2. 陸羽 132 号米 amylopectin は沃度呈色に於ても, amylogram に於ても, 又過沃素酸酸化法による末端基定量法に於ても, 他の米澱粉 amylopectin と差違を認める事は出来なかつた。

3. 米澱粉の amylose, amylopectin 含量について MC CREADY 法によつて解析を試みた結果, 著しく amylose 含量の高い澱粉の存在する事を見出した。

(1) 福場博保: 農化, 28, 38, 41 (昭 29).

and H.S. OWENS: *Anal. Chem.*, 22, 1156 (1950).

(2) J. J. SCHOCH: *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 2957 (1942).

(4) A. L. PATTOR, V. SILVERIA, R. M. MCMREADY and H. S. OWENS: *J. Am.*

(3) R. C. MC CREADY, G. GUGGOLZ, V. SILVERIA

Chem. Soc., 75, 1335 (1953).

Summary

The amylopection separated from rice starch (Nôrin No. 59) showed no increase in Brabender Unit at both heating and cooling curves, while that of amylose separated from the same starch showed the marked viscosity increase in cooling curve, and from these results and the previous observations (*This Journal*: 28, 38~43 (1954), it was confirmed that the sum of the end straight glucosidic chain length of amylopectin and that length of amylose contained in starch separated from rice belonging to *Oryza sativa* L. *indica* is greater than the sum of starch of *Oryza sativa* L. *japonica*. The author had speculated in the previous report that the starch separated from Rikuu No. 132 rice, predominantly cultured in Northern Japan, consisted of the amylopectin which had longer end straight glucosidic chain length than the other non-glutinous type rice starch cultured in Japan, but this amylopectin, prepared by the SCHOCH's method, did not show the special behaviour against the iodine reaction, the amylogram, and the determination of end group with periodate oxidation. The author now is carrying a research on whether this amylopectin which is a polysaccharide of intermediate type between the normal amylose and amylopectin is present or not and also on the moderate method for the separation of it.

In some rice starch, the ratio of amylose to amylopectin attained to 1/1 while the blue value of the amylose of these starch was lower than this value of the amylose prepared from starch which had this ratio below 1/1.

糸状菌の α -アミラーゼ力価測定に及ぼす β -アミラーゼ並に糸状菌糖化酵素の影響*

村松敬一郎, 富金原 孝 (株式会社科学研究所)

昭和 29 年 2 月 17 日 受理

Effects of β -amylase and Saccharogenic Enzymes for the Determination
of α -Amylase Activity in Mold Amylase Preparations.

By Keiichiro MURAMATSU and Takashi HUKINBARA (The Scientific Research Institute, Ltd.)

WOLGEMUTH 法の如き沃度法による α -amylase 力価の測定に於て, β -amylase が混在するとその沃度呈色反応の消失速度の早められることが既に古く観察されている⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾. SANDSTEDT 等⁽⁴⁾は麦芽についてこの現象を究明し, 過剰の β -amylase 添加による α -amylase 力価の定量法を確立し, 現在主にこの方法又はその改良法⁽⁵⁾⁽⁶⁾が用いられている. しかしこの方法は麦芽の α -amylase 力価の定量を目的としたもので, これと異なる酵素組成を有する糸状菌についてこの定量法が適当であるか検討されていない.

著者等は糸状菌の α -amylase 力価の測定の場合にも β -amylase が存在すると "overlapping effect" が現われる為, 沃度反応の消失が急速に早まる現象をみ, 而も過剰の β -amylase の添加によつて得られた力価と, 無添加で得られた力価とは常に一定の関係にあり, この点麦芽とは異なることを確め, 糸状菌相互間の α -amylase 力価の比較測定を行うには, 特に麦芽に於けるように過剰の β -amylase 添加の下で測定する必要は無いという結論を得た. 又糸状菌糖化酵素の α -amylase 力価に及ぼす影響は殆んど無視出来る程僅かであることを明かにしたので, これらについて報告する.

