炭水化物の Transformation に関する研究 (第 2 報¹⁾) グルコースの希強アルカリ性溶液中における変換反応と分解反応 その I²⁾

小泉京子, 橋本敬子, 御手洗ミヤ子, 沢田智加
武庫川女子大学薬学部³⁾

Studies on Transformations of Carbohydrates. II.¹⁾ Epimerization and Degradation of Glucose in Diluted Strong Alkaline Solution. (I)²⁾

KYOKO KOIZUMI, KEIKO HASHIMOTO, MIYAKO MITARAI and CHIKA SAWADA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University³⁾

(Received August 27, 1973)

In diluted NaOH solution at 30°, glucose epimerized to fructose and mannose, and degraded to arabinose. Small amounts of ribulose, ribose and erythrose were also found in the degradation products. The degradation was affected by the concentration and volume of NaOH solution. When 2 mg of glucose was dissolved in 40 ml of 0.25 N NaOH, the yield of arabinose reached the maximum. Purity of the reaction solvent (water) had an effect on the yield of arabinose and therefore it was assumed that there were some catalyses by trace amounts of unidentified substance in water on the degradation. When Ba(OH)₂ solution was used in place of NaOH solution, glucose was rather decomposed to non-carbohydrates.

Utilization of the metabolic degradation of hexoses by commercial baker's yeast made a quantitative analysis of arabinose on the liquid chromatogram possible. Quantitation was accomplished by integrating the area under the peak using the height-width method, and it was found that 3.7% of glucose in 0.25 N NaOH solution degraded to arabinose after 27 hr.

Autoradiogram of the transformation products from ¹⁴C-labeled glucose in 0.25 N NaOH solution indicated that the carbon in 1-position was split off to give arabinose.

前報¹⁾で糖類の希硫酸または希塩酸中における変換反応と分解反応について述べたが、そのとき、これら酸類の中和に用いるアルカリ類の影響についても少し触れた。すなわち、アルカリが少過剰になって pH が 11 位まで上ったときはグルコースからフルクトースとマンノースがわずかに生成する程度であったが、強アルカリ性の状態で糖類を放置した場合は、The Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Transformation⁴⁾ が起り、グルコースから相当量のフルクトースとマンノースが生成するのみならず、炭素数の 1 つ少ないアラビノースの生成が見られた。この減成反応は希強酸水溶液中でもわずかに認められたものであるが、アルカリ性溶液中ではさらに顕著であるため、この反応の解明を主目的として今回はグルコースの希強アルカリ水溶液中における変換反応と分解反応について調べた。

1. 水酸化ナトリウム水溶液中におけるグルコースの Transformation

まずグルコースを 0.25 N 水酸化ナトリウム水溶液中、30° で一定時間放置した後イオン交換樹脂を用いて中和し、減圧下蒸発乾固して得た反応生成物をホウ酸緩衝液に溶かして液体クロマトグラフィーを行なうと、Fig. 1 のようなクロマトグラムが得られた。ここでピーク 2 はマンノース、3 はフルクトース、4 はアラビノース、5 はグルコースに一致する。ピーク 1 はリボースまたはエリスロースに一致し、グルコースと水酸化ナトリウムと

1) 第 1 報：小泉京子，橋本敬子，薬誌，92，1133 (1972)。

2) 1 部は日本薬学会近畿支部第 20 回総会，神戸，1970 年 11 月で発表。

3) Location: 4-16, Edagawa-cho, Nishinomiya-city, Hyogo, 663, Japan.

4) J.C. Speck, Jr., "Advances in Carbohydrate Chemistry," Vol. 13, Academic Press, New York and London, 1958, pp. 63-103.

