他のものは 13.5% であった。

尙動物試験は田部井菊子氏にお願いした。此処に感謝する。本研究は文部省試験研究費による。

- (1) 稲垣長典, 武田昕一 : 農化, 24, 486 (1951).
- (2) 桜井芳人 : 第 47 回ビタミン B 総合研究委員会 (1950. 6. 15).
- (3) 稲垣長典, 家近恵子 : 栄養と食糧, 4, 183 (1952).
- (4) 稲垣長典, 武田昕一 : 栄養と食糧, 2, 209 (1950).

Summary

Our previous results on thiourea as the stabilizer for riboflavin and thiamine were further ascertained as follows :

- (1) the biological activity of riboflavin when fed with thiourea was slightly increased.
- (2) the stability of riboflavin in an aqueous solution was increased under certain conditions by chlorophyllin (Mg-chl.-Na, Cu-chl.-Na and Fe-chl.-Na).
- (3) the loss of riboflavin in B₂-fortified biscuits due to baking and 6 months storage was about 23.5% and 37%, respectively, by the chemical assay.

各種糸状菌のアミラーゼに関する研究 (第 6 報)

タカチアスターゼより採取せる α -アミラーゼを含みぬ糖化酵素系と結晶
タカ α -アミラーゼ液との各種混合比率における糖化の伸びについて^{*1}

岡崎 浩^{*2}, 斎藤昭一郎 (東京大学農芸化学教室坂口研究室)

昭和 27 年 4 月 14 日 受理

Studies on Amylases of Various Species of Molds. Part 6. Rates of the Secondary Phase of Starch Hydrolysis by the Joint Actions of Crystalline Taka- α -amylase and Saccharogenic Amylase System prepared from Takadiastase.

By Hiroshi OKAZAKI and Shoichiro SAITO

(Dept. of Agr.¹Chem., Fac. of Agriculture, University of Tokyo and Sankyo Co., Ltd.)

筆者は第 1 報において⁽¹⁾各種の糸状菌を澱粉分解型式によつて 5 つの型に分類し、第 2 報において⁽²⁾、そのうちの *Asp. oryzae* 型及び *Asp. awamori* 型は澱粉分解後期における醗酵性糖分生成速度が遅く、他の 3 型、すなわち、*Asp. Usanii* 型、*Rhiz. tonkinensis* 型及び *Rhiz. Peka* 型の 3 者は同じく後期における醗酵性糖分生成速度が比較的速いことを認めた。この現象に対して筆者は前 2 者を「糖化の伸び」が悪い、後 3 者を「糖化の伸び」が良いという表現を与えた。この伸びの良否の生ずる原因は、これらの糸状菌の本来から所有する生物的特性で容易には究明しえないものとしてしまえばそれまでであるが、このことは澱粉分解機構上の基礎的分野の究明のみならず、糸状菌のアルコール工業その他の応用面においても極めて重要な問題であるので、何等かの解明の鍵を発見し得られないものかと思い、第 2 報において種々考察した結果、糖化の伸びの悪い型は、糊精化酵素力と糖化酵素力の比が大であり、伸びの良い型はその比が小である事実に着眼し、或はこの点に理由があるのではないかと考察した。そこで第 4 報において⁽³⁾糖化の伸びの良い *Asp. Usanii* 及び *Rhiz. tonkinensis* の原酵素液に α -アミラーゼ (麦芽より調製したもの) を添加してみたところ明に糖化の伸びが悪くなり、逆に糖化の伸びの悪い *Asp. awamori* の原酵素液を酸熱処理してその α -アミラーゼの 1 部を除去したところ、伸びが良くなることを認めたのである。これによつて糖化の伸びは糊精化酵素力と糖化酵素力の比率によつて左右されるものであることが一応証明されたわけである。

しかしながら、更に確実な証明を行うには、糸状菌の糊精化酵素と糖化酵素をそれぞれ相互に分離した上で、両者を各種比率に混合し、それらの糖化の伸びを比較してみても事実を確認してみる必要がある。

幸いにして、糸状菌の α -アミラーゼの 1 つ、*Asp. oryzae* のそれ、[α -Type] は UNDERKOFER 等⁽⁶⁾ 或

*1 本報告は昭和 27 年 4 月 6 日、日本農芸化学会大会において口演した。

*2 三共高峯研究所東大派遣研究員。

は K.H. MEYER⁽⁶⁾ 一派の方法よりも効果的な Rivanol 法によつて大阪大学赤堀教授等によつて結晶化され⁽⁷⁾ 同教授ならびに大阪大学産業科学研究所二国教授の御厚意によつて結晶懸濁液を分与していただけた*。

