

# STUDOJ PRI LA KARBOHIDRATOJ DE LA SEMO DE *VICIA FABĀ*

## IV Eltrovo de ribozo en hidrolizato de hemichelulozo de faboj

Sin'itirō KAWAMURA, Teiiti NARASAKI, Ryōzo KUSUHARA, kaj Takakatu SAITō

(Laboratorio de Biologia Kemio)

(Ricevita la 28-an de decembro, 1956)

### ENKONDUKO

La faboj<sup>(7)</sup> entenas ĉ. 50 %-ojn da karbohidratoj. Laŭ la analizo de KAWAMURA k. a.<sup>(13)</sup> matura kaj seka senŝeligita fabo (kun 13.93% da akvo) entenis 1.42 %-ojn da kruda fibro kaj 50.11 %-ojn da karbohidratoj laŭ diferenco (t. e. sennitrogena ekstrakto, *nitrogen-free extract*). Faboj entenis ĉ. 1 %-on da reduktaj sukeroj (glukozo kaj fruktozo) kaj ĉ. 4 %-ojn da oligosakaridoj (sakarozo, rafinozo, kaj stakiozo)<sup>(9,17)</sup>. Kiel polisa-karido la ĉefa komponaĵo estas amelo<sup>(15,16)</sup>.

Krom amelo troviĝas ankau hemichelulozoj en la fabo. KAWAMURA kaj NAKAMURA<sup>(12)</sup> apartigis krudan holocelulozon, kiu estas la restaĵo post ekstrakto de sukeroj, amelo, kaj proteinoj. Jam raportitaj analizoj estas redonitaj en Tabelo I.

Tabelo I. Analizoj de fabo kaj ĝia kruda holocelulozo

	Akvo	Kruda proteino	Kruda graso	Sennitrogena ekstrakto	Kruda fibro	Cindro
Fabo senŝeligita <sup>(13)</sup>	13.93	30.00	1.21	50.11	1.42	3.33
Kruda holocelulozo <sup>(12)</sup>	3.46	8.90	0	62.75	22.61	2.28

Tiu kruda holocelulozo entenis 40.50 %-ojn da hemichelulozoj. Kiam ili estis apartigitaj laŭ la metodo de BUSTON<sup>(1)</sup>, troviĝis nur postsigno da hemichelulozo B (precipitebla per aldono de acetono al la filtrato post precipitado de hemichelulozo A per acido) kaj la proporcio inter hemichelulozo A kaj hemichelulozo C (precipitebla per aldono de etanolo al la filtrato post precipitado de hemichelulozo B) estis ĉ. 1:4. Hidrolizato de la kruda holocelulozo montris la ekziston de glukozo, arabinozo, kaj ksilozo per paperkromatografo. Pri galaktozo detala eksperimento ne povis identigi ĝin en la hidrolizato.

La nomenklaturado de hemichelulozoj estas iom komplika<sup>(8)</sup>. Tamen plej ofte uzata<sup>(24)</sup> eble estas ne tiu de BUSTON sed tiu de O'DWYER<sup>(19)</sup>, laŭ kiu hemichelulozo A estas same kiel ĉe BUSTON la hemichelulozo precipitebla per aldono de acido al la alkalia solvaĵo de hemichelulozoj, kaj hemichelulozo B estas tiu precipitebla per aldono de kiu ajn solvanto (etanolo kaj acetono plej multe uzataj) al la filtrato post precipitado de hemichelulozo A.

En ĉi tiu papero la nomenklaturado de O'DWYER estas uzata en la formo de pliposta propono de PREECE<sup>(21)</sup>, laŭ kiu hemichelulozo B povas esti dividita en du partoj B<sub>1</sub> kaj B<sub>2</sub>. Hemichelulozo B<sub>1</sub> estas tiu parto de hemichelulozo B kiu formas kuprokomplekson.

KAWAMURA trovis, ke faboj entenas hemichelulozon B<sub>1</sub> kaj KAWAMURA kaj NARASAKI plu trovis, ke la hidrolizato de hemichelulozo B<sub>1</sub> konsistas el glukozo, galaktozo, ksilozo, kaj ribozo. La trovo de ribozo en la hidrolizato de hemichelulozo estas tute nova. Ĝis nun neniu trovis tian hemichelulozon.

La aŭtoroj raportas ĉi tie detale pri la eksperimentoj koncernantaj la hemichelulozojn de la fabo. La rezultoj estas iom konfliktaj unu la alian. Tamen la aŭtoroj volas skribi ilin unue kronologie laŭ experi-

mentoj de KAWAMURA kaj KUSUHARA (1954-55)<sup>(18)</sup>, KAWAMURA (1955), KAWAMURA kaj SATO (1955-56)<sup>(23)</sup>, kaj NARASAKI (1956), kaj poste diskutos kune.

## EKSPERIMENTOJ

### I. Apartigado de hemicelulozo B<sup>(18)</sup>.

*Provaĵo.* Aerseka fabo (rikolto de 1954), formo "Sanuki-nagasaya", aĉetita ĉe vendejo de semoj, estis senŝeligita kaj pulvorigita. Senŝela pulvoro kiu pasis kribrilon de 40 meŝoj/colo estis la provaĵo de ĉi tiu eksperimento.

*Preparado de kruda holocelulozo.* Al ĉ. 2 kg da senŝeligita pulvorigita fabo 10 L (litroj) da akvo estis aldonitaj por forigi akvosolveblajn substancojn kaj malpurajn. Tiu ekstrakto ripetigis tri fojojn. Due la restaĵo estis ekstraktita per ĉ. 6 L da 0.2 %-a NaOH (natria hidroksido) por forigi solveblajn proteinojn. Tiu ekstraktado estis ripetita unu fojon ĉiutage dum ĉ. unu monato. Komence la klara solvaĵo super la restaĵo estis forigita kaj la sekvanta alkalia estis aldonita. Post kelkaj tagoj ĉe la interŝanĝo de alkalia solvaĵo la restaĵo estis premita per kotonsako. Ĉiun fojon ĉe la interŝanĝo de la alkalia la biuretreakcio estis provita por vidi la ekziston de proteino en la nova ekstraktaĵo per alkalia. Dume unu fojon la restaĵo estis enmetita en elektran miksilon (*mixer*) por detru la ĉelojn de faboj esperante pli rapidan apartigon de proteinoj. La temperaturo de la likvaĵo estis ĉ. 20° C. Post la malapero de la biuretreakcio restantaj solveblaj sukeroj estis apartigitaj per 1.5 volumenoj de 50 %-a etanolo. La miksado estis filtrita per la kribrilo de 100 meŝoj kaj poste per tiu de 200 meŝoj por forigi amelon. La ekstraktaĵo per etanolo estis ripetita ĝis kiam la reakcio de MOLISCH kaj la antronreakcio malaperis.