の反応の経時変化を調べると、ピーク 1 はピーク 4 の増減にしたがってほぼ並行的に増減することがわかった。最初ピーク 1 はアラビノースから epimerization により生じたリボースであろうと考えていたが、アラビノースを同じ条件下で水酸化ナトリウムと反応させても、リボースは予期に反して非常に少量しか生成されなかった。しかしこれはこの条件下でグルコースからマンノースの生成量が比較的少ないことを考えあわせると、当然のことかもしれない。そこでピーク 1 はアラビノースからさらに炭素数 1 つが減少したエリスロースではないかと考え、リボースとエリスロースが分離する液体クロマトグラフィーの条件を検討した。ホウ酸緩衝液の濃度と pH をいろいろ変化させてクロマトグラフィーを行なった結果、pH 8.5 の 0.15M ホウ酸緩衝液でリボースとエリスロースの retention time に 10 分の差をつけることができ、上記の反応で生成するくらいの量ならば両者の区別がつけられることを確かめた。(Fig. 1 のクロマトグラフィー条件下では両者の retention time の差は 1 分である) この条件下で液体クロマトグラフィーを行なった結果、ピーク 1 は主にエリスロースであることが判明したが、経時変化を調べるとリボースもわずかに生成しているのが見られた。またこの経時変化調査の際、フルクトースの量は最初急激に増加し、5—7 時間で最高値に達したのち減少の一途をたどり、48 時間後には非常に少なくなるが、その頃からピーク 3 と 4 の間にリブロースのピーク (retention time 150 分) が認められ始めた。フルクトース、リブロースとアラビノースの三者のピークが完全に分離するような液体クロマトグラフィーの条件は見つからなかった。以上の結果を総合すると、グルコースと希水酸化ナトリウム溶液との反応による単糖類間の変換過程は Chart 1 のように考えられる。なおペーパークロマトグラフィーによるこの反応の経時変化の追跡も試みたが、エリスロースおよびリブロースはアニリン水素フタレート (アルドース用) および α -ナフトールリン酸 (ケトース用) に対する感度が非常に低いためペーパークロマトグラム上では検出することができず、液体クロマトグラフィーで得られた以上の知見を得ることはできなかった。

Fig. 1 Liquid Chromatographic Separation of Transformation Products from Glucose in 0.25N NaOH aq. at 30° for 21 hr

model: JLC-6AH
stationary phase: LC-R-3
mobile phase:
borate buffer
1st. buffer pH 9.0 (0.25M)
2nd. buffer pH 9.6 (0.35M)
buffer change time 210 min
flow rate: 0.51 ml/min
reagent: orcinol/conc. H_2SO_4
column: size $0.8\phi \times 15$ cm, temp. 50°
wave length: 426 m μ ($\times 1$, ... $\times 10$)

Chart 1. Transformation of Glucose in Diluted NaOH Solution at 30°

2. Epimerization と Degradation に影響を与えている因子

これら変換反応と減成反応は微妙な条件の違いで相当変動し、特にアラビノースおよびエリスロースの生成量の変化は著しい。そのため、これらの反応に影響を与えている因子についての検索を行なった。

まず使用する水酸化ナトリウムの濃度と容量の影響であるが、グルコース 2 mg に対して 0.25N 水酸化ナトリウム 10 ml, 20 ml, 40 ml, 0.5N 水酸化ナトリウム 10 ml, 20 ml という比率の溶液を調製し、それぞれ一定温度 (30°) で反応させて経時変化を調べた。各糖の量的な判断はすべて液体クロマトグラム上の吸光度の大きさで行なったが、それによるとグルコースの減少速度は 0.5N 水酸化ナトリウム使用時の方が早く、半減する時間は 0.25N の時が 9—11 時間に対し 0.5N の時は 7 時間であった。フルクトースへの変換速度はいずれの場合も大差なく 5—7 時間で最高値に達するが、フルクトースの生成量は 0.25N 水酸化ナトリウム使用時の方がいくらか (約 1.25 倍) 多かった。マンノースへの変換速度はフルクトースへのそれに比べておそく、いずれの場合も 21