* 本報告は昭和26年11月5日農芸化学会臨時大会に於ける講演要旨である.

実 験 の 部

実験 I. α -Amylase 力価に及ぼす β -amylase 添加量の影響 *Asp. oryzae* type と *Asp. niger* type のものを糸状菌の α -amylase 供試酵素液に選り、麦芽を対照にしてこれに対する β -amylase 添加量の影響度を試験した。

β -Amylase 溶液の調製：Hard wheat flour (マニトバ種小麦粉) 40 g に対し 100 cc の割合に水を加え、室温で 2~3 時間抽出を行つたものを遠心分離し、脱脂綿で濾過した液を β -amylase 溶液とした。但しこれは小麦粉中に全く α -amylase の含有されない場合であつて、 α -amylase の混在の恐れあるときは、下記のような条件で酸性処理をほどこせば充分 β -amylase 溶液として使用し得る。

処理条件⁽³⁾—上記水抽出液 100 cc に対し 1 N 醋酸溶液 25 cc を添加し 2~3 日間 0° の冷蔵庫中に放置、これと同量の 1 N 醋酸ソーダを加える。

α -Amylase 力価の測定法：測定法は WOLGEMUTH 変法である SANDSTEDT 等の改良法⁽⁴⁾を参考にして次の如くに行つた。2% soluble starch 溶液 (100cc 中 pH 4.8 2 N acetate buffer soln. 5 cc を含む) 20 cc を 100 cc 容大型試験管に採り、これに β -amylase 溶液の一定量を加え 30° に 10 分間予め作用させる。これに下記に示す供試酵素液及び水を加えて全液量を 30 cc となし、適当な時間 (0.5~1 分) をおいて作用液の 0.5 cc をピペットで採り、5 cc の沃度液 (溶液 1 l 中, I 0.088 g, KI 40 g を含む) 中に速かに注加し、その呈色を検べ、標準色⁽⁵⁾ (0.01 N HCl 溶液 100 cc 中 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 25 g, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 3.84 g を含む) に達するに要する時間を測定する。

供試酵素液：*Asp. oryzae* type の酵素液として Takadiastase (三共製) の 0.1% 抽出液の各 2 cc を、*Asp. niger* type の酵素液として *Asp. awamori* var. *fumeus* の振盪培養濾液各 1 cc を用い、又対照の麦芽では 2.5% 抽出液各 4 cc を用いた。

Fig. 1. Relation between Quantity of β -Amylase Solution and Time to reach Standard colour (red-brown)

- × : 0.1% Takadiastase solution 20 cc (*Asp. oryzae*)
- △ : Filtrate of shaking culture of *Asp. awamori* var. *fumeus* 1 cc
- : 2.5% malt solution 4 cc

其のまま沃度褪色時を測定した値を A とし、過剰の β -amylase の存在下で測定した値を B としてその比 A/B を求め、それ等の値から β -amylase の影響度を比較検討した。

力価の測定方法 実験 I に記したと同様にして沃度呈色度の標準色に達するまでの時間を、 β -amylase 無添加の場合と、過剰に添加 (3 cc) した場合について測定した。

供試酵素液：Table 1 に示すように糸状菌の振盪培養濾液 17 種の外、細菌アミラーゼ、唾液、麦芽、小麦等種種の起原を異にするアミラーゼ剤を用い、対照として KNEEN 等⁽⁷⁾の方法で純化した麦芽の α -amylase 及び赤堀氏等が *Asp. oryzae* の培養濾液から得た結晶 α -amylase を用いた。

試験結果：測定結果は Table 1 に示した如く、A/B の値は孰れの糸状菌の場合でも大体 6 位 (最小値 6.0, 最大値 6.8, 平均 6.2) で糸状菌間に於ける差異は殊んど認められず、麦芽の pure α -amylase の値 (6.0) や *Asp. oryzae* の結晶 α -amylase の値 (6.0) とよく一致し、又 β -amylase を含まない唾液や、含まないと思われる *Bac. amylolysans* の値とも殆んど一致したが、麦芽や小麦の値とは明かに大差がみられた。

