの副産物の多くは難分解性繊維のみではなく糖質やタンパク質、あるいはそれらの複合体から構成されており、詳細な分析が非常に困難とされているだけである。それゆえ、成分や構造について詳細には検討されておらず、素材のもつ可能性についても十分には理解・利用されていないのである。たとえば醤油粕やオカラ=難分解性繊維(!?)として捉え、単純に「セルラーゼ-組み替え-高生産」図式で単純に解決できるとするのは明らかに誤りである。私たちは、ダイズとコーヒー豆をモデルに、その細胞の構成成分とその構造を考えながら、最適な食品加工用酵素の選択、各構造物の単離と検討および化学成分検討を行い、高度酵素分解を行った。

〔質問〕

信州大院・工 天野

1) 酵素処理をする際に種々の酵素をシークエン

シャルに反応させた方が効率が良いのでしょうか。

2) 処理する際に高濃度では、生成物阻害により分離し難くなるということはないでしょうか。

〔答〕

1) 理論的には、すべての細胞を物理的に破断できれば、いいのですが、実際にはそこまでの破断は困難です。また、植物の細胞は、いくつかの層に分かれており、それぞれ特有の構成成分でできています。よって、スクリーニングによって適した酵素をそれぞれの細胞壁ごとに用いると効果的と考えられます。また細胞器官はタンパク質やペクチンなどの膜で覆われて守られている場合も多くあります。今回のダイズの場合ですと1次細胞壁はセルロースが多く、2次細胞壁はペクチン-タンパク質-ヘミセルロースの複合体です。また、コーヒー豆の場合ですとガラクトグルコマンナンと膠着アラビノガラクトンがその主成分になりますので、それぞれに適した酵素や処理を順次使用しなければ高度に可溶化できない場合が多いと考えられます。

2) 植物組織分解で最も問題なのは、その組織の重量当たりの吸水性です。バイオエタノール生産でも植

物組織を10%懸濁にするのが非常に困難といわれています。今回の場合には、乾燥重量で2%程度(オカラ水分含量は80-85%)で行っています。攪拌できればそれほど問題なく、ほとんどは一、二糖まで分解されています。分離は遠心や膜濾過で試しましたが問題なく行えることは確認しました。

〔質問〕

日本食品化工(株) 山本

オカラの場合、最初の単細胞化時にオートクレープ処理を行っているが、接着している物は何か。接着作用している結合は水素結合か。

〔答〕

植物生理化学によれば、細胞間のミドルラメラにある膠着物質は、ペクチン、アラビノガラクトンプロテイン、プロリンリッチタンパク質、ヒドロキシプロリンリッチタンパク質、グリシンリッチタンパク質であるとされています。これらがいわゆる糊のように充填されています。よって数時間以上の煮沸や121°C-10分程度の処理により抽出され、単細胞化が達成されます。ちなみに、味噌汁はダイズが単細胞化されている懸濁液です。

Are Agricultural Plant Products and the Residues Indigestive Fibers?

農作物とその残された不消化繊維とは？

Naoya Kasai

大豆のための効率的酵素分解、豆乳残渣(okara)、およびコーヒー豆は選択された食品加工セルラーゼかペクチナーゼによって行われました。細胞と細胞壁構造の考慮に基づく酵素分解は、効率的な消化を引き起こした。植物の細胞壁、構成要素と器官は、非常に複雑です。でんぷん、タンパク質、および油は植物細胞の粒子の中に蓄えられます。そして、確かに、それらの抽出の後の残渣は消化しにくい繊維です。これらの酵素分解が難しいと考えられます。しかしながら、反応命令、前処理状態、および酵素と組み合わせが調査されると、消化は高収率を実現するでしょう。大豆とコーヒー豆の細胞の効率的な分解がモデル・ケースとして行われました。解決策と細胞の成分について、示されて、議論します。