時間ぐらいで最高値に達するが、その生成量はフルクトースに比べてはるかに少なかった。またその量は水酸化ナトリウムの濃度および量により大差はないが、0.5Nのもの20mlを使用した時だけ他に比べて低かった。アラビノースの生成量が最高に達する時間はいずれの場合も30時間前後であるが、その生成量には大きな差があり、0.25N 40mlを用いた時が最高で、以下0.25N 20ml, 0.5N 10ml, 0.5N 20ml, 0.25N 10mlの順となっていた。最高と最低を比べると約20倍の差があった。エリスロース生成の状況はアラビノースのそれにほぼ並行していた。総合的にみると、アルカリの濃度が高くなるとグルコースの糖以外のものへの分解速度がまし、またアルカリの絶対量が少なすぎても目的の減成反応がおこりにくくなるという結論に達する。この結果から、水酸化ナトリウムはグルコース2mgに対して0.25N濃度のもの40mlを使用することにした。

つぎに水酸化ナトリウムを水酸化バリウムに換えた場合の影響を調べた。その結果は、同濃度、同容量のアルカリを用いても後者の場合はグルコースの減少速度が非常に早く、またグルコースからフルクトースおよびマンノースへの変換量ははるかに少なく、アラビノースおよびエリスロースの生成量もずっと少なくなっていた。すなわち、水酸化バリウムは水酸化ナトリウムに比べて、糖類に対する分解力が強いということがわかった。

以上の実験中、同じ条件で試みても時としてアラビノースおよびエリスロースの生成量に大きな変化がみられることがあった。そのため何か微量成分がこの減成反応の触媒をしているのではないかと考え、用いる水酸化ナトリウムを製造会社、ロット、級などの点でいろいろ換えてみたが、大きな変化は認められなかった。そこで反応に用いる水について調べてみた。すなわち、水酸化ナトリウムを水に溶かして0.25N水溶液を造る場合に、(A) 脱塩蒸留水、(B) 脱塩水 ($500 \times 10^4 \Omega \cdot \text{cm}$)、(C) 脱塩水 ($250-300 \times 10^4 \Omega \cdot \text{cm}$)、(D) ろ過水の4種の水を用い、それぞれ調製したアルカリ水溶液にグルコースを溶かして経時変化を比べた。その結果、グルコース、フルクトースの消長はいずれの場合にも大差なく、マンノースの量が最高に達する時間およびその時のマンノースの量が、(D)の場合だけ他の時とわずかに異なり幾分か量も少なく時間も遅かっただけで、ヘキソース類のepimerizationに関する限り水の精製度の影響はほとんど認められなかった。しかしアラビノースおよびエリスロースの生成量には大きな差がみられ、(A)の場合のアラビノースの生成量を1とすると(B)は約2、(C)は2.8、(D)は0.6となり、エリスロースの量はこれと並行して増減していた。このことはこの減成反応にはやはり微量成分の触媒作用があることを示唆し、高度に精製された脱塩蒸留水よりも脱塩水、それも少し純度の悪い脱塩水の方が適しているということを示した。しかし一方、水道水を精密ろ過機でろ過しただけの水では反対に減成反応を抑制する作用が出てくることから、どのようなものがこの減成反応に関与しているのか、反応機構の解明にも関係があるので今後さらに詳細な研究を続けたい。なおこれに関連して微量金属イオンの影響もペーパークロマトグラフィーを用いて試験的に調べ、明らかにアラビノースの生成量を増大させる金属イオンがあることも確かめたが、詳細は次報に譲る。

3. アラビノースの定量

減成反応で生成されるアラビノース、エリスロース、リボースおよびリブローースのうち、グルコースから最初に生ずるものと考えられ、当然その量ももっとも多いアラビノースの定量を試みた。化学的な方法では分別定量の不可能な数種の単糖類混合物中のアラビノースを定量するためには、まず各糖間の分離を行わなければならない。そこで陰イオン交換樹脂(ホウ酸型)を用いる液体クロマトグラフィーで条件をいろいろ変えて分離を試みたが、その構造上の類似性からもフルクトースとの完全分離は不可能であろうという結論に達した。それで生化学的な方法の導入を検討し、酵母を用いてヘキソース、特にフルクトースを代謝分解させてしまい、残ったアラビノースを液体クロマトグラム上のピーク面積を用いて定量する方法を考案した。