La restaĵo ankoraŭ entenis amelon. Tial la restaĵo estis varmigita kun akvo por rompi amelgrajnojn. Post gluiĝo (*gelatinization*) Taka-diaŝtazo estis aldonita kaj la amelo estis sukerigita per la metodo de ŌSIMA kaj ITAYA<sup>(20)</sup> tri fojojn. La restaĵo preskaŭ ne montris la jodreakcion. Ĝi estis lavita kvin fojojn per malvarma akvo, due per 95 %-a etanolo kaj per etero. Ĉi tiu preparaĵo estas nomata kruda holocelulozo laŭ KAWAMURA kaj NAKAMURA<sup>(12)</sup>.

*Ekstraktado de hemicelulozoj.* Ĉ. 20 g da kruda holocelulozo estis ekstraktitaj per 500 ml da 5 %-a NaOH sub nitrogeno dum 24 horoj. La restaĵo apartigita de la solvitaj hemicelulozoj estis denove ekstraktita per 5 %-a NaOH. Entute 7 ekstraktadoj estis faritaj. Ĉar la kruda holocelulozo konservita en la desikatoro fariĝis iom tro malmola, ĝi estis miksita en elektra miksilo kun alkalia por faciligi la ekstraktaĵon de hemicelulozoj.

La hemicelulozenhavanta filtrato post 7 ekstraktadoj estis kune centrifugita por klarigi. Malmulte da solidaĵo apartiĝis.

*Apartigo de hemicelulozoj A, B, kaj C (laŭ BUSTON).* Al 3 L da alkalia solvaĵo de hemicelulozoj 350 ml da acetata acido estis aldonitaj ĝis pH 4.6<sup>(12)</sup> por precipiti hemicelulozon A. La stato de precipitiĝo de hemicelulozo B (laŭ O'DWYER) laŭ la aldono de kelkaj solvantoj estas montrita en Tabelo II.

Tabelo II. Precipitiĝo de hemicelulozo B per solvantoj

Solvanto	Volumeno de hemicelulozsolvaĵo, ml	Volumeno de aldonita solvanto, ml	La stato de precipitiĝo
Etanolo	10	10	Komencas precipitiĝi.
		20	Klare precipitiĝas.
Acetono	10	4-5	Komencas precipitiĝi.
		6	Klare precipitiĝas.
Miksado de etanolo kaj acetono (7:3)	10	7	Komencas precipitiĝi.
		8	Klare precipitiĝas.
		10	Pli klare precipitiĝas.
		12	Tre klare precipitiĝas.

Tiel la uzo de la miksaĵo de etanolo kaj acetono estas plej bona. Tamen en ĉi tiu preparado 2 volumenoj da etanolo estis uzataj. Tiu ĉi precipito entenas postsignon da hemicelulozo B (laŭ BUSTON), tamen ĉefe konsistas el hemicelulozo C (laŭ BUSTON)<sup>(12)</sup>. De nun ĝi estas nomata hemicelulozo B (laŭ O'DWYER). La hemicelulozo B centrifugita estis lavita per etanolo kaj due per etero. Ĉ. 5 g estis akiritaj.

2. Sukerkomponaĵo de la hemicelulozo B. (I)<sup>(13)</sup>

*Hidrolizado de la hemicelulozo.* 0.4 g da hemicelulozo B (kun 8.10 % da akvo kaj 4.18 % da cindro) estis hidrolizita per 10 ml da 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfata acido) dum 60 min ĉe 97-9° C. La acidhidrolizato estis neŭtraligita per BaCO<sub>3</sub> (baria karbonato). La likvaĵo post filtrado kaj centrifugado servis kiel la sukero-provaĵo.

*Kvalita analizo de hidrolizato pri sukeroj.* Kvalitaj analizoj montris la ekziston de pentozo (orcinol- kaj floroglucinol-reakcioj) kaj la neekziston de ketozo (rezorcinol- kaj PINOFF-reakcioj).

*Kvanta analizo pri pentozano.* La analizo montris la jenan rezulton: 0.300 g da hemicelulozo B donis 0.0282 g da furfural-floroglucido post TOLLENS-distilado. Tial pentozano = (0.0282 + 0.0052) × 0.8949 = 0.0295 g aŭ 9.83 %. Tio estas egala kun 11.2 % da pentozoj.

*Kvanta analizo pri reduktaj sukeroj.* La analizo montris, ke hemicelulozo B entenis 53.8 %-ojn da reduktaj sukeroj (kiel glukozo) laŭ la metodo de BERTRAND, post hidrolizado per 2 %-a HCl (klorida acido) dum 2.5 horoj.

*Paperkromatografo.* La papero uzita estas filtropapero N-ro 50 de Tōyō (20 cm × 20 cm). La solvent-sistemoj uzitaj estas butanolo-acetata acido-akvo (4:1:1 aŭ 4:1:2) en la unudimensia metodo, kaj kune kun piridino-butanolo-akvo (2:3:1.5) en la dudimensia metodo. Kiel kolorigiloj estis uzitaj acida anilino ftalata kaj anisidinreagento. La hidrolizato mem ne donis loketojn. Tial 2-3-oble koncentrita likvaĵo estis kromatografita kun sukceso. La rezulto montris la ekziston de glukozo kaj arabinozo sed ne de ksilozo.

3. Sukerkomponaĵo de hemicelulozo B. (II) (Eksperimentita de KAWAMURA)

La hemicelulozo B preparita de KUSUHARA (vidu I.) montris la ekziston nur de glukozo kaj arabinozo. Ĝi montris 53.8 %-ojn da redukta sukero (kiel glukozo) kaj 11.2 %-ojn da pentozo. Kvankam la kvanto de tutaj reduktaj sukeroj estas tre malgranda, oni povus diri, ke ĉi tiu hemicelulozo entenas 42.6 %-ojn da glukozo kaj 11.2 %-ojn da arabinozo, se la redukta povo de ambaŭ sukeroj estas konsiderata sama.

Nun, kiel KAWAMURA *et al.*<sup>(10)</sup> raportis, oni povas determini pentozon kaj heksozon kolorimetre laŭ la metodo de DRURY<sup>(9)</sup>.