一方、糸状菌の糖化酵素の分離は最近しきりに試みられ、黒麹菌からの γ -アミラーゼ⁽⁸⁾, Amyloglucosidase⁽⁹⁾, *Rhizopus* からの Gluc Amylase⁽¹⁰⁾ 等が報告され、又、*Asp. oryzae* からは徳岡氏の報告がある⁽¹¹⁾。これらのうち γ -アミラーゼを除いてはすべてマルターゼ作用を共用していると記載されている。筆者は、三共タカチアスターゼの原末 (*Asp. oryzae* よりの酵素製品) から Rivanol 処理、酸性白土処理、昇汞処理等の操作を経て比較的簡易に、 α -アミラーゼを全く含まぬ糖化酵素系を分離することが出来たので、本報告の目的である糖化の伸びを証明するための試料としては充分使用しうるものとして用いた。

尚、ここに分離した糖化酵素液は α -アミラーゼは完全に除去されているが、後記の如くマルターゼ力, malt-limit-dextrinase 力等を有するものであつて、今後の精製をすすめるためには果して、これら別個の酵素が混在しているものか、又はこれらの作用を同時に併有する単一の酵素であるのかは未だ確言しえない。そういった意味で念のためこの糖化酵素液を糸状菌の「糖化酵素系」 Mold Saccharogenic Amylase System と呼んでおくことにし、略して S.A.S. と記載する。

尚、筆者は第 3 報⁽⁴⁾において従来の糖化酵素、 β -アミラーゼの場合には、 α -アミラーゼとの混合比率によつて何等糖化の伸びが左右されないことを認め、糸状菌の糖化酵素は β -アミラーゼとは作用機構上異つたものであるとして仮に「 β -アミラーゼ」なる名称を用いたが、これはあくまで報告記載上の便宜的な名称であつて、アミラーゼの種類名称統一上思わしくないのなるべく用いないこととし、今後の精製によつてその正体が判明するまでは煩雑ではあるが上記のごとく、糸状菌の「糖化酵素系」と記載しておく。

かくして筆者は本報告において結晶タカ- α -アミラーゼと S.A.S. とを用いて実験した結果、明かに糖化の伸びは両者の比率によつて左右されるものであることを確認し、更にその機構を究明するための若干の実験結果を附記してここに報告するわけである。

酵 素 液 の 調 製 法

1. 結晶タカ α -アミラーゼ [α -type] 液：大阪大学産業科学研究所二国研究室において赤堀氏の Rivanol 法によつて得られた *Asp. oryzae* の結晶 α -アミラーゼ [α -type] のアセトン懸濁液 (実験記号 XI) を再溜水で 225 倍に稀釈したものを原 α -アミラーゼ液とした。

2. α -アミラーゼを含まぬ糸状菌糖化酵素系 (S.A.S.) の調製 三共タカチアスターゼの原末の 20% 水溶液をつくり、不溶物を遠心分離除去し、透析せずに 1% rivanol 溶液 3 倍量を加えて 1 夜氷室に放置したのち生ずる沈澱を除き、冷却下にエタノール 70 vol. % にして生ずる沈澱を無水エタノールにて数回洗滌したのち塩化カルシウム真空デシケーターにて 1 たん白色粉末とする。

次にこの粉末の 10% 水溶液をつくり不溶物を除去したのち 1 M Ca acetate を 1/5 容加え、1 夜氷室に放置して生ずる沈澱を除去し、上澄をセロファン膜による流水透析 2 日、蒸溜水透析 1 日を経て内液をとる (透析による力価の減少はない)。この内液に 1% rivanol 液 1/10 容を添加し氷室に 1 日～2 日放置して生ずる沈澱を除去する。上澄に 2% の割に活性白土を混合して余剰の rivanol 及び不純物を除く操作を 3～4 回繰返す。

以上の処理液に固形の昇汞を 1% になるようにとかし、30° に 5 乃至 6 時間保つて混在する微量の α -アミラーゼを破壊し、生ずる白色沈澱を除去した上澄を昇汞の反応のなくなるまで流水透析、蒸溜水透析を行い、更に硫化水素によつて水銀を完全に除去する。この液を 7 倍にうすめたものを原糖化酵素液として用いた。記述の便宜上以下この液を S.A.S. と略記する (前文参照)。