定量法 糖検液3mlをホールピペットでとり(水酸化ナトリウムとの反応生成物の場合は中和後ろ過し、ろ液、洗液を合して減圧下40°以下で蒸発乾固した残渣にホールピペットで脱塩蒸留水3mlを加える)、市販生パン酵母を用いて調製した酵母懸濁液1mlを加え、30°で一定時間振盪培養する。遠心分離後上澄液3mlを正確にとり、減圧下蒸発乾固、残渣にホウ酸緩衝液2mlを加えて溶かし、液体クロマトグラフィーを行なう。フルクトースが完全に分解される条件下では、アラビノースのピークは完全に独立した左右対称の釣鐘型ピークとなるから、半値幅法でその面積を計算し検量線からアラビノースの量を求める。

定量条件の調査 (1) 酵母の使用量——酵母懸濁液中に含まれる酵母の量が多すぎるとヘキソース類は完全に分解するが、アラビノース、エリスロースなど代謝に関係のない単糖類も吸着による損失が大きくなる。一方、

少なすぎるとヘキソース類の分解が不完全になる。そこでグルコース、フルクトース、アラビノース、エリスロースの適当量を含む検液 3 ml に含有酵母量を種々に変化させた酵母懸濁液 1 ml を加え、30° で 20 時間反応させ、先述の如く処理して液体クロマトグラフィーで酵母の至適使用量を検討した。その結果、ヘキソース総量 3 mg に対し酵母は乾燥重量で 2 mg あれば完全に分解は完了するが、酵母が 1 mg になるとフルクトースがわずかに残る。また酵母の量を 7 mg くらいまであげても吸着誤差⁵⁾ はほとんど同じであるが、それより酵母量をふやして行くと吸着によるアラビノースなどの損失がふえて行く、ということが判明した。そこで酵母は 1 ml 中に乾燥重量で 5 mg を含む懸濁液を使用することにした。

(2) 培養時間——グルコース、フルクトース、アラビノース、エリスロースを含む検液 3 ml に酵母懸濁液 1 ml を加えた試料数本を造り、30° で振盪培養、一定時間ごとに一本ずつを取り出し、前記のように処理して液体クロマトグラフィーを行ない、培養に必要十分な時間を調べた。その結果、グルコースは 8 時間目にはすでにきわめて微量が残っているだけになるが、フルクトースは 10 時間目にもまだ少し残っていた。しかしその量はアラビノースのピークに影響を与えるほどではなく、半値幅法でその時のアラビノースのピーク面積を求めると、フルクトースが完全に消失する 12 時間目よりあとのピーク面積と変わらず、またその後 20 時間目まで経時変化をみたが、ピーク面積は誤差の範囲内で一定であった。この実験から培養時間は最低 10 時間で、それ以上 20 時間までの間ならば何時間で止めてもよいということがわかった。なお別の実験でマンノースはフルクトースよりもさらに代謝分解に時間がかかり、上記の条件で培養するとわずかに残ることがあるということが判明したが、アラビノースの定量には全く影響をおよぼさないため、マンノースの分解条件は考慮しなかった。

(3) 酵母代謝産物の液体クロマトグラム——代謝産物のピークが液体クロマトグラム上に現われ、アラビノースの定量を妨害しないかという点について検討した。グルコース、フルクトースおよびマンノースをそれぞれ単独または混合状態で酵母と反応させたものを前述の如く処理して液体クロマトグラフィーを行なったところ、展開条件 A⁶⁾ ではどの場合にも retention time 37 分、61 分、83 分にそれぞれ 1 つずつ計 3 つの非常に小さなピークが現われるのみで、アラビノースの retention time 160 分のあたりは完全に base line に一致していた。また展開条件 B⁶⁾ では早い時間 (35 分と 86 分) に 2 つの小さなピークが現われるほかに、アラビノースのピーク (retention time 240 分) の少しうしろ (270 分) にも小さなピークが 1 つ現われるが、これもアラビノースの定量には支障をきたさなかった。しかしエリスロースの場合は、retention time が比較的短いために展開条件 A ではもちろん、B にして retention time を遅らせてもいくらかの不純物またはグルコースからの減成反応により生じるとされる未知物質のピークと重なり、その上 100% 純粋なエリスロースの標準品が得られないということも手伝って、今の段階では定量は無理であるという結論に達した。なお酵母を脱塩蒸留水に作用させた空試験では、液体クロマトグラム上に全くピークは現われなかった。