Laŭ DRURY glukozo kaj pentozo agas malsame en la orcinolreakcio laŭ certaj kondiĉoj kaj la kolorimetraj legadoj ĉe du ondolongoj donas la kvantojn de ambaŭ sukeroj. Pri la detalo de mezur- kaj kalkul-metodoj vidu la paperojn nun cititajn<sup>(9,10)</sup>. Nur la ondolongoj de la du mezurpunktoj estas iom diferencaj. Kiel la ruĝa filtrilo 620 m $\mu$  estis uzata anstataŭ 660 m $\mu$ , kaj kiel la verda filtrilo 530 m $\mu$  estis uzata anstataŭ 540 m $\mu$ . La kolorimetro uzita estas fotoclektra kolorimetro de Itō Tyōtanpa Kenkyūsyō, Tokyo, anstataŭ la kolorimetro de PULFRICH.

*Kalibradoj de glukozo kaj arabinozo.* Vidu Tabelojn III kaj IV pri la kalibradoj de la puraj sukeroj. Kiel la ratioj por puraj sukeroj ne la aritmetikaj mezombroj, sed mezaj valoroj (*median values*)<sup>(2)</sup> estis elektitaj

Tabelo III. Kalibrado de glukozo

	Eksp. 1		Eksp. 2		
	70	100	100	200	300
Glukozo, $\gamma$	0.018	0.065	0.060	0.137	0.376
<i>r</i> (ruĝa)	0.018	0.086	0.084	0.194	0.418
<i>v</i> (verda)	1.00	0.637	0.714	0.706	0.899
<i>v/r</i>					

Tabelo IV. Kalibrado de arabinozo

	Eksp. 1		Eksp. 2		
	50	100	20	40	60
Arabinozo, $\gamma$	0.705	1.38	0.298	0.622	0.990
<i>r</i> (ruĝa)	0.226	0.530	0.088	0.198	0.315
<i>v</i> (verda)	0.321	0.384	0.295	0.319	0.317
<i>v/r</i>					

jene:  $(r/v)_g = 0.714$  kaj  $(v/r)_a = 0.319$ , kie la sufiksoj g kaj a eatas por glukozo kaj arabinozo, respektive.

Kolorimetrado de la hidrolizato de hemicelulozo B. Vidu Tabelon V pri la rezultoj, kie R kaj V estas la

Tabelo V. Kolorimetrado de la hidrolizato de hemicelulozo B

Kvanto. γ	100	150	200	Meznombro
R (ruĝa)	0.195	0.302	0.400	
V (verda)	0.104	0.155	0.220	
Glukozo, %	56.3	52.7	62.1	57.0
Arabinozo, %	11.0	10.6	10.1	10.6

valoroj de kolorimetro pri la provaĵo (hidrolizato de hemicelulozo B) per ruĝa kaj verda filtriloj, respektive. Oni povas kalkuli jene:

$$V_g = [(v/r)_a \cdot R - V] / [(v/r)_a \cdot (r/v)_g - 1],$$

kaj plu kalkulas la kvanton de sukeroj laŭ kalibraj koeficientoj ĵus akiritaj.

Tiel la rezulto montras, ke la hidrolizato de ĉi tiu hemicelulozo B entenas 57.0 %-ojn da glukozo kaj 10.6 %-ojn da arabinozo, aŭ entute 67.7 %-ojn da sukeroj.

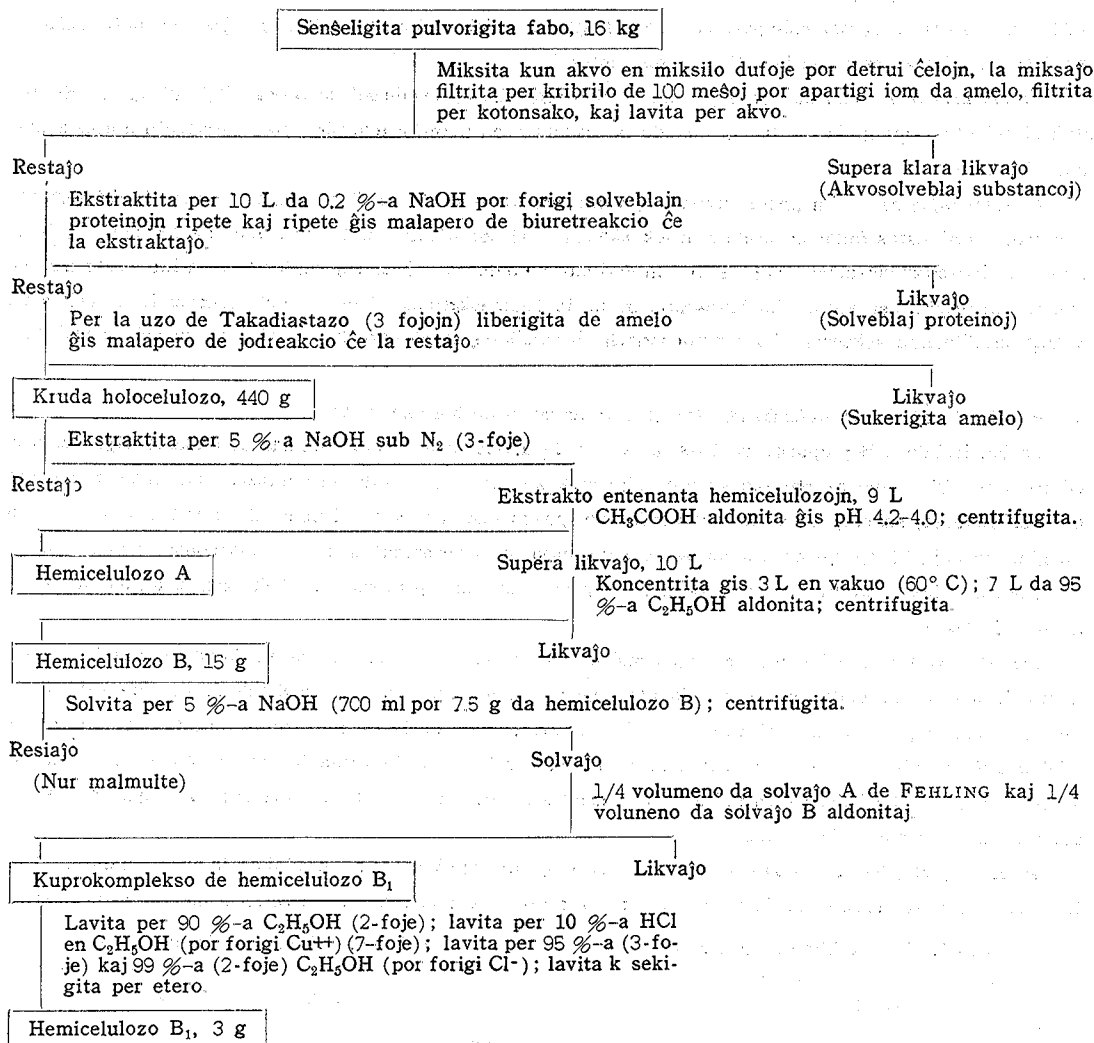


Fig. I. Procedo de preparado de hemicelulozo B<sub>1</sub> el faboj.