実験 1: α -アミラーゼと S.A.S. の各種混合比率における糖化の伸びの比較 先ず S.A.S. の一定量に対し、 α -アミラーゼ液を順次漸減した 4 種類の配合について可溶性澱粉に対する分解曲線を比較した。作用配合は Table 1 に示す。

分解率は作用混液を経時的に 2 ml づつ採取し還元力を FEHLING-LEHMANN-SCHOORL 法によつて定量し、グルコシッド結合分解率にて示した。又、沃度反応は経時的に作用混液 0.5 ml づつをとり蒸溜水 2 ml 中に投

* その後筆者自身、赤堀法によつて簡単にしかも大量の結晶をうる事が出来て、該法の極めて効果的なことを認めた (1952 年 11 月 18 日)。

Table 1. Compositions of the Joint Actions of mold α -Amylase and Saccharogenic Amylase System upon Soluble Potato Starch.

Joint System	[A]	[B]	[C]	[D]	α -Amylase only	S. A. S. only
Compositions 2% Soluble starch	40ml	40ml	40ml	40ml	40ml	40ml
McILVAINE buffer (pH 4.8)	4 //	4 //	4 //	4 //	4 //	4 //
S. A. S.	4 //	4 //	4 //	4 //	—	4 //
α -Amylase	4 //	3 //	1.5 //	0.75 //	4 //	—
Dist. water	0	1 //	2.5 //	3.25 //	4 //	4 //

だけで糖化の伸びに差が生ずるのであるから、よく最近マルターゼ力が糖化の伸びに重要であると云われるが⁽¹⁴⁾ その説は不充分であり、常に α -アミラーゼ力との関連において述べられるべきである。

Fig. 1. Joint Actions of α -Amylase and Saccharogenic Amylase System of Mold.

後に S. A. S. を添加した場合、同じく 90 分後に添加した場合における糖化の伸びを比較してみた。使用した α -アミラーゼ液、S. A. S. 及び定量法は実験 1 と同じものでありその作用配合及び添加時期は Table 2 の如くである。

Table 2. Compositions of the Joint Actions of α -Amylase with Successive Addition of Mold Saccharogenic Amylase System.

Series	[A]	[B]	[C]	α -Amylase only.
Compositions				
2% Soluble starch	40ml	40ml	40ml	40ml
McILVAINE Buffer (pH 4.8)	4 //	4 //	4 //	4 //
α -Amylase	2 //	2 //	2 //	2 //
Dist. water	2 //	2 //	2 //	6 //
S. A. S.	Simultaneously 4 //	After 45 min. 4 //	After 90 min. 4 //	—

* 尚、この場合生成する還元性物質は終始グルコースのみであつて、マルトースをはじめその他の還元性物質は生成されない。(Baker's yeast による SOMOGYI の分別定量法)
又、残留する紫青色のデキストリンは、 β -アミラーゼによつてもはや分解されない。

入し $N/100$ KI- I_2 液 2 滴を滴下した際の色調を肉眼によつて観察した。この結果は Fig. 1 に示す通りであつて、同一量の S. A. S. に対して α -アミラーゼを多く添加した配合 [A] から順次少くした配合 [D] に至るに従つて糖化の伸びがよくなつてゐる。これによつて明に糖化の伸びは α -アミラーゼと S. A. S. の比率によつて左右されるものであることが確認されたのである。尚、[A] から [D] に至るまで常に S. A. S. は一定量、つまりマルターゼ力も malt-limit-dextrinase 力も同一量であり、 α -アミラーゼの量が異なる

さて、Fig. 1 に見るとおり α -アミラーゼを全く含有しない S. A. S. のみの場合は伸びが悪く、長時間作用においても沃度反応は紫青色を保ち、分解度は 75~80% に止まる性質をもっているのであつて*、伸びを良くするためには S. A. S. に対して微量の α -アミラーゼを必要とすることが判るのである。こうした配合の場合には両者の作用によつて、或る種の好適な分解過程が現出され、分解しやすいデキストリンが生成しつつ糖化が進むのであろう。これに反して α -アミラーゼが S. A. S. に比して多く存在すればするほど、 α -アミラーゼによる澱粉分解が先行し、その結果構造的に S. A. S. によつて比較的分解されにくいデキストリンが生成れるために、伸びが悪くなるのであろうと考えられるのである。この推論を確認するために以下実験 2 及び 3 を行つた。

実験 2: α -アミラーゼの作用過程における S. A. S. の逐次添加 そこで次に、 α -アミラーゼと S. A. S. とをはじめから同時に混ぜて作用させた場合と、あらかじめ α -アミラーゼを作用させておき 45 分

Fig. 2. Joint Action of α -Amylase with Successive Addition of Mold Saccharogenic Amylase System.