(4) 酵母の保存性——市販生パン酵母は固型のままでは冷蔵庫内で 1 週間ぐらい保存できるとされているが、それ以上たつと自己融解を起して使用に耐えなくなる。しかし新しい生パン酵母を脱塩蒸留水でよく洗浄した後適当な濃度に調製した懸濁液は、冷蔵庫内で相当長期間の保存に耐え、特に使用濃度の 4—5 倍ぐらい濃厚な懸濁液の状態で保存し、使用時に 5 mg/ml になるように希釈して用いると、5 ヶ月以上保存したものでも新しい酵母から調製したばかりの懸濁液と全く同じ効力を示した。

検量線の作成 定量しようとしているアラビノース試料とできるだけ同じ条件下で検量線を作成するため、アラビノースの標準液にグルコースおよびフルクトースを適当量加えた検液を調製し、それぞれ酵母を作用させた後液体クロマトグラフィーを行ない、半値幅法でアラビノースのピーク面積を求めて Fig. 2 の検量線を得た。この場合各アラビノース濃度に対応する点は、それぞれ共存するグルコースおよびフルクトース量の異なる 3 つの検液から得た値の平均値であるが、アラビノースのピーク面積は共存するグルコースおよびフルクトースの量には全く無関係で、3 つの値のパラッキは最大の場合で平均値 $\pm 3.6\%$ であった。

グルコースより減成反応により生じるアラビノースの量

脱塩水 ($500 \times 10^4 \Omega \cdot \text{cm}$) を用いて調製した 0.25N 水酸化ナトリウム溶液中でグルコースから生成されるアラビ

5) 酵母を加えると吸着によるアラビノースのわずかな損失はまぬがれ得ないが、同じ条件下で検量線を作成しておくことにより、この誤差は相殺される。

6) 実験の部参照。

Fig. 2 Calibration Curve of Arabinose

H: height (absorbance at 426 mμ)
W: width (at half height)

研究を進める予定である。なおこの減成反応で失われる炭素は構造上の関連性から予想される通り、グルコースの1位の炭素であるということは前報と同じくアイソトープ標識化合物を用いた実験で確認した。すなわちグルコース-1-¹⁴C, グルコース-6-¹⁴C およびグルコース-¹⁴C-(u) と 0.25N 水酸化ナトリウムとの反応物のオートラジオグラフィーを行なった結果、後2者を用いた場合はアラビノースのスポットを認めたが、グルコース-1-¹⁴C を用いた場合はそれが認められなかった。

実験の部

試薬 NaOH および Ba(OH)₂ は試薬特級、中和には Amberlite IR 120 (H 型) を用いた。クロマトグラフィーの呈色試薬はすべて試薬特級、特に液体クロマトグラフィーの呈色試薬に用いる conc. H₂SO₄ は、特級品中にも不適格品があるのでロットごとに調べて用いた。展開溶媒もすべて試薬特級または精製したもの。オートラジオグラフィーに用いたフィルムはサクラ X 線フィルム (RR 型)、現像液は富士レンドール、定着液は富士レンフィックス。

装置 30° の恒温反応には大洋科学工業株式会社製恒温振盪装置 M-1 型、緩衝液調製には日立-堀場 pH マーター F-7 型、液体クロマトグラフィーには日本電子株式会社製 JLC-6AH 全自動アミノ酸分析機を糖分析用に改造したものを使用。アラビノース定量時の酵母との反応には石山科学製高速試験管振盪培養器を用い、遠心分離には佐久間製作所製角度型遠心機 (R.P.M. 3500) を用いた。