4. Apartigado de hemicelulozo B<sub>1</sub>.

SAIŝO<sup>(23)</sup> preparis hemicelulozon B<sub>1</sub> el maturaj senŝeligitaj faboj. Nun la formo de fabo ne estis "Sanukinagasaya" sed "Nagasaya". La fakto de formado de kuprokomplekso de certa parto de hemicelulozoj de fabo estis trovita de KAWAMURA, kiu eksperimentis simile kiel pri soj-hemicelulozo solvebla en varma akvo<sup>(11)</sup>.

La procedo de preparado estas tute simila kiel antaŭe kaj esence estas kombinaĵo de la procedoj jam skribitaj<sup>(11,12,18)</sup>. Vidu Figuron I por sekvi la procedon.

La kvanto de hemicelulozo B<sub>1</sub> (I) preparita per unufoja formado de kuprokomplekso estis 2.7 g el 7.5 g da hemicelulozo B. I montris fandiĝpunkton 250-1° C (?). La kvanto de hemicelulozo B<sub>1</sub> (II) preparita post dufoja formado de kuprokomplekso estis nur 0.3 g el 7.5 g da hemicelulozo B. II montris fandiĝpunkton 279-80° C (?). Tio ĉi montras ke la purigado per duafoja formado de kuprokomplekso estas necesa kaj ŝajne efika.

NARASAKI purigis la preparaĵon I de SAIŝO tute simile kiel antaŭe. Al 2.2 g da preparaĵo I 100 ml da 5 %-a NaOH estis aldonitaj. Al la solvaĵo 50 ml da FEHLING-solvaĵoj (A kaj B) estis aldonitaj kaj la kuprokomplekso formita. Tiel purigita hemicelulozo B<sub>1</sub> pezis 1.8 g. Ĉi tiu preparaĵo montris la fandiĝpunkton 230-50° C (malkombinado). NARASAKI trovis, ke ankaŭ la fandiĝpunkto de preparaĵo II de SAIŝO estis tute sama (230-50°).

5. Acidhidrolizo de la hemicelulozo B<sub>1</sub>. (NARASAKI)

La miksaĵoj de 10 mg da hemicelulozo B<sub>1</sub> kaj 5 ml da 2 N aŭ 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en provtuboj estis varmigataj kun malvarmigiloj en la bano de bolanta akvo. La tempodaŭro estis fiksita ĉe 0.5, 1, 2, kaj 4 horoj. La hidrolizato estis neŭtraligita per BaCO<sub>3</sub> kaj redukta sukero estis determinita kolorimetre per 3, 5-dinitrosalicilata acido. Figure II montras la rezulton.

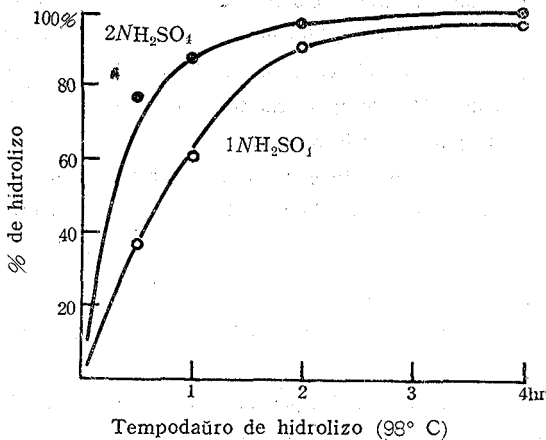


Fig. II. Hidrolizo de hemicelulozo B<sub>1</sub> per H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Kvalita analizo de la hidrolizato montris pozitivan MOLISCH-reakcion (karbhidrato ekzistas), negativajn SELIWANOFF- kaj PINOFF-reakciojn (ketozo ne ekzistas), negativan naftorezorcinol-reakcion (uronata acido ne ekzistas), kaj pozitivajn anilin-, BIAL-, floroglucin-, kaj orcinol-reakciojn (pentozo ekzistas). La provaĵo antaŭ kaj post hidrolizo montris negativajn biuretreakcion (proteino ne ekzistas) kaj jodreakcion (amelo ne ekzistas).

## 6. Paperkromatografio de la hidrolizato. (NARASAKI)

## Preparado de la hidrolizato. (A) Hemicelulozo

B<sub>1</sub> (0.2 g) estis hidrolizita per 20 ml da 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ĉe 98° C dum 1 horo. La miksaĵo post

filtrado enhavis postsignon da nesolvebla solidaĵo (kiu estis solvebla en 5 %-a NaOH kaj montris pozitivan MOLISCH-reakcion sed negativajn biuret- kaj jod-reakciojn). La filtrato estis neŭtraligita per BaCO<sub>3</sub>. Post filtrado la filtrato estis koncentrita ĝis ĉ. 2 ml en vakuo sub 50° C. Kiam 5 volumenoj da etanolo estis aldonitaj, formiĝis iomete da precipitaĵo (kiu estis solvebla en akvo, nesolvebla en 80 %-a etanolo, donis pozitivan MOLISCH-reakcion, kaj estis neredukta). La filtrato estis denove koncentrita ĝis 1.0 ml. Tiu ĉi estas nomata provaĵo A.

(B) Hemicelulozo B<sub>1</sub> (0.2 g) estis hidrolizita per 20 ml da 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ĉe 98° C dum 4 horoj. La filtrato (postsigno da nesolvaĵo troviĝis) estis neŭtraligita per BaCO<sub>3</sub>. La neŭtraligita filtrato estis koncentrita ĝis 2 ml. Nunfoje aldono de 10 ml da etanolo ne formis precipitaĵon. Ĉi tio eble montras la perfektecon de hidrolizado, almenaŭ kompare al la antaŭa hidrolizado (A) (la diferenco estas nur la tempodaŭro, 4 horoj

(B) kontraŭ 1 horo (A)). La hidrolizato estis fine plu koncentrita ĝis 1.0 ml. Tiu ĉi estas nomata provaĵo B.