植物からの多くの種子、作物、葉、および根は私たちの食事、食料品、および加工食品を作り出しています。私たちは、植物からのり付け器、油またはジュースを抽出して、使用し、同時に、使用できない農業下位製品として廃棄物を生産します。残りのいくつかは動物性食品に使用されますが、それら大部分は、捨てられるか、燃やされます。最近、私たちはいろいろな問題（例えば人口増加、食物不足、農業汚染と食品加工浪費、食物、地球温暖化とバイオエタノール生産の使用）を考慮しています。これらの問題は私たちが使っている食物に結ばれています (Fig.1)。私たちが必要とする情報と知識ははっきりさせられるべきであり、そして、私たちは効率的に食物を使用するべきです。

一般に、私たちは、植物がセルロース、ヘミセルロース、そして/または、ペクチンなどの炭水化物で主に構成されると思うのが簡単であるとわかります。例えば、大豆残渣 (オカラ)、そして、醤油残渣 (SSR) は、日本の典型的な農業廃棄物で、私たちはこれらの分解にセルラーゼを使用します。しかしながら、酵素分解の大部分は望ましい結果を与えないでしょう。したがって、私たちは通常、残渣が消化しにくい繊維から成ると理解するかもしれませんが、問題はそれほど簡単でしょうか？ 消化しにくい繊維は何が、どこにあるのでしょうか？ 植物には、非常に複雑な細胞構造 (Fig.2) があります。私たちは、植物から新しい可能性を使い、探るために大豆の細胞壁の効率的な酵素分解を研究しています。この論評では、大豆とコーヒー豆の細胞壁構成に基づく私たちの効率的な酵素分解の結果を示したいです。

大豆。

大豆は重要な食物種（それは良いタンパク質と油を含みます）です。そして、多くの食品や食品はこれらから作られます。

細胞壁の酵素分解の研究は大豆油の生産と豆乳残渣か SSR の使用を調査しました。大豆は細胞壁の固い殻がある細胞集合体です。そして、油は細胞 (Fig.3) 中の油体に存在しています。今日、一般に、大豆油は最初に、*n*-ヘキサンで抽出されます。そして次に、大豆タンパク質は脱脂大豆から抽出されます。特にアジアの領域で、オカラは豆乳が分離されて

いて、豆乳、豆腐、および揚げた豆腐の製造と共に大量に作られる濾過された残りです。okara が SSR の再利用が非常に難しいので、最近典型的な農業廃棄物になりました。一般に、それらが高いレベルの繊維と構造で構成されるので、脱脂大豆か okara(大豆残渣)が可溶化に難しい材料として認識されます。しかしながら、彼らの消化は本当に難しいですか？

大豆油抽出のためのセルラーゼ分解。

私たちは、生の、または、煮られた大豆にセルラーゼを使用することで分解を試みて、細胞壁分解にはほとんど影響を持たなかったと述べました。これらの事実とレポートを考慮して、我々は細胞破損なしで大豆のための効果的抽出方法を調査しました。その結果、私たちは高圧蒸気滅菌法(10 分間、121°C)で容易に大豆の単細胞を準備して、セルラーゼで容易に第一の細胞壁を取り除いて、二次細胞壁(Fig.4)によって覆い隠された単細胞の中でほとんどすべての油を保有したのがわかりました。単細胞と酵素を使用する油の抽出に関するレポートがわずかしかありません。大豆の使用か処理も示しているために役に立ちますが、これは大豆油の抽出のための新しい戦略の可能性だけではなく、酵素の実際の作用か大豆における変化が少ししか報告されていません。

大豆残渣(okara)は何ですか？

オカラは消化できない繊維から成らなくて、大豆細胞の複合体です。どんな組織が消化できておよび/または消化できないかは、研究するのが難しいです。植物組織か細胞が実際に高度で複雑な構造で構成されます。そして、大豆からの okara は例外ではありません。