糖類試料 グルコース、フルクトース、マンノース、アラビノース、リボース、リブロース、エリスロースはすべて市販品。ペーパークロマトグラム上いずれも単一スポットを与えることを確かめて使用。用いた液体クロマトグラフィーの条件下では、エリスロースが濃度に応じて一定のきわめて小さな不純物ピークを示すほかはすべて単一のピークを与えた。文献⁷⁾によればこの種の液体クロマトグラフィーに用いられるアルカリ性条件下で、epimerization が起る場合があると報告されているが、この実験で用いた条件 (最高 pH 9.6) では、少なくともクロマトグラム上で最高感度においても検出されるほどの epimerization は起っていなかった。アイソトープ標識化合物、グルコース-1-¹⁴C, グルコース-6-¹⁴C, グルコース-¹⁴C-(u) はそれぞれ比放射能が 33.8 mCi/m mole, 57.3 mCi/m mole, 335 mCi/m mole のものを日本放射性同位元素協会から購入、100 mμCi/40 μl の濃度まで希釈してオートラジオグラフィーで純度を確かめたうえ、この濃度で使用。

希強アルカリ水溶液中におけるグルコースの経時変化の測定 グルコース約 2 mg を正確に含む一定容量の

ノースの量の経時変化を測定した。その結果 1000 μg のグルコースから1時間目に 3.1 μg, 9時間目に 12 μg, 13時間目に 15 μg とアラビノースの量はふえて行くが、15時間では 8 μg, 17時間では 5 μg と一度減り、19時間で 28 μg, その後 20 μg 以上を保ちながら 27時間目で最高の 31 μg になり、その後はまた減少して行く。ただし最初に一度値が大きくなった13時間目あたりはピークの高さに比して半値幅が大きすぎることから、リブロースのピークが重なっていると思われる。38時間目以後になると、アラビノースとリブロースの量的関係から2つのピークは先端が別れてくるので、リブロースの存在が明確になってくる。高さと半値幅の関係から見て、最高値に達した27時間目のピークにはリブロースの影響は少ないようにみうけられるが、この時の値 31 μg はグルコースとアラビノースの分子量の差を考慮すると、元のグルコースの 3.7% がアラビノースに変ったことになる。

以上、グルコースの希強アルカリ、特に希水酸化ナトリウム水溶液中における transformation, 中でも減成反応によるアラビノースの生成に注目して実験を行ってきたが、この反応の触媒、反応機構などについてさらに

7) L. Hough, J.V.S. Jones, P. Wusteman, *Carbohydr. Res.*, **21**, 9 (1972).

水酸化ナトリウムまたは水酸化バリウム水溶液を1回の実験につき20本前後調製しておき、30°の恒温槽中に開放状態で放置、0時間から72時間までの間の適当な時間に1本ずつとり出し、直ちにAmberlite IR 120(H⁺)で中和して反応を止めた後ガラスフィルターを用いて吸引濾過。濾液と洗液を合して減圧下40°以下で蒸発乾固。残渣を微量の水に溶かしてペーパークロマトグラフィーを行なうかまたは、sample solvent (0.15M ホウ酸緩衝液 pH 8.0) 2 ml を正確に加えて溶かし液体クロマトグラフィーを行なう。グルコース 2 mg に対して液量が 10 ml および 20 ml の場合は、それぞれ全検液を一つにしておき一定時間ごとに 10 ml または 20 ml ずつホールピペットでとり出した後、上記のように処理する方法も試み、この場合は振盪して空気との接触をうながす試みも加えたが、いずれの場合もアラビノースおよびエリスロースの生成量は比較的少ないようであった。

クロマトグラフィーの条件 a) ペーパークロマトグラフィー——東洋濾紙 No 50, 20×20 cm を使用、酢酸エチル：ピリジン：水 (2:1:2) で3回多重展開を行なった。アルドースの発色にはアニリン水素フタレート⁸⁾を、ケトースの発色には 1% α-ナフトール-エタノール溶液 50 ml にリン酸 5 ml を混和した液⁹⁾を用いた。

b) 液体クロマトグラフィー——(1) カラム：強塩基性陰イオン交換樹脂 LC-R3 (ホウ酸型) を使用、サイズは 0.8φ×15 cm, (2) 展開条件 A: 第1緩衝液として pH 9.0 (0.25M) ホウ酸緩衝液¹⁾, 第2緩衝液として pH 9.6 (0.35M) ホウ酸緩衝液を用い両者とも 210 分ずつ流す。B: 第1, pH 8.5 (0.15M), 第2, pH 9.0 (0.25M), 第3, pH 9.6 (0.35M) の各ホウ酸緩衝液を用い、第1は 120 分間、第2は 150 分間、第3は 180 分間流す。流速は 0.51 ml/min. カラム温度は 50°。なおアラビノースの定量実験ではグルコースが存在しないので、条件 A を用いる場合は第2緩衝液による展開時間は 10 分に短縮、条件 B を用いる場合は第3緩衝液による展開を省いた。(3) 検出法：オルシノール硫酸溶液¹⁾を用い 426 mμ で吸光度を測定する。反応槽温度は 95°。