*Solvantsistemoj uzitaj.* Tri sistemoj estis uzataj: (a) BuOH-AcOH, butanolo-acetata acido-akvo (4:1:2); (b) BuOH-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, butanolo-piridino-akvo (3:1:1.5); kaj (c) PhOH, fenolo-akvo (4:1). Por akiri klaran apartigadon, multobla disvolvado estas ofte aplikata. Ordinare duobla disvolvado sufiĉis pri la solvantsistemoj (a) kaj (b). La sistemo (c) povis apartigi sukerojn sufiĉe laŭ simpla disvolvado.

*Kolorigiloj.* Acida anilino ftalata kaj amoniaka argenta nitrato estis uzitaj. Per anilinreagento metil-pentozo kaj heksozo donis flavbrunan koloron, dum pentozo donis ruĝbrunan koloron.

*Rezultoj.* Unudimensia kaj dudimensia (per (a) kaj (c), kaj per (b) kaj (c)) kromatografadoj estis plenumitaj. Jen estas la valoroj de *R<sub>f</sub>* pri respektivaj solvantsistemoj (Tabeloj VI-VIII).

Tabelo VI. Paperkromatografo per solvant-sistemo (a) BuOH-AcOH

	Puraj sukeroj	Hidrolizato de	
		Provaĵo A	Provaĵo B
Ramnozo	0.57	—	—
Ribozo	0.54	0.55 +	0.55 +
Ksilozo	0.47	0.50 †††	0.48 †††
Arabinozo	0.42	—	—
Glukozo	0.36	0.39 } †††	0.36 } †††
Galaktozo	0.36	0.39 } †††	0.36 } †††
Meza produkto 1(?)	—	0.28 ±	0.27 ±
Meza produkto 2(?)	—	0.18 ±	—

Tabelo VIII. Paperkromatografo per solvant-sistemo (c) PhOH

	Puraj sukeroj	Hidrolizato de	
		provaĵo A	provaĵo B
Ramnozo	0.59	—	—
Ribozo	0.59	0.59 +	0.59 +
Ksilozo	0.43	0.43 †††	0.43 †††
Arabinozo	0.46	—	—
Glukozo	0.35	0.35 } †††	0.37 } †††
Galaktozo	0.41	0.35 } †††	0.37 } †††
Meza produkto 1(?)	—	0.28 ±	0.28 ±
Meza produkto 2(?)	—	0.15 ±	—

Tabelo VII. Paperkromatografo per solvant-sistemo (b) BuOH-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N

	Puraj sukeroj	Hidrolizato de	
		provaĵo A	provaĵo B
Ramnozo	0.65	—	—
Ribozo	0.56	0.54 +	0.56 +
Ksilozo	0.52	0.53 ††	0.53 ††
Arabinozo	0.45	—	—
Glukozo	0.39	0.41 ††	0.40 ††
Galaktozo	0.35	0.35 +	0.35 +

puraj sukeroj estis aldonitaj.

Tiel provaĵoj A kaj B konsistas el ribozo, ksilozo, glukozo, kaj galaktozo. Provaĵo A montras du loketojn kaj provaĵo B montras unu loketon kun malgrandaj *R<sub>f</sub>* valoroj kiuj eble korespondas al mezaj produktoj de hidrolizado. Tiuj loketoj kun malgrandaj *R<sub>f</sub>* valoroj aperis tre maldense 24 horojn post aplikado de la reagentoj.

La rezulto estis plu certigita per la metodo de kromatografado de la provaĵo al kiu koncernantaj

7. *Determinado de sukeroj konsistigantaj la hemicelulozon B<sub>1</sub>.* (NARASAKI)

La hidrolizita provaĵo B (vidu 6.) estis kromatografita du fojojn kaj la kvar sukeroj estis determinitaj laŭ la metodo de SOMOGYI.

Provaĵo B (100 μl, entenanta ĉ 14 mg da sukeroj) estis kromatografita per la solvantsistemo BuOH-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N (2 disvolvadoj) per filtropapero de la grandeco 20 cm×20 cm por apartigi pentozojn (*R<sub>f</sub>* 0.67-0.53) (ribozo kaj ksilozo) kaj heksozojn (*R<sub>f</sub>* 0.48-0.34) (glukozo kaj galaktozo). Du dividitaj partoj de filtropapero kun sukeroj estis ekstraktitaj per 20 ml da akvo ĉe 100° C dum 24 horoj. Determinado de ambaŭ partoj montris la molekulan racion de pentozoj : heksozoj = (39-41) : (59-61).

La parto de pentozoj (10 ml restigita post determinado) estis koncentrita kaj kromatografita per solvant-sistemo PhOH kaj la parto de ribozo (*R<sub>f</sub>* 0.82-0.66) estis apartigita de la parto de ksilozo (*R<sub>f</sub>* 0.63-0.47). Ili montris molekulan racion de ribozo : ksilozo = 1 : 7.1.

La parto de heksozoj ankaŭ estis koncentrita kaj kromatografita per la sistemo BuOH-C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N. La parto de glukozo (*R<sub>f</sub>* 0.56-0.46) kaj tiu de galaktozo (*R<sub>f</sub>* 0.46-0.36) estis dividitaj. Ili donis molekulan racion de glukozo : galaktozo = 3.2 : 1.

Tiamaniere proksima molekula ratio de glukozo : galaktozo : ksilozo : ribozo estis 46 : 14 : 35 : 5.

**DISKUTADO**

Troviĝas kelkaj problemoj en la studo de polisakaridoj tiel komplikaj kiel hemicelulozoj.<sup>(9)</sup> Interalie oni havas problemon kiamaniere prepari hemicelulozojn. Kvanta preparado estas tre malfacila, des pli se oni volas prepari kiel eble plej puran preparaĵon. Sed kio estas pura hemicelulozo? Ordinare oni studas hemicelulozojn dividante ilin per diferenco de la precipitebleco per iuj solvantoj aŭ per diferenco de la solvebleco en kelkaj koncentrecoj de alkalisolvaĵo. La formado de kuprokomplekso ankaŭ estas ofte uzata. La aŭtoroj uzis ĉi tiun metodon kune kun la diferencigo per precipitiĝo per acetata acido kaj etanolo. La preparaĵo nomata hemicelulozo B<sub>1</sub> laŭ PREECE<sup>(21)</sup> devas esti sufiĉe pura por esti studata plu. Tamen la kvanto de ĉi tiu parto estas tre malgranda. Kiel montrita en Tabelo IX, la hemicelulozo B<sub>1</sub> akirita de SATO korespondas nur al 0.02 % de faboj.