試験結果：これらの酵素液につき上記測定法に従つて β -amylase 溶液の添加量を 0 より 2.0 cc まで変えてその影響力を検べた結果は Fig. 1 に示す通りで、*Asp. oryzae* 及び *Asp. niger* type の糸状菌の α -amylase 力価の値は麦芽のその場合と同じく、 β -amylase の影響を受けて変り、而も過剰の β -amylase (0.5 cc 以上) が存在するときには常に一定の影響を蒙ることを知つた。しかしながら β -amylase の過剰下の沃度反応の褪色時は、無添加の場合に比べ糸状菌では 1/6 に、麦芽では 1/3.6 に早められることが判り、この点両者に明瞭な相違がみられた。

実験 II. 糸状菌の酵素液と諸酵素剤の α -amylase 力価に及ぼす β -amylase の影響 各種の糸状菌の酵素液と諸酵素剤について、 β -amylase を加えずに

Table 1. Effect of β -Amylase for Determination of α -Amylase in Enzyme Preparations.

Origin	Time to reach standard colour		Reaction speed	Enzyme preparations
	No addition of β -amylase A (min)	Addition of β -amylase B (min)		
<i>A. oryzae</i>	9.0	1.0	6.0	L. C. F. 0.5 cc
<i>A. Wentii</i>	12.0	2.0	6.0	" 0.5 cc
<i>A. tamari</i>	240.0	38.0	6.3	" 5.0 cc
<i>A. awamori</i> NAKAZAWA	13.0	2.0	6.5	" 1.0 cc
<i>A. awamori</i> var. <i>fumeus</i>	24.0	4.0	6.0	" 1.0 cc
<i>A. Inuii</i>	38.0	6.0	6.3	" 1.0 cc
<i>A. Usami</i>	16.0	2.5	6.4	" 5.0 cc
<i>A. batatae</i> Saitoi	12.0	2.0	6.0	" 1.0 cc
<i>A. carbonarius</i>	207.0	32.0	6.5	" 7.0 cc
<i>A. niger</i> N. R. R. L. 337	25.0	4.0	6.2	" 1.0 cc
<i>Monascus</i>	25.0	4.0	6.2	" 5.0 cc
<i>Penicillium</i>	27.0	4.5	6.0	" 5.0 cc
<i>Rh. tonkineus</i>	17.0	2.5	6.8	S. C. F. 0.5 cc 2.5% sol.
<i>Rh. delemar</i>	65.0	10.0	6.5	" 2.0 cc "
<i>Rh. javanicus</i> TAKEDA	27.0	4.0	6.7	" 1.0 cc "
<i>Rh. pèke</i>	30.0	5.0	6.0	" 1.0 cc "
Rice mold bran	16.0	2.5	6.4	10% sol. 1.0 cc
Wheat mold bran	12.0	2.0	6.0	10% sol. 1.0 cc
Takadiastase	9.0	1.5	6.0	0.1% sol. 1.0 cc
Bac. amylase	32.0	5.0	6.4	0.5% sol. 1.0 cc
Saliva amylase	22.0	5.0	6.3	1/4 dilute sol. 1.0 cc
Pure α -amylase (malt)	21.0	3.5	6.0	
" (<i>A. oryzae</i>)	18.0	3.0	6.0	1/500 dil. sol. 1.5 cc
Malt	9.0	2.5	3.6	2.5% sol. 4.0 cc
Wheat	130.0	83.0	1.6	40% sol. 8.0 cc
Pure α -amylase (malt)	43.0	7.3	5.9	(SANDSTEDT)
Malt	27.0	11.2	2.3	(SANDSTEDT)

L. C. F. Liquid culture filtrate
This medium is composed of wheat bran 2%, rice bran 0.5%, sweet potatoe flour 1%, and NaNO_3 0.2%.
S. C. F. Solid culture filtrate
This medium is wheat bran.