Table 3. Compositions of the Joint Actions of Mold Saccharogenic Amylase System with Successive Addition of α -Amylase.

Series	[A]	[B]	[C]	[D]
Compositions				
2% Soluble starch	40ml	40ml	40ml	40ml
MCILVAINE Buffer (pH 4.8)	4 //	4 //	4 //	4 //
S. A. S.	4 //	4 //	4 //	4 //
α -Amylase	Simultaneously 4 //	After 1 hr. 4 //	After 2 hrs. 4 //	After 3 hrs. 4 //

Fig. 3. Joint Action of Mold Saccharogenic Amylase System with Successive Addition of α -Amylase.

この結果は Fig. 2 に示す。すなわち、S.A.S. を遅く添加したものほど糖化の伸びが悪くなるのであつて、 α -アミラーゼによつてデキストリンへの分解がすすめばすすむほど S. A. S. によつて分解しにくくなつてくるものであることが認められる。

実験 3: S. A. S. 作用過程における α -アミラーゼの逐次添加 そこで次に、 α -アミラーゼと S. A. S. を同時に作用させた場合と、あらかじめ S. A. S. を作用させておき、1 時間後に α -アミラーゼを添加した場合、同じく 2 時間後、3 時間後に添加した場合における糖化の伸びを比較してみた。使用した α -アミラーゼ液、S. A. S. 及び定量法は実験 1 と同じであり、その作用配合及び α -アミラーゼの逐次添加時期は Table 3 の如くである。

この結果は Fig. 3 に示す。すなわち [A] から [D] の順に糖化の伸びがよくなつていく。つまりあらかじめ澱粉に対して S. A. S. を充分に作用させればさせるほどあとで α -アミラーゼを手伝わした際に糖とし

て遊離しうる部分の多い構造のものが出来ることが知られる。

考 察

以上実験 1, 2 及び 3 に示した如く糸状菌の 5 つの型に認められる糖化の伸びの良否は、それらの酵素系における糊精化力と糖化力との比率によるものであつて、 α -アミラーゼが S. A. S. に比して多く存在している、 α -アミラーゼの澱粉分解が S. A. S. のそれに先行すればするほど糖は生成されにくくなり、又、S. A. S. 単独では沃度反応も紫青色に止り、その分解曲線も 40~50% ぐらいからゆるやかになるが、これに α -アミラーゼが少量入っている場合は主として、S. A. S. による澱粉分解が先行し、これに α -アミラーゼの緩徐な作用がはたらいて S. A. S. にとつて分解しやすい形のデキストリンが生成しつつ順調な糖化が営まれ糖化の伸びがよくなるものと考えられるのである。

この間の事情を更に明瞭ならしめるために以下 S. A. S. の澱粉分解機構の特徴を究明するための若干の

考察実験を追加したのちに改めて糖化の伸びを説明することにする。

考察実験 1: β -Limit-dextrine, Malt-limit-dextrine 及びマルトースに対する S.A.S. の作用 先ず従来の β -アミラーゼが澱粉に作用して残留する β -limit-dextrine 及び α , β 両アミラーゼの共同作用によつて残留する malt-limit-dextrine に対して果して S.A.S. が作用するか否かをみた。又、マルトースの分解力も併試した。使用した S.A.S. は上記実験 1, 2 及び 3 等に用いたものと同じ濃度のものを用い、それぞれの基質に対する作用配合は次の如くである。

1% β -limit-dextrine 又は 1% malt-limit-dextrine 液、及び 2% マルトース液それぞれ 20 ml に McILVAINE buffer (pH 4.8) 2 ml, 蒸溜水 2 ml 及び S.A.S. 2 ml を混じて全容 26 ml にて 30° で作用させ、還元力を FEHLING-LEHMANN-SCHOORL 法で測定し、グルコシッド結合分解率にて示した。

その結果は Table 4, 第 2, 5 及び 7 欄に示す如く S.A.S. は β -limit-dextrine, malt-limit-dextrine 両者に対して緩徐ながら明な分解作用を示し、マルトースにも作用する。

Table 4. Actions and Joint Actions of β -Amylase and Mold Saccharogenic Amylase System upon Several Substrates.