反応に用いる水 (1) 脱塩水 (500×10⁴Ω·cm)——オルガノ式純水製造装置 MA 3 型を用いて水道水を脱塩し、比抵抗が 500×10⁴Ω·cm 以上となったもの。

(2) 脱塩水 (250—300×10⁴Ω·cm)——上記装置を用いて脱塩を行なった水であるが、イオン交換樹脂の活性がおちて完全に脱塩しきれず、比抵抗が 250—300×10⁴Ω·cm に下がっていたもの。

(3) 脱塩蒸留水——上記の脱塩水 (500×10⁴Ω·cm) をヤマト科学株式会社製 auto still model WAG-24 を用いて蒸留したもの。

(4) ろ過水——水道水を日本濾水機工業株式会社製精密濾過機を通してろ過したもの。

アラビノースの定量 (1) 酵母懸濁液の調製——市販生パン酵母約 5 g をとり、脱塩蒸留水中に懸濁させてよく攪拌したのち遠心分離 (3000 rpm, 10 min), 上澄液を捨て再び上の操作をくり返す。数回この方法をくり返し、最後に脱塩蒸留水 50 ml に懸濁させる。恒量乾燥しておいた秤量ビン中にこの均一な懸濁液 1 ml をホールピペットでとり、80—90°のオーブン中に一夜放置して乾燥したのち重量を量り、懸濁液 1 ml 中の酵母の乾燥重量を求めておく。(通常 20 mg/ml 前後となる) この貯蔵用懸濁液は使用時に 5 mg/ml まで希釈して用いる。

(2) 糖検液——脱塩蒸留水 3 ml 中にそれぞれつぎに示す量のグルコースとフルクトースを含む検液を調製。i) グルコース 2.0 mg, フルクトース 1.0 mg, ii) グルコース 1.5 mg, フルクトース 1.5 mg, iii) グルコース 1.0 mg, フルクトース 2.0 mg. 条件調査の場合にはこれらの検液にさらにアラビノース 0.05 mg, エリスロース 0.09 mg¹⁰⁾が含まれるようにしたものを用いた。検量線作成の場合にはアラビノースの標準液 (0.00335 mg/ml から 0.0402 mg/ml まで 7 段階) を各濃度につき 3 本ずつ用意し、その中にそれぞれ上記の割合でグルコースとフルクトースが含まれるように調製。

オートラジオグラフィーによる脱離炭素位置の確認 グルコース 500 μg とグルコース-1-¹⁴C 500 mμCi を含む 0.25N NaOH 溶液 10 ml を 30°で 24 時間放置、中和、濃縮後、東洋濾紙 No 50 を用いてクロマトグラフィーを行なう。酢酸エチル：30% 酢酸：水 (3:2:4) で 16 回多重展開。¹⁾ 展開済みの濾紙は X 線フィルムに密着させオートラジオグラフィーを行なう。グルコース-6-¹⁴C およびグルコース-¹⁴C-(u) についても同様に行なう。

謝辞 終りにのぞみ、酵母を利用したアラビノースの定量実験にご助言とご便宜をあたえていただいた本学生化学担当の木村行男教授と微生物化学担当の吉田雄三講師、ならびにトレーサー実験にご助言とご指導をいただいた本学放射薬品学担当の磯井廣一郎教授に深謝いたします。

8) S.M. Partidge, *Nature*, **164**, 444 (1949).

9) N. Albon, D. Gross, *Analyst*, **75**, 454 (1950).

10) 純度 100% とした場合の値。実際の純度は 50—70%。