okara の多くの化学分析が報告されました。オカラは、基本的に大豆から来ます。大豆からのタンパク質と油は残ります、そして、大豆の細胞からの炭水化物と繊維は残ります。okara の成因分析に関する多くのレポートがあります。一般に、それは 25.4-28.4%のタンパク質、3.8-5.3%の炭水化物と 9.3-10.9%の油と脂肪から成ります。okara のこれらの分析は、okara が何であるかを明確に示すことができません。タンパク質の値は炭水化物のものより高いです。しかしながら、一般に、研究者は、okara が酵素の読みこなしにくい高い繊維で構成されると考えます。醤油残渣の場合では、多くの研究者が、残りが高い繊維で構成されると信じています。残渣分解に関する多くのプロジェクトによると、残渣が難繊維で構成されて、読みこなしセルラーゼの新しい生産は、望まれているか、または計画されています。遺伝子組み替えを通してのセルラーゼの新しいスクリーニングおよび/または高い生産が良い解決であると考えられています。問題はそれほど簡単ではありません。研究者の大部分は顕微鏡法を使用する okara の調査をしませんでした。彼らは分析のために化学分析をしました。しばしば粒が酵素分解に非常に効果的であると信じられています。物理的な破壊を含んでいる分解と高精度分析に、粒はいくらか効果的であるかもしれませんが、成分の識別は、より難しいです。主に、細胞は小さいです。そして、完全破壊は不可能です。消化しにくいことは消化しにくいです。

天然の細胞が消化された構成要素の構造構成要素と残りは、何ですか？

この質問と答えは、主に植物生化学と植物生理学の分野に関する本で説明されます。植物細胞は非常に複雑で、多くの構成要素でできています。細胞壁の多くの典型的構成は、特定されて、調査されます。しかし、実際の細胞壁は、解明されていません。細胞壁のいくつかのモデルが記述されるけれども、それらはまだ提案されたモデルです。

okara の酵素分解に関する報告。

大豆と okara からの可溶性多糖類のいくつかの抽出が報告されました。しかしながら、okara 自体の可溶性の研究は、わずかであり、まだ成功していることが報告されませんでした。山口らが、okara のリグニンが可溶性に関する問題であると報告して、72.3%の利回りで okara について 10 日間セルラーゼやペクチナーゼ、ラッカーゼなどの多くの酵素を使用することで行われました。様々な酵素は長い反応時間が必要でした。Muzakha 他は、黒色アスペルギルスニガールの okara の隔離を消化すると報告しました。新しい okara-液化型としての Tieghe KF-267。それらは R-L-アラビノシダーゼとエンド α -D-1,4-ガラクタナーゼを含んでいる天然酵素溶液で okara を消化しようとしました。しかし、それらの酵素分解産出高は 60 時間でわずか 50%でした。新しい酵素は作り出されました。しかしながら、分解産出高は良くはありませんでした。そして、類似した分解は普通のセルラーゼによって成し遂げられます。酵素分解による構造的な研究はほとんど知られていませんでした。これらの理由は私たちの研究の始まりを動機づけました。

大豆とそれらのセルラーゼ分解の単細胞の準備。

私たちは、セルロース分解酵素消化の前処理を調査して、autoclaved 大豆が単細胞として容易に分散されたのがわかりました。細胞中で大豆油を保有している間、単細胞を得られました。大豆細胞を処理して染色されたタンパク質、糖類と油の小さい微細な写真は、Fig.3 のパネルで見られます。単細胞分散に、オートクレープ処理(10 分間、121°C)は非常に効果的でした。細胞の大部分は単体として分散しました。しかしながら、単細胞は断片化されませんでした。この処置と影響は、3 時間以上、熱湯によって得られます。細胞表面は、ほとんど半透明の封筒になるように認識されました。一般に、グリシンまたは hydroxyprolinerich タンパク質または galacturonic polysaccharides のような、細胞間の粘着性の物質は、有名でした。そして、高圧蒸気滅菌法は、大豆細胞間のこれらの接着剤を可溶性にして、除去します。油体を含んだ内部の組織は染色された赤紫色(Fig.3、タンパク質)でした。細胞壁は、赤で染みを付けられて、カプセル(Fig.3、糖類)のように覆われていました。そして、細胞の中の油はオレンジ色に染色されました(Fig.3、油)。油は油体と、そして、遊離した油として検出されました。特に大豆の中心の一部で、遊離した油は見つかりました。そして、油の様々な滴は観察されました(Fig.4)。私たちの準備された単細胞には、広い表面積があります。そして、細胞の周りの粘着性の物質を取り除きました。セ