Substrates Enz. Soln Reaction time	1% β -Limit-dextrine			1% Malt-limit-dextrine			2% maltose	2% sol. starch.
	β -Amylase + S.A.S.	S.A.S.	β -Amyl.	β -Amylase + S.A.S.	S.A.S.	β -Amyl.	S.A.S.	β -Amyl.
15 min	—	—	—	—	—	—	—	14.6%
30 "	4.4%	4.4%	0.0%	8.7%	8.1%	0.0%	4.24%	21.4%
1.0 hrs	6.6%	7.0%	—	15.1%	16.2%	—	8.48%	27.0%
1.5 "	—	—	—	—	—	—	—	30.0%
2.0 "	10.2%	11.3%	—	22.4%	22.4%	—	14.5%	—
3.0 "	—	—	—	—	—	—	18.0%	—
4.0 "	15.5%	16.5%	—	30.4%	31.7%	—	—	32.2%
24.0 "	44.4%	43.2%	1.6%	49.4%	46.2%	1.65%	—	32.3%

そこで S.A.S. は β -limit-dextrine, 及び malt-limit-dextrine 中のグルコシッド結合のどの部分を分解するかという問題になる。すでに PHILLIPS 及び CALDWELL が Glue Amylase⁽¹⁰⁾ の報告に提唱した如く、糸状菌の糖化酵素が澱粉分子中の 1~6 グルコシッド結合を切るか又は by-pass するかも知れないことは予想されているのであつて、筆者の S.A.S. も一応これを参考にして次のように考えた。(1) 先ず β -limit-dextrine に対してはその最外側の 1~6 結合点 (Fig. 4-I, a 点) を切断するか又はここを by-pass して、それに隣る内部の 1~4 結合点 (Fig. 4-I, b 点) を切つて徐々に糖を遊離する。(2) malt-limit-dextrine に対しては末端に在る 1~6 結合点 (Fig. 4-II, a 点) を切るか、又はこれを by-pass して、それに隣る 1~4 結合点 (Fig. 4-II, b 点) を切つて徐々に糖を遊離するのではなからうかと考えた。そこでこの考えを裏付けようとして

Fig. 4. Imaginary Figures of β -Limit-dextrine and malt-limit-dextrine

考察実験 2 をすすめたところ、この考えは一応否定すべき結果となり、後に示すごとき別途の機構を推定するに至つたのである。

考察実験 2: S.A.S. と β -アミラーゼの共同作用による β -limit-dextrine 及び malt-limit-dextrine の分解 すなわち、若し S.A.S. が両基質に対して a 点又は b 点を切断しようとするれば、これに強力な β -アミラーゼを併用すれば、a 点又は b 点の切断によつて露出される非還元性末端基にただちに β -アミラーゼが作用して、S.A.S. 単独の場合より

も分解速度が早くなる筈である。作用配合は考察実験 1 における蒸溜水 2 ml の代りに甘藷 β -アミラーゼ [β -type] の結晶懸濁液 2 ml* を用いた (この β -アミラーゼ液単独の可溶性澱粉に対する分解率は Table 4 第 8 欄に、又、 β -limit-dextrine 及び malt-limit-dextrine に対して全く作用しないことは Table 4 第 3 及び 6 欄に示してある)。

* この甘藷 β -アミラーゼ液は東大農化生物化学研究室の丸尾文治氏より分与をうけた結晶懸濁液を蒸溜水にて 40 倍にうすめたものである。

かくして S. A. S. と β -アミラーゼの両基質に対する共同作用の結果は Table 4 第 1 及び 4 欄に示すごとく、予想に反して全く S. A. S. 単独の場合と変りがないのである。もしかすると S. A. S. と β -アミラーゼが competitive にはたらくために——つまり、S. A. S. が a 点又は b 点を切つて非還元性末端基を露出したとしてもそこに喰いついて徐々に作用をつづけ β -アミラーゼのはたらく余地を与えないために——差が出ないのかと思つて、はじめから β -アミラーゼを混ぜずに S. A. S. 単独で作用させ、1 時間目に作用混液を煮沸して S. A. S. を殺したのち、 β -アミラーゼを添加してみたが、その点以上には全く反応が進まない。2 時間目、4 時間目に同様 S. A. S. を殺したのちに β -アミラーゼを添加してみたが、やはりそれらの点以上には全く反応がすすまなかつた。したがつて S. A. S. と β -アミラーゼとの competitive action も否定しうる。