考察：1) 糸状菌間の α -amylase 力価を比較する場合に限つて SANDSTEDT 法の如き過剰の β -amylase 存在下で測定するという方法を採用する必要はないが、しかし麦芽等の力価と比較する場合には β -amylase を添加し、作用基質を α -amylodextrin として行わなければならないといえる。過剰の β -amylase を加える方法に従えば測定時間を相当短縮することが出来る。又普通の WOLGEMUTH 法では測定不可能な微量の α -amylase の力価の検出並びに定量も可能となる。

2) 各種糸状菌の A/B 値が純粋な α -amylase のそれとほぼ一致していることは孰れの糸状菌中にも β -amylase (cereal) は含有されていないことを間接的に示すものと思われるので、次のように補足的に試験してみた。

Table 2. Effect on Trace of β -Amylase added for Shaking Culture Filtrate of *Asp. oryzae*.

Filtrate of <i>Asp. oryzae</i>	Enzyme preparation Dilute β -amylase*	Time to red-brown A (min)	Effect of β -amylase A/Control
0.5 cc	—	21.0	6.0
"	+ 0.05 cc	18.0	5.1
"	+ 0.10 "	17.5	5.0
"	+ 0.50 "	16.0	4.6
"	+ β -amylase excess	3.5	

* 0.05 cc of dilute β -amylase solution correspond to 0.004 g of wheat flour.

補足実験： β -amylase (cereal) が糸状菌中に含有されていると仮定すれば A/B の値は 6 よりも小さな値を示す筈である。Table 2 は *Asp. oryzae* の振盪培養濾液の一定量に前記 β -amylase 溶液の 5 倍積稀液を表の如く故意に微量添加したものを酵素液となし、A 及び B 値を測定し、その比の変化を検べた結果であるが、これにみる通り稀釈 β -amylase 溶液 0.05 cc (hard wheat 0.004 g に相当) の添加で既にその効果は顕著に現れ、極めて微量でも供試酵素液中に β -amylase を含むときには A/B の値は必ず 6 よりも

小さな値となることが判つた。この事実からしても糸状菌中には微量の β -amylase をも含まないものと推論出来る。尙、さきに著者等⁽⁸⁾は Takadiastase について β -amylase の殆んど存在していないことを生成糖の追究から確認している。

実験 III. 糸状菌糖化酵素系の α -amylase 力価測定に及ぼす影響 実験 II の結果から糸状菌酵素液中の糖化酵素 (glucogenic enzyme systems⁽⁹⁾ 或いは gluc amylase⁽¹⁰⁾ 等) の α -amylase 力価の測定に及ぼす

影響は、 β -amylase 程顕著でないことがわかるが、一応それ等の影響度を明かにする為、糖化酵素液として (i) 酸性処理によつて α -amylase を破壊し去つた Takadiastase 溶液、及び (ii) *Rhiz. javanicus* TAKEDA の振盪培養濾液とを用いて行つた。

糖化酵素液の調製：(i) 10% Takadiastase 溶液に 1 N HCl を加えて pH 3.0 となし 30° で 1 時間処理後、1 N NaOH で中性にし、硫酸で飽和して 1 夜放置、遠心分離した上澄液の透析したものを使用した (α -amylase activity = 0.001 u/cc, maltase activity = 0.44 u/cc*).

(ii) *Rhiz. javanicus* TAKEDA の振盪培養濾液は殆んど α -amylase を含まなかつたので、これをそのまま使用した (α -A. A. = 0.003 u/cc, M. A. = 0.07 u/cc).