ルラーゼは、集合体か組織化された細胞より細胞壁をより簡単に分解します。二次細胞壁は、この実験でテストされる酵素によって、まったく消化されませんでした。

okara の酵素分解は、構成要素と構造を考慮に基礎づけました。

すなわち、豆乳残渣、"okara"は大豆から作られます。これは、okara が消化しにくい繊維で構成されるのではなく、大豆細胞について構成されることを意味します。Fig.5 は okara の顕微鏡観察を示しています。そこでは、大豆のスライスされた細胞が見つけれられます。私たちは、大豆からの単細胞構成がセルラーゼ分解で非常に効果的であり、主要な細胞壁が簡単に分解されましたが、二次細胞壁が残っていたと報告しました。したがって、私たちの方法と結果は二次細胞壁を分解できるなら okara 分解の際に役に立つでしょう。私たちは、okara 消化のためにこれらの結果を適合させようとして、二次細胞壁の構成と二次細胞壁の消化のための有効な酵素の選別を研究しました。二次細胞壁の消化のための酵素選択が行われました。そして、Pectinax(Novozyme からの食品加工酵素)は必要な酵素として結果で選定されました。さらに、一連の酵素の消化が okara に適していました。そして、その構造と特徴を考慮しました。酵素の高い分解はその結果、83-85% w/w の利回りで容易に達成されました。また、酵素の解決できる構造、その局地化や分解できる構成要素に関する情報と分解できない構成要素は、報告されもしました。

残りのセルラーゼ分解された okara 構成。

残っている消化しにくい okara と大豆のセルラーゼ分解された単細胞の構成が行われました。大豆と okara の単細胞の主要な細胞壁は分解されて、取り除きました。大豆単細胞の中では、薄い二次細胞壁が膨らんで含まれた内側の構造化された細胞体(Fig.4)であると認められました。また、同様の細胞壁はセルラーゼ分解で扱われた okara で見つけれられました。したがって、okara セルラーゼ分解からの消化しにくい細胞壁は大豆の二次細胞壁として特定されました。大豆細胞の油とタンパク質ボディの大部分は、okara の場合大豆豆乳に取り出されました。そして、残っている消化しにくい okara の大部分は大豆の二次細胞壁であると考えられました。

PAS、ファスト・グリーン、およびアクロレインシッフ試薬による染色は、二次細胞壁のためにはっきりした明確な染色法を生じませんでした。すべての染色が疑似積極的でした。セルラーゼ分解後の残りの okara は 1N 水酸化ナトリウム水溶液で、10 分間沸騰してアルカリ処理し、可溶性の部分は、Toyopearl HW-50 でゲル濾過にかけられて、水で溶出しました。全糖、ウロン酸、およびタンパク質は高分子重さの断片の 1 つのピークとして溶出像に検出されました。結果は、二次細胞壁がこれほど複雑な状態で構成されたのを示しました。したがって、簡単なセルラーゼかヘミセルラーゼが細胞壁を分解することができませんでした。

okara のままで残る分解のための酵素の選別。

二次細胞壁は複雑でしたが、構成は簡単でした。したがって、私たちは分解のための酵素選別を行いました。セルラーゼ分解後の okara からの二次細胞壁、および二次における okara の細胞壁は、顕微鏡検査によってみられました。テストされた酵素の大部分は okara から残っている二次細胞壁を分解するのに有効ではありませんでした。2 つの酵素 (アスペルギルス属 *aculeatus* からの Pectinex Ultra SP とアスペルギルス属ツバキからの pectolyase) だけが、okara の残っている二次細胞壁を分解しました。Pectinex Ultra SP は良い消化をもたらしました。

okara の酵素の加水分解の連続。

結果は Fig.6 に示されます。すべての分解が単糖とウロン酸、タンパク質だけ生産するというわけではありませんでした。この結果の理由は okara の多くの部分がほとんど二次細胞壁などのこれらの複合体で構成されるということでしょう。