Tabelo IX. Kvanta rilato de preparaĵoj

Preparinto	Faboj	Kruda holocelulozo	Hemicelulozo B	Hemicelulozo B <sub>1</sub>
KUSUHARA	g	2 × 10 <sup>8</sup>	20	5
	%	100	1.0	0.25
SATO	g	16 × 10 <sup>8</sup>	440	15
	%	100	2.75	0.094

SATO<sup>(23)</sup> determinis laŭ nova metodo elpensita de KAWAMURA krudan holocelulozon kaj hemicelulozojn kaj la rezulto montris, ke faboj (formo "Nagasaya") entenis 7.05 %-ojn da kruda holocelulozo kaj 3.40 %-ojn da tuta hemicelulozo.

Tial hemicelulozo B<sub>1</sub> apartigita

konsistigas nur  $(0.019/3.40) \times 100 = 0.56$  %-on de la hemicelulozoj de faboj.

La kvanto de hemicelulozo B estas 0.25 % de faboj ĉe la preparaĵo de KUSUHARA kaj 0.094 % de faboj ĉe tiu de SATO. Tiu diferenco eble devenas de nesufiĉa ekstraktado de hemicelulozo per 5 %-a NaOH. Ankaŭ la kvanto de kruda holocelulozo malsamas: 1.0 % ĉe la preparaĵo de KUSUHARA kaj 2.75 % ĉe tiu de SATO. Tiuj diferencoj estas malaltaj kompare al la valoro 7.05 % akirita en determinado.

Oni devas scii, ke hemicelulozoj sufiĉe puraj por esti pristudataj konsistigas nur malmultan parton de tutaj hemicelulozoj.

Nun ni konsideru pri la sukerkomponaĵo de la preparitaj hemicelulozoj. Tabelo X estas la resumo de tiaj studoj. La proporcio donita en Tabelo X estas nur proksima. La valoroj pri hemicelulozo B (de KUSUHARA) estas kalkulitaj tiel ke la sumo fariĝu 100 %.

Tabelo X. Sukerkomponaĵoj de preparaĵoj

Materialo	Preparaĵo	Riboza	Ksilozo	Arabinoza	Glukoza	Galaktoza
Fabo, "Sanuki-nagasaya"	Kruda holocelulozo	+	+	+++	+++ 60%	-
Fabo, "Sanuki-nagasaya"	Hemicelulozo B	-	-	++ 21 aŭ 16%	+++ 79 aŭ 84%	-
Fabo, "Nagasaya"	Hemicelulozo B <sub>1</sub>	+ 5%	+++ 35%	-	+++ 46%	++ 14%

Kruda holocelulozo estas la originala materialo el kiu individuaj hemicelulozoj estas preparitaj. Tial, individuaj preparaĵoj devus montri la saman aŭ partan sukerkomponaĵon kompare al tiu de kruda holocelulozo. Se iu speciala hemicelulozo konsistas el sukeroj A, B, kaj C, kaj alia individua hemicelulozo konsistas el sukeroj A, B, kaj Ĉ, la kruda holocelulozo devus montri la ekziston de sukeroj A, B, C, kaj Ĉ. La kruda holocelulozo eĉ povus enteni la kvinan sukeron D kiel komponaĵon.

Nun la rezulto montrita en Tabelo X estas tre stranga. Se hemicelulozo B<sub>1</sub> ja havas ribozon, kruda holocelulozo devus ĝin montri. Tamen, se la kvanto de ribozo estas malgranda (nur 5 %, kompare al 14-46 % de aliaj sukeroj), kaj ankaŭ la kvanto de la preparaĵo estas malgranda (nur 0.56 % apartigita de la

tutaj hemicelulozoj), povas esti, ke dum preparado tiu speciala hemicelulozo enhavanta ribozon speciale koncentrite prepariĝis kaj pro malgrandeco de la kvanto de ribozo (malpli ol  $5 \times 0.56/100 = 0.028\%$ ), oni ne trovis la ekziston de ribozo en holocelulozo. Ĉu estus malfacile konsideri similan situacion por galaktozo en hemicelulozo B<sub>1</sub>? Eble ne.

La rilato inter la sukerkomponaĵoj de kruda holocelulozo kaj hemicelulozo B estas nature komprenebla. Se ja ekzistas tia hemicelulozo kia estas hemicelulozo B (de KUSUHARA) tiu formas tute novan tipon de polisakarido: araboglukano. WHISTLER<sup>(24)</sup> ne notis tian polisakaridon. Natura polisakarido ofte enhavas arabinozon kaj galaktozon samtempe (ofte kune kun galakturonata acido) aŭ ksilozon kaj glukozon samtempe (ofte kune kun glukuronata acido). Tiu ĉi araboglukano meritas pluan studon.

Estas nova eltrovo, ke parto de hemicelulozo B de faboj formas kuprokomplekson. La "purigita" hemicelulozo B<sub>1</sub> (post dufoja formado de kuprokomplekso) havis tute aliajn sukerojn ol kruda holocelulozo. Oni devus noti, ke la faboj estis aliaj. Tamen ni ne estas certaj, ĉu ni povas klarigi tiun malsamecon nur de la malsameco de la formo de faboj.

Nia hemicelulozo B<sub>1</sub> estas ribogalaktoksiloglukano, tute nova tipo de polisakarido.

Ĝis nun ribozo estas ĝenerale konsiderata kiel pentozo ekzistanta nur en la formo de ribonukleata acido aŭ ribonukleoproteino. Laŭ ekzameno de literaturo nur kvar raportoj troviĝis koncerne al la ekzisto de ribozo en polisakarido.

HIRASE kaj ARAKI<sup>(6)</sup> trovis galaktozon, arabinozon, kaj ribozon en la hidrolizato de araba gumo per paperkromatografo, sed la loketo koresponda al ribozo estis tre malklara. Ili skribis, "Galaktozo kaj arabinozo estas jam konfirmitaj kiel komponaj sukeroj en la literaturo, sed la ekzisto de ribozo ne estas ankoraŭ raportita. Sekve, ni ne povas decidi ĉu la loketo nun eltrovita korespondas al ribozo."

HONMA kaj AKETAGAWA<sup>(6)</sup> studis polisakaridojn de *miso* (Japana fermentita manĝaĵo preparita el sojo kaj rizo). Hidrolizato de la parto, kiu estas nesolvebla en akvo, solvebla en varma akvo, kaj precipitebla per aldono de etanolo al la solvaĵo, montris ekziston de galakturonata acido, glukozo, galaktozo, fruktozo, manozo, arabinozo, ksilozo, ramnozo, ribozo, kaj deoksiribozo per paperkromatografo.