試験方法：2% soluble starch 溶液 20 cc に予め (i) 又は (ii) 液 5 cc を加え、30° に一定時間放置して基質を変化させてから *Asp. oryzae* の振盪培養濾液の一定量 (0.5 cc) を加え、水を補つて全液 30 cc となし、前記の如くして沃度液の red-brown に到達するに要する時間を測定した。

試験結果及び考察：結果は Table 3 の通りで、(i), (ii) 両区共、大体基質中の澱粉濃度の減少度と比例的

Table 3. Effects of Mold Saccharogenic Enzyme Preparations (T-sol. and R-sol.) for Determination of α -Amylase Activity of Mold Enzyme Preparation (A-sol.).

	Time of action (hr.)	Change of medium Strach conversion %	Time to standard colour	
			Found time (min)	Cal. time from changed medium (min.)
Exp. 1	0	—	21.0	—
	1	16.50	18.0	17.6
	2	29.90	14.0	14.7
	3	57.50	10.0	8.7
Exp. 2	0	—	21.0	—
	1	9.69	18.0	18.9
	4	21.56	14.0	16.8
	6	39.37	9.5	12.7
Control	10 (min.)	—	3.5	—

T-sol.: Acid treated Takadiastase solution
 α -amylase act. 0.001 U/cc, maltase act. 0.44 U/cc.

R-sol.: Shaking culture filtrate of *Rhiz. TAKEDA*
 α -amylase act. 0.003 U/cc, maltase act. 0.07 U/cc.

A-sol.: Shaking culture filtrate of *Asp. oryzae*
 α -amylase act. 5.7 U/cc, maltase act. 0.11 U/cc

Exp. 1: Acted 5 cc of T-sol. per 2% soluble strach solution. 20 cc, temperature at 30°.

Exp. 2: Acted 5 cc of R-sol. per 2% soluble strach solution 20 cc, temperature at 30°.

Control: Acted 3 cc of β -amylase solution per 2% soluble strach solution 20 cc temperature at 30°.

に沃度褪色時の短縮されることを知つたが、その影響は僅少で β -amylase の比ではなかつた。従つて糸状菌糖化酵素の影響は全くないとは云えないが殆んど無視して差支えないと結論される。

要 約

1. 沃度法に於ける糸状菌の α -amylase 力価に及ぼす β -amylase の影響を検べた結果、麦芽の場合と同じく β -amylase の添加により著しく沃度褪色時間は短縮された。又一定量以上の β -amylase が存在するときにはもはや其れ以上の短縮をみず一定の値を与えた。

2. 各種糸状菌 10 余種について沃度褪色時 (red-brown) に到達するに要する時間を β -amylase 無添加と過剰添加の場合について測定し、その比を求めたところ、いずれも 6 附近の値になり純粋な α -amylase のそれとよく一致することが分つた。この事実からこれら糸状菌酵素中に β -amylase (cereal) は含有されてない事を推断した。

3. 糸状菌相互間の α -amylase 力価の測定には、SANDSTEDT 法のように特に β -amylase の添加を必要としないという結論を得た。

4. 糸状菌糖化酵素 (glucogenic enzyme, gluc amylase 等) の α -amylase 力価に及ぼす影響度は極めて微弱で測定上に及ぼす影響は殆んど無視出来ることを確めた。

終りに臨み御指導を頂いた東京大学坂口謹一郎教授及び朝井勇宜教授に厚く感謝致します。尚マニトパ種小麦は食糧研究所より又結晶 α -amylase は東大農学部生物化学教室より分譲して頂いた。厚く謝意を表します。

* α -Amylase activity (α -A. A.) 及び maltase activity (M. A.) の測定方法及び力価の表わし方は文献⁽⁸⁾を参照せられたい。

(1) O. HOLMBERG : *Biochem. Z.*, 266, 203 (1933).

(London) B 125, 387 (1938).

(2) C. S. HANES *et al.* : *Proc. Roy. Soc.*

(3) J. BLOM *et al.* : *Z. Physiol. Chem.*, 250, 104 (1937).