オートクレーブは、細胞と中央薄層から構造蛋白質を抽出するのに有効でした。この抽出は HPLC 分析と染色結果で測定されて、この抽出物は大豆豆乳で残りであるものと細胞間の材料です。糖とタンパク質がその結果分解されて、可溶性されたことに注意されます。しかし、セルラーゼ分解は okara の主要な細胞壁を分解することでした。ペクチナーゼ分解はウロン酸を生産しました。さらに、中性糖とタンパク質は、可溶性にされ検出されました。高压蒸気滅菌法処理は、主にブドウ糖とガラクトースの炭水化物を生産しました。セルラーゼ分解はブドウ糖、更にはキシロースとアラビノースとして中性糖の半分を生産しました。ブドウ糖とガラクトースの同じ量を示して、ペクチナーゼ分解は顕著でした。そして、アラビノース対ガラクトースの比率は 1:1.9 でした。消化しにくい残りはキシロース、ガラクトース、およびブドウ糖が豊富でした。比率は 2.6:1.7:1 でした。

3 つの重要な事実が、分解で見つけられました。最初は、分解に高压蒸気滅菌法と扇動による単細胞準備がセルラーゼで有効であったということでした。2 番目は okara 酵素に消化のよくて消化しにくい部分の仕様と同一視が達成されたということでした。最後は消化しにくい二次細胞壁と二次細胞壁の構成要素のその識別でした。そして、第二の細胞壁を分解する際のペクチナーゼは見つかりました。

Okara 分解の最終残渣。

残りの okara 構成要素 (Fig.6) は、油と、大豆細胞中の油体と、光学顕微鏡下における細胞間の繊維様器官であると認識されました。化学構成要素は、33.8% のタンパク質と、20.0% の油と 22.2% の糖であると推定されました。構成分析は、結果が同意したのを示しました。この結果は、細胞のいくつかの部分が製造豆乳で壊されなかったことを意味します。したがって、豆乳のための完全な研磨する抽出が可能であるなら、より多くの okara は私たちの方法で消化がよいでしょう。各分解と残渣における、中性糖の比率は植物の典型的な砂

糖構造を示すでしょう。セルラーゼ分解の結果は、セルロースとヘミセルロースを暗示します。ペクチナーゼ分解の結果(ペクチンのような材料の二次細胞壁)はペクチンのアラビノガラクトン成分(Ara:Gal=1:2)を示すでしょう。キシロースはマメ科植物の特性としてキシロガラクトツロナンから来ることができました。ブドウ糖の存在は、私たちの試験で説明されませんでした。残りの中性糖は顕著で、主な糖はキシロースでした。キシロース対ガラクトース対ブドウ糖の比率はおおよそ 3:2:1 でした。この比率は通常の構造であるかもしれませんが。更なる顕著な結果は中性糖、ウロン酸、およびタンパク質が分解の連続で検出されたということでした。セルロース分解酵素による消化はまさしくそれらの特定の糖類も生産しませんでした。残油と蛋白粒複合体はタンパク質と糖類で構成されます。そして、残存繊維様器官はタンパク質とセルロースのような材料で構成されるでしょう。

大豆細胞の中の体-複合体。

体-複合体は、細胞にタンパク質と油体を含む構造です。このボディーは細胞壁よりむしろ主成分醤油残渣です。私たちは、セルラーゼとペクチナーゼ分解処理によって体-複合体を隔離しました。主成分は疎水性アミノ酸(例えば Ara, Gly, Leu, Val)が豊富だったタンパク質(105.6% /w)でした。そして、少量の糖(1.7% w/w)は見つかりました。体-複合体の SDS-PAGE 分析は低分子タンパク質バンドに与えました。そして、炭水化物の幅広いバンドは PAS 染色によって見つかりました。糖は主にタンパク質のウロン酸でしょう。そして、孤立している体-複合体はペクチナーゼ処理(Fig.7)後に容易に分散されました。体-複合体の殻は、低分子量のタンパク質から大部分は成って、水解決できない機関をつくりました(タンパク質は主に 5kDa でした)。体-複合体は pH 8 の下で溶けなくて、抵抗するプロテアーゼでした。アルカリ・プロテアーゼ(アマノ酵素株式会社からの Prolaser)は効率的な酵素として選定されました。そして、それは効率的に、ボディー(Fig.8)を分解します。