Iom pli frue EASIERBY kaj JONES<sup>(4)</sup> studis la komponaĵon de viskoza substanco (*mucilage*) de linsemo. Ili dividis purigitan sencindran substancon per aldono de kupra acetato. Nesolvebla kuprosalo (45%) konsistis el 8 % da galaktozo, 9 % da arabinozo, 25 % da ksilozo, kaj 13 % da ramnozo. Akvosolvebla parto (55 %) konsistis el 12 % da galaktozo, 12 % da arabinozo, 27 % da ksilozo, 29 % da ramnozo, kaj postsigno da ribozo aŭ fukoza.

ROSENTHAL<sup>(22)</sup> trovis ribozon en la hidrolizatoj de du brazilaj gumoj: la gumo de *catigueira* (*Caesalpinia* sp.) montris la ekziston de arabinozo, ksilozo, ribozo, galaktozo, kaj ramnozo, kaj la gumo de *angico* (*Piptadenia rigida*) montris la ekziston de la antaŭaj kvar sukeroj ĵus menciitaj (t. e. krom ramnozo).

Ni nun plu studas, ĉu vere ekzistas ribozo en hemicelulozo B<sub>1</sub> el fabo.

(Unua duono de ĉi tiu studo, Eksperimentoj 1-3, estis prezentita en la Ĝenerala Kunveno de la Agrikulturkemia Societo de Japanujo ĉe Universitato de Tokyo en la nomoj de KAWAMURA kaj KUSUHARA la 31-an de Marto, 1955. La alia duono, Eksperimentoj 4-7, estis prezentita en la Ĝenerala Kunveno de Kansai kaj Tyūbu Branĉoj de la sama Societo ĉe Ise en la nomoj de KAWAMURA kaj NARASAKI la 19-an de oktobro, 1956. Ĝus eldoniĝis mallonga artikolo en angla lingvo<sup>(14)</sup> koresponda al la dua duono de ĉi tiu papero.)

Ĉe la fino la aŭtoroj esprimas sinceran dankon al D-ro Ziro NIKUNI, profesoro ĉe Osaka Universitato, pro lia dono de pura ribozo.



## SUMMARY

Mature dehulled broad beans contain about 50 % carbohydrates. The chief carbohydrate is starch<sup>(15,16)</sup> (about 40 %). They contain about 1 % reducing sugars (glucose and fructose), about 4 % oligosaccharides (sucrose, raffinose, and stachyose)<sup>(9,17)</sup>, and about 3 % hemicelluloses. Crude holocellulose (containing 40.5 % hemicellulose) showed the presence of glucose, arabinose and xylose<sup>(12)</sup>.

In this paper experiments on the preparation and sugar-composition determination of hemicelluloses are described in detail:

1. Separation of hemicellulose B<sup>(18)</sup>.—Crude holocellulose, i.e. the residue after extraction of sugars, starch, and soluble proteins, from dehulled broad beans (variety "Sanuki-nagasaya"), was extracted with 5 % NaOH under N<sub>2</sub>. Hemicellulose B was obtained by adding 2 volumes of ethanol to the filtrate after precipitation of hemicellulose A with acetic acid.
2. Sugar composition of hemicellulose B. (I)<sup>(18)</sup>.—Hydrolysis with 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 1 hr at 93° C gave 53.9 % reducing sugars. The hydrolyzate contained 11.2 % pentose by the TOLLENS method. Paper chromatography showed the existence of glucose and arabinose, but not of xylose.
3. Sugar composition of hemicellulose B. (II).—Since the hydrolyzate contained only glucose and arabinose the method of DRURY<sup>(3)</sup> as described by KAWAMURA et al.<sup>(10)</sup> was applied. See Tables III-V. The hydrolyzate contained 57.0 % glucose and 10.6 % arabinose by this method.
4. Separation of hemicellulose B<sub>1</sub><sup>(23)</sup>.—See Fig. I. The method was formerly applied to hot-water-soluble hemicellulose of soybeans<sup>(11)</sup>. The formation of copper complex should be repeated to obtain pure preparation.
5. Acid hydrolysis of hemicellulose B<sub>1</sub><sup>(14)</sup>.—Hydrolysis was nearly quantitative by boiling with 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2-4 hrs. See Fig. II.
6. Paper chromatography of the hydrolyzate of hemicellulose B<sub>1</sub><sup>(14)</sup>.—See Tables VI-VIII. The hydrolyzate contained ribose, xylose, glucose, and galactose.
7. Determination of component sugars of hemicellulose B<sub>1</sub><sup>(14)</sup>.—Paper chromatography and reducing sugar determination by the SOMOGYI method showed proximate molar ratio of glucose : galactose : xylose : ribose to be 46 : 14 : 35 : 5.

As shown in Table IX the yields of hemicelluloses were very low. When the preparation is purified intensively, it becomes only a small part of total hemicelluloses. Such a sample is not at all representative one. However, we must obtain some preparation which is sufficiently pure to make further study possible. If such a sample contains a small proportion (5 %) of ribose, the crude holocellulose, containing a very minute proportion of it, may not reveal the existence of the minute constituent by simple and direct examination. This may offer one reason to explain the discrepancy shown in Table X.

Existence of ribose in polysaccharide has not yet been established, probably owing to its low content. Linseed mucilage<sup>(4)</sup>, gum arabic<sup>(5)</sup>, two Brazilian gums (*catigueira* and *angico*)<sup>(22)</sup>, and a polysaccharide fraction of miso (Japanese fermented food made from soybean and rice)<sup>(6)</sup> are examples of polysaccharides containing ribose in the literature. However, identification of ribose was made by no authors yet.