かくのごとく β -limit-dextrine, 及び malt-limit-dextrine に S. A. S. と β -アミラーゼとを共同作用させても、S. A. S. 単独の場合と全く分解速度に差がないことから、S. A. S. は両基質の a 点又は b 点を切るものではないと推定しうるのである。そうだとすれば結局 S. A. S. は malt-limit-dextrine に対してはその還元性末端基 (c 点) から緩徐に糖を遊離するものであり*, β -limit-dextrine に対してはその中心に近い 1~6 結合点 (c 点) を切つて還元性末端基を露出し、その点から緩徐に糖を遊離する。そして c 点を切りはなして分子が次第に小さくなるともはや d 点, e 点等の 1~6 結合には作用しにくくなる性質を有するものと推定されるのである。従来の α , 及び β -アミラーゼは澱粉分子中の何れの 1~6 結合も分解しえず、又還元性末端基には作用しないとされているが、この S. A. S. にあつては小分子のデキストリン中の 1~6 結合は切りにくいが大分子の中心に近い 1~6 結合は緩徐に切りうること、及び還元性末端基からも緩徐に糖を遊離しうるものが以上の考察実験結果によつて推定されたわけである。

尚 malt-limit-dextrine の還元性末端基を WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法の原理にしたがつて, hypiodide (3) によつて酸化したものに対して S. A. S. を作用させてみたが、この場合は対照 (酸化時間を与えないもの) と全く同じ分解速度を示した。しかしこれは必ずしも還元性末端基から切るという推定の完全な反証にはならないものであるから、ただそういう事実のあることを附記するに止める。

再び糖化の伸びの説明: S. A. S. の澱粉分解機構を以上の如く推定すると糖化の伸びに対する説明がかなり矛盾なく与えられるのである。すなわち、S. A. S. に比して α -アミラーゼが少い酵素系の場合は、 α -アミラーゼの作用がよわくて澱粉分子が小さくならない間に S. A. S. がはたらいて中心に近い 1~6 結合を多く分解しておくから、それだけ 1~6 結合が減つて、結局糖化の後期において 1~6 結合をもつたデキストリンの数が少くなり、したがつて糖化の伸びがよくなるわけである。これに反して S. A. S. に比して α -アミラーゼが多ければ多いほど、S. A. S. が中心に近い 1~6 結合点を分解しない先に澱粉が迅速に小分子に分解されてしまつて、それらに存在する 1~6 結合に対してはもはや S. A. S. が作用しにくくなるために結局、1~6 結合をもつたデキストリンが多く残留し、糖化の伸びが悪くなるものと考えられるのである。

総 括

1. *Asp. oryzae* の結晶 α -アミラーゼ液と α -アミラーゼを含みぬ糖化酵素系を用い、両者の混合比率によつて糖化の伸びが左右されることを実験的に証明した。
2. *Asp. oryzae* の α -アミラーゼを含みぬ糖化酵素系は澱粉の大分子中の中心に近い 1~6 結合点は切断しうるが逐次小分子中の 1~6 結合は切りにくくなること、又還元性末端基からも緩徐に糖を遊離しうる性質のものであると推論した。
3. 上記の推論に基づき糖化の伸びの機構を比較的妥当と首肯しうる筆法によつて説明を与えた。

この研究は東大農化坂口研究室において行つていもので、坂口謹一郎教授、朝井勇宣教授、ならびにタカ α -アミラーゼ、甘藷 β -アミラーゼの結晶を夫々分与され、あわせて御指導を賜つた大阪大学赤堀教授、同産業科学研究所二国教授、東大農化生物化学研究室丸尾助教授、小林恒夫の諸氏に対し厚く感謝する。

* Malt-limit-dextrine の分解機構に関して、筆者が第 5 報⁽²⁾にそれが isomaltase 作用と同じものかも知れないと予想したが、本報告の筆法によつて一応この推論を放棄する。