- (4) R. M. SANDSTEDT *et al.*: *Cereal Chem.*, 16, 712 (1939).
 (5) W. J. OLSSON *et al.*: *Cereal Chem.*, 21, 533 (1944).
 (6) W. J. OLSSON *et al.*: *Cereal Chem.*, 24, 299 (1947).
 (7) E. KNEEN *et al.*: *Cereal Chem.*, 27, 299 (1947).
 (8) 富金原 孝, 村松敬一郎: 農化, 27, 398 (1953).
 (9) J. CORMAN and A. F. LANGLYKKE: *Cereal Chem.*, 25, 190 (1948).
 (10) L. L. PHILLIPS and M. L. CALDWELL: *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 3559 (1951).

Summary

The authors examined the effect of β -amylase and mold saccharogenic enzymes for determination of α -amylase activity in mold enzyme preparations by using the iodine-starch reaction as the WOHLGEMUTH procedure.

1. In mold enzyme preparation, as well as in malt, the time to reach the end point (red-brown or achroic point) was considerably decreased by adding β -amylase to the soluble starch medium, but the excess of β -amylase added did not help the reduction of time any more (Fig. 1).

2. A/B values (reaction speed) of 16 strains of mold enzyme preparations were about 6.0~6.8 and these values were similar to A/B values of pure malt α -amylase and crystalline mold (*Asp. oryzae*) α -amylase (Table 1).

From these results, it was concluded that the enzyme comparable to malt β -amylase was not included in mold enzyme preparation (Table 2).

3. In the relative estimation of α -amylase activity among the mold enzyme preparations, the addition of β -amylase (as the method of SANDSTEDT *et al.*) is not necessary.

4. The effects of mold saccharogenic enzymes (glucogenic enzyme, gluc amylase) for the determination of mold α -amylase activity were very weak as compared with the effect of β -amylase, therefore these influences on the estimation of mold α -amylase activity would be neglected (Table 3).

微生物発育現象に関する研究 (第9報)

細菌の発育に及ぼすアミノ酸添加の影響 (その1)

松 山 晃 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和28年11月24日受理

Studies on the Microbial Growth. Part 9. The Influences of Amino Acids added to Glucose Ammonium Salt Medium on the Bacterial Growth (1)

By Akira MATSUYAMA (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., University of Tokyo)

I. まえがき 一般に細菌に対する発育阻害剤の作用が培地中の成分によつてどのような影響を受けるかということは、細菌学的並びに発育阻害剤の作用機序の究明とその応用上の見地から興味深い問題である。食塩の発育阻害作用はアミノ酸の存在によつて著しく影響されるが、食塩は広く防腐剤として実用に供されており、且遊離アミノ酸の共存することも多いので、ここでは食塩による発育阻害作用に対する各種アミノ酸添加の影響を検討した。この場合基本培地の組成によつてアミノ酸添加の生理学的意義が異なるので、食塩による lag に対して発育促進的乃至刺激的に作用するか、或いは発育阻害的に作用するかを検討する立場から、ある程度の発育が可能で而もアミノ酸を含まない合成培地として KOSER の培地を基本培地に採用した。このような培地中では細菌は、その培地成分を利用してアミノ酸及びビタミン等すべての発育必須因子を合成利用し得る状態にあると考えられる。多くのアミノ酸は細菌細胞内において細胞原形質の構成物質としての外に細胞内代謝機能に重要な役割を演じている⁽¹⁾。従つて培地に添加されたアミノ酸が発育促進作用を示すことは予想されるが、他方ある種のアミノ酸及びとくに *d* 型の発育阻害作用も多くの研究によつて知られている^{(2)~(13)}。又細菌のアミノ酸要求は共存する他のアミノ酸の量によつて異なり、アミノ酸相互間の balance が必要で、いわゆる imbalance によるアミノ酸相互間の拮抗作用が報告されている^{(2)(14)~(19)}。これらの研究によれば KOSER の培地に添加されるアミノ酸が単に発育促進的に作用するだけでなく、種類の作用型を示すことが考えられる。合成培地でのアミノ酸の影