大豆細胞の重さ比率。

細胞一部重量は、ほとんどわかっていません。私たちの分解(大豆の主要な細胞壁、二次細胞壁、体-複合体、熱水溶性抽出物と油のような構造の隔離)のいくつかの研究から、各重量は 9、8、27、36、および 20%としてそれぞれ推定されました。大豆の完全な使用とそれらの可能性を考慮するのに、これらの値は重要です。

コーヒー豆。

コーヒーは、主なおいしい飲物であるために生産されます。コーヒー豆の世界的な生産は、500 万トン以上です。コーヒー豆は一種の豆です。そして、それらの構造は大豆(Fig.9)のものに類似しています。しかしながら、コーヒー豆は固く、解決不能で厚い細胞壁(豆の重さの 48%)があります。それは主にガラクトマンナン、アラビノガラクトンとセルロースでできています。細胞壁は研究されましたが、詳細な構成はまだ不明瞭です。構成の分析は、

それが可溶されるか、または抽出されるのを必要としますが、細胞壁は分解するか可溶化にするのが困難です。また、コーヒー抽出後の残渣(細胞壁)は使用できません。細胞壁のマンナン、ガラクトマンナン、およびアラビノガラクトタンは食物素材としての使用が予想されますが、残渣と廃棄物は処理するのが難しいです。多くの研究者が細胞壁(例えば焙煎コーヒー豆とガラクトマンナン、アラビノガラクトタンとセルロースまたはキシログルカンの変化の化学的抽出、またはマンナンとその構造を化学的抽出)を研究しています。

コーヒー豆は、様々な器官で構成されます。

Redgwell 他は、マンナン抗体を使用しながらアラビノガラクトタンかアラビノガラクトタンタンパク質に関して徐々に化学的アルカリ性抽出、および細胞壁のいくつかのマンナン層の観察が報告されました。これらの結果はコーヒー豆の細胞壁に関する重要情報です。しかしながら、細胞壁の不溶性は分析して、それらを使用するのが難しくします。ガラクトマンナンは、炭水化物の主な不溶性ポリマーです。いくつかのアラビノガラクトタンタンパク質(アラビノガラクトタンタンパク質)で非常にしっかり架橋処理されます。夜通し沸騰するところ、8M 水酸化ナトリウムだけのアルカリ処理はおよそ 50%の産出を与えるかもしれません。グルカンは、マンナンセルロースとして細胞壁に存在するように提案されます。これらの特徴ある構成と構造は長い間、分解と抽出を防ぐでしょう。私たちは、結果の効果的な分解とコーヒー豆へのアプローチを研究していました。

最初に、私たちは、生豆、焙煎コーヒー豆の効率的な分解の酵素選別を決定するために調査を行って、細胞壁(95%以上)(Fig.10)の効率的な分解を達成しました。また、私たちは各手順で染色し、トルイジンブルーO(リグニン、疎水性部分またはペクチン)、ヤリーブ試薬(アラビノガラクトタンタンパク質)、および蛍光試薬(セルロースまたはキチン質)を使用することで効率的な酵素分解の結果、消化、抽出、および残渣からの糖構成または残渣の細胞壁の顕微鏡観察に基づく細胞壁の概要と構造的な特性を示しています。少なくとも 4 つの構造(ガラクトマンナン-セルロース(中心部)、アラビノガラクトタンタンパク質の膜、セルロースの豊富なガラクトマンナン層、およびタンパク質に富むアラビノガラクトタン層(外部)が、細胞壁(Fig.11)で見つけられました。これらの結果はコーヒー抽出後にコーヒー豆と残渣の炭水化物の可能性を利用する際に有用であるかもしれません。

詳細な構成と構造は現在、研究されています。細胞壁と消化の特性は明確になるでしょう。そして、それらの食物機能は役に立つべきです。構造特徴と構成に関する情報によるセルロース分解酵素の私たちの研究は、用途とそれらの可能性を広くするべきです。