- (3) 岡崎 : 農化, 25, 317 (1952).
 (4) 同 : 同, 25, 224 (1951).
 (5) L. A. UNDERKOFER and D. K. ROY : *Cereal Chem.*, 28, 18 (1951).
 (6) Ed. H. FISCHER and R. de MONTMOLLIN : *Nature*, 168, 606 (1951).
 (7) S. AKABORI, B. HAGIWARA., T. IKEDA : *Proc. Jap. Acad.*, 27, 350 (1951).
 (8) 北原, 久留島 : 酸工, 30, 72 (1952).
 (9) R. W. KERR, F. C. CLEVELAND, and W. J. KATZBECK : *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 3916 (1951).
 (10) L. PHILLIPS and M. L. CALDWELL : *J. Amer. Chem. Soc.*, 73, 3559 (1951).
 (11) 徳岡 : 醸学, 19, 791 (1941).
 (12) 岡崎 : 農化, 25, 321 (1952).
 (13) K. MYRBÄCK : *Biochem. Z.*, 285, 290 (1936).
 (14) J. CORMAN, and H. M. TSUCHIYA : *Cereal Chem.*, 28, 280 (1951).

Summary

1. Joint actions of crystalline α -amylase and the α -amylase-free saccharogenic amylase system, both prepared from Takadiastase, upon soluble potato starch were tested. It is proved that the ratio of these two agents is an important factor upon the rates of the secondary phase of starch hydrolysis.

2. The modes of action of the saccharogenic amylase system were assumed as follows ;

(1) It should be able to attack 1~6 glucosidic bonds of the interior chains of high molecular dextrans but not that of low molecular dextrans.

(2) It appears to attack gradually the reducing ends as well as non-reducing ends of the glucosidic chains of the substrates.

3. The mechanism of the joint action of α -amylase and the saccharogenic amylase system was explained consistently according to the above assumptions.

アミノ酸のペーパークロマトグラフィー (第2報)

アミノ酸銅鹽に對する pH の影響

本田幸一郎, 三浦一夫, 玉置大器 (浪速大学農学部)

昭和 27 年 4 月 14 日 受理

Paper Partition Chromatography of Amino Acids. Part 2. Buffered Filter

Paper Chromatography of the Cu complexes of Amino Acid.

By Koichiro HONDA, Kazuo MIURA and Taiki TAMAOKI (Department of Agricultural Chemistry, Naniwa University)

アミノ酸のペーパークロマトグラフィーによる定量法に、クロマトグラム上に分離したアミノ酸を銅鹽に変えて定量する方法があるが⁽¹⁻³⁾、著者等は初めより銅鹽として分離しようとした⁽⁴⁾。然しながらアミノ酸銅鹽の組成は、その生成条件によりかなり異なることが報告されている⁽⁵⁻⁹⁾。即ち 1 原子の銅に対しアミノ酸の 1 乃至 3 分子が結合する。又 KLOTZ 等は spectrophotometrically にアミノ酸と銅との結合様式が pH によつて異なることをグリシンについて報告し、アルカリ側に於てはアミン結合をしていると言つている⁽¹⁰⁾。又 MALEY 等は Cu とアミノ酸との complex の安定度について stability constant を測定することによりヒスチジンがアラニン、ヴァリン及びロイシンに比し極めて安定であると報告している⁽¹¹⁻¹²⁾。

又、WIELAND 等は通電クロマトグラフィーに於いて pH 7.5 に buffer したとき、ヒスチジンの銅鹽はリジン又はグルタミン酸の銅鹽と共存するとそれぞれ $\text{Cu} < \begin{smallmatrix} \text{ヒスチジン} \\ \text{リジン} \end{smallmatrix} < \begin{smallmatrix} \text{ヒスチジン} \\ \text{グルタミン酸} \end{smallmatrix}$ なるものに一部変化することを報告している⁽¹³⁾。著者等の今回の実験では、銅の過剰なる条件で生成したアミノ酸銅鹽について buffered chromatography⁽¹⁴⁾を行い、その R_F 値の変化等を測定した。

実験の部

1. 銅鹽の作製 アミノ酸の銅鹽は各のアミノ酸の液に必要な量の数倍の塩基性炭酸銅を加えて、約 10 時間沸騰湯煎中にて加温したものと、各のアミノ酸を pH 9.0 の磷酸緩衝液に溶かした後、新たに沈澱せしめた磷酸銅を必要量の数倍加えて 37° に 24 時間放置したものと 2 種類作り、その濾液を以てサンプルとした。これら