## BIBLIOGRAFIO

- (1) BUSTON, H. W.: *Biochem. J.*, **28**, 1028-37 (1934).
- (2) DEAN, R. B., DIXON, W. J.: *Anal. Chem.*, **23**, 636-8 (1951).
- (3) DRURY, H. F.: *Arch. Biochem.*, **19**, 455 (1949).
- (4) EASTERBY, D. G., JONES, J. K. N.: *Nature*, **165**, 614 (1950).
- (5) HIRASE, S. (平瀬進), ARAKI, C. (荒木長次): *Kyoto Kōgei Sen'i Daigaku Kōgei-Gakubu Kenkyū Hōkoku (Ri-Kō)*, **1**, 19-23 (1952) (japane).
- (6) HONMA, N. (本間伸夫), AKETAGAWA, T. (明田川太七郎): *J. Fermentation Technol.*, **33**, 490-3 (1955) (japane).
- (7) KAWAMURA, S. (川村信一郎): *Tech. Bull. Kagawa Agr. Coll.*, **6**, 8-19 (1954) (japane).
- (8) \_\_\_\_\_: Hemicelulozo, en "Tatōri Kagaku" (多糖類化学) (Kemio de Polisakaridoj), red. de F. EGAMI (江上不二夫), 265-77, Tokyo, Kyōritu Syuppan K. K. (共立出版) (1955) (japane).
- (9) \_\_\_\_\_: Sukeroj de kelkaj japanaj legumenoj. *Sciencaj Studoj* (Internacia Scienca Asocio Esperantista) (1957) (en Esp.).
- (10) \_\_\_\_\_, KOBAYASHI, T. (小林恒夫), ŌSIMA, M. (大島道雄): *Tech. Bull. Kagawa Agr. Coll.*, **6**, 241-2 (1955) (angle).
- (11) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, MINO, M. (三野正浩): *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 67-76 (1955) (angle).
- (12) \_\_\_\_\_, NAKAMURA, H. (中村博): Studoj pri la karbohidratoj de la semo de *Vicia faba*, III, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **28**, 854-8 (1954) (japane kun Esp. resumo).
- (13) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, HORIKE, K. (堀家欣子): Studoj pri la karbohidratoj de la semo de *Vicia faba*, I, *Tech. Bull. Kagawa Agr. Coll.*, **6**, 20-6 (1954) (japane kun Esp. resumo).
- (14) \_\_\_\_\_, NARASAKI, T. (榑崎丁市): *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 239-90 (1956) (angle).
- (15) \_\_\_\_\_, SUZUKI, H. (鈴木裕), MATSUMOTO, T. (松本照代): *Tech. Bull. Kagawa Agr. Coll.*, **7**, 81-6 (1955) (angle).
- (16) \_\_\_\_\_, TUBOI, Y. (壺井好), HUZII, T. (藤井保): *Ibid.*, **7**, 87-92 (1955) (angle).
- (17) \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, NAKAMURA, H.: Studoj pri la karbohidratoj de la semo de *Vicia faba*, II, *Ibid.*, **6**, 27-31 (1954) (japane kun Esp. resumo).
- (18) KUSUHARA, R. (楠原良三): Disertacio, Kagawa Agr. Kolegio (香川農大卒業論文) (1955).
- (19) O'DWYER, M. H.: *Biochem. J.*, **20**, 656 (1926).
- (20) ŌSIMA, K. (大島幸吉), ITAYA, S. (板谷新次): *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **2**, 836-937 (1923) (japane).
- (21) PREECE, J. A.: *Biochem. J.*, **25**, 1304 (1931).
- (22) ROSENTHAL, F. R. T.: *Rev. quim. ind. (Rio de Janeiro)*, **24** (276), 17-9 (1955); *Chem. Abst.*, **50**, 2998 e (1956).
- (23) SATO, T. (佐藤享克): Disertacio, Kagawa Agr. Kolegio (香川農大卒業論文) (1956).
- (24) WHISTLER, R. L., SMARI, C. L.: *Polysaccharide Chemistry*, New York, Academic Press (1953).

## ソラマメの炭水化物の研究

IV ソラマメのヘミセルロース加水  
分解物におけるリボースの存在

川村信一郎, 檜崎丁市, 楠原良三, 佐藤享克

ソラマメにはほぼ50%含まれている炭水化物の中で最も多いのはデンプン<sup>(15,16)</sup> (40%) であるが, 多糖類としてはヘミセルロースも3—4%含まれている。川村, 中村<sup>(12)</sup>は粗ホロセルロース(糖類<sup>(9,17)</sup>, デンプン, 可溶性タンパク質を除いたもの)の構成糖類がグルコース, アラビノース, およびキシロースであること, キシロースは少量であること, 文献にあるガラクトランに相当するものは認められないことなどを報告した。

この粗ホロセルロースにはウロン酸も含まれていない。そこでこの中の大部分を占めるヘミセルロース C (Bus-TON<sup>(1)</sup>による)を分離すれば単純な構成糖類を示すと予想してこれを分離した。ヘミセルロース<sup>(9)</sup>の分別にはむしろ O'DWYER<sup>(19)</sup>による命名が一般に行われているが, それによるとこのものはヘミセルロース B であることになる。

楠原<sup>(18)</sup>が分離したソラマメヘミセルロース B は加水分離率が低かった(還元糖53.8%)が, ペーパークロマトグラフによってグルコースとアラビノースのみを認めた。ペントースを11.2%含んでいたから, グルコース79%とアラビノース21%とから成ることになる。DRURY<sup>(3)</sup>の比色法<sup>(10)</sup>によるとグルコース84%, アラビノース16%となった(川村実験)。いずれにしてもこのヘミセルロース B はアラボクマルカンという新しい多糖類と考えられた。

このときはサヌキナガサヤという品種を使ったが, さらにナガサヤという品種のソラマメからもう一度ヘミセルロース B を分離した(佐藤<sup>(23)</sup>)。こんどは銅化合物として沈澱する区分があることを見出したので, その方法で精製して, ヘミセルロース B<sub>1</sub>を得た(第1図)。

このヘミセルロース B<sub>1</sub>の収量は非常に少なく, ソラマメの0.019%に過ぎない。ところがこのものの加水分解物の組成はグルコース46%, キシロース35%, ガラクトース14%, リボース5%であった(檜崎実験)。ガラクトースやリボースが粗ホロセルロースに見出されなかったのはその量が少ないからであろう。ソラマメの0.019%ということは全ヘミセルロースに対してもわずかに0.56%に当るだけであるから, 全ヘミセルロースの中のリボースの量は  $5 \times 0.56/100 = 0.028\%$  となる。もっとも分離できた量は実際存在するもののうち一部分であろうが, それにしても粗ホロセルロースにはヘミセルロース(49%)以外のものも含まれている。0.1%以下の糖の検出が困難なことは十分想像される。

文献によるとアマ種子の粘質物<sup>(4)</sup>, アラビアゴム<sup>(5)</sup>, ブラジル産ゴム2種類<sup>(22)</sup>, ミソの多糖類<sup>(6)</sup>にリボースが検出されているが, まだ確認されてはいない。

この研究の前半は日本農芸化学会大会(東京大学, 1955年3月31日)で講演し, 後半は同学会関西, 中部両支部合同大会(伊勢市, 1956年10月19日)で講演した。なお後半の要点は英文速報<sup>(14)</sup>として発表した。

標準のリボースをわけて頂いた大阪大学の二国二郎教授に感謝する。