

Thermal Analysis of Enzyme Reactions.

Report I. Invertase Action

By

Takekazu Kôzaki.

Abstract.

Invertase has been studied since long ago and a majority of reports have been published by various investigators. But they all measure the reaction velocity observing the change of the rotating power or the reducing power and there lie many uncleared subjects concerning the earlier stage of the reaction. Also as for the later stage it is deviated from the 1st order formula and to explain this deviation various experimental formulae are proposed, but it is not yet satisfactorily explained.

The writer studied the invertase action by the thermoanalytical method originated by Prof. Horiba employing the relatively pure invertase solution of time value 0.25 prepared from yeast after the modified direction originated by the writer. First the inversion heat of sucrose is 4.1 Cal. in average and the results show the good coincidence among each experiment. He knew the relation $\frac{dx}{dt} - t$ from the relation $\frac{dT}{dt} - t$, and calculated the relation $\frac{dx}{dt} - k_m$ after the equation (10). The result of this analysis reveals that the inversion of sucrose by means of invertase proceeds after the following two formulae different from the results hitherto published.

1) Earlier stage (AB part). This shows a straight line in the $\frac{dx}{dt} - t$ coordinate. Therefore the formula (12) can be obtained.

2) Later stage (CD part). This shows a straight line in the $\frac{dx}{dt} - k_m$ coordinate. Therefore the formula (13) can be obtained.

To explain this fact the writer derived the undermentioned theoretical formulae on the standpoint of the reaction in the heterogeneous system employing Langmuir's equation: i. e. (1) the surface of the enzyme is a homogeneous adsorption surface; (2) the adsorption coefficient of sucrose is far larger than that of water; (3) water is adsorbed in the dissociated state. And the equation (19) was obtained for the earlier stage, where the surface occupied with sucrose is very large and the reaction velocity depends upon the area occupied with water. And for the later stage was the equation (20), obtained, where the surface occupied with sucrose is not so large and the reaction velocity depends upon it.

Those theoretical equations are of the similar type like the above mentioned experimental formulae and further the experimentally affirmed relations between the constants, k_1 and b_1 , and the various conditions satisfy the requirement of the theoretical formulae.

The Laboratory of Physical Chemistry,

Kyoto Imperial University, Nippon.

July, 1934.

熱解析による酵素作用の研究

第一報 サッカラーゼの作用

神 前 武 和

緒 言

サッカラーゼに関する研究はサッカラーゼの比較的安定なるのと、比較的少量に得易き事及び蔗糖の得易き爲に、古くから幾多の研究者に依つて試みられて居る。殊に Willstätter, Euler, Nelson 等の教室に於ては數年間に互り數多の輝しい業績を出してゐる。然しそれ等の研究は總て蔗糖轉化速度の觀察には轉化の際の旋光力の變化、或は生成した還元糖の還元力に依る測定法を用ひて居る。尙轉化の際の反應系の容積の増加を膨脹計を用ひて測定する方法も提唱されては居るが、實際それによつてサッカラーゼの作用を研究した報告は見られない。處が最後の方法を除き、以上従來用ひられてゐる方法に於ては反應系から各時間に反應系の一部分を取出して測定せねばならぬから、常に條件を同一にして測定する事が困難であり、又、可成連続的に測定する事が困難である爲に比較的初期の反應速度の研究に關しては暗黒なる點が多い。加之、後期の反應速度に關しても多旋光等に依つて測定上の不便がある。

本研究は堀場教授に依つて考案せられた熱解析の方法¹⁾を應用してサッカラーゼの作用を明かにせんとしたものである。即ちサッカラーゼに依る轉化の際の轉化熱に因する反應系の温度の上昇を簡單なる硝子製カロリメーター²⁾を用ひて時間的に觀察して反應速度を視知せんとした。之の方法は従來用ひられた方法と異り、よく如上の缺點を補ひ得ると考へられる。尙本研究に於ては蔗糖轉化熱の測定も同時に正確に遂行しようとした。因に著者は一般に諸種の、殊に測定方法の尙完全でない、酵素に依つて促進せられる化學反應の熱解析を爲す目的にて先づ最もよく知られた酵素反應としてサッカラーゼに依る蔗糖轉化を選んで本研究に著手したのである。

實驗方法及材料

[1] 材 料

(1) サッカラーゼの分離及精製

著者は従來の方法を改良して、培養に依つて時間價を比較的小さくした酵母を全然稀釋する事なしに中性で長時間放置して得た自己消化液を二回酒精沈澱に依つて精製後直接前處理を施さないカオリンに吸着せしめ稀薄なアムモニア水で脱吸着せしめると云ふ簡單なる操作を施す事に依つて、著しく夾雜物の少い時間價 0.25 と云ふ比較的純粋なサッカラーゼ液を相當多量得る事に成功し、之を使用した。(詳細附録参照)。

(2) 蔗糖の精製

蔗糖を水溶液となし、濾過後、舍利別狀となる迄減壓蒸餾し、之に60%になる如く酒精を加

1) 堀場及市川；本誌(原報)，1, 145 (1927)；4, 1 (1930)。

堀場及馬場；本誌(原報)，6, 47 (1932)。

2) 堀場及佐藤；本誌(原報)，6, 16 (1932)。

へて生じた沈澱を分離し、よく酒精にて洗滌後更にエーテルにて洗滌乾燥して貯藏した。之の操作を測定前々日更に一回繰返し、乾燥し、測定前日旋光力を測定し $[\alpha]_D^{20} = 66.6^\circ$ にして還元力を呈せざる事を確めて使用に供した。

[II] 実験装置及方法

化学反応の熱解析に於ては化学反応に依る反応系の温度の變化 $\left(\frac{dT}{dt}\right)$ を測定し、それに豫め反応器に特有な反応系とその周囲との温度の差に依る冷却速度 $\left(\frac{dT'}{dt}\right)$ 及び反応器を含む反応系の熱容量 (W) を測定し、更に次に示す如き方法で反応熱 (Q) を求めて、次式から $\frac{dx}{dt}$ を知る事を目的として居る。

$$\frac{dT}{dt} - \frac{dT'}{dt} = \frac{Q}{W} \frac{dx}{dt} \dots\dots\dots (1)$$

液體系に於ては $\frac{dT}{dt}$ は氣體系に於けると異り直接に次に示す如きカロリメーターに依つて測定し得る。 $\frac{dT'}{dt}$ は (1) 式に於て $\frac{dx}{dt} = 0$ なる場合、即ち冷却曲線の $\frac{dT'}{dt}$ の觀察から知り得るが、既に堀場、佐藤⁽²⁾及び堀場、馬場⁽¹⁾に依つて確められた如く、又、本實驗に於ても良く一致を見る如く之はニュートンの冷却法則に當嵌まる。即ち

$$-\frac{dT'}{dt} = k\Delta T \dots\dots\dots (2)$$

こゝに k は一つの恒數、 ΔT は反応系と周囲との温度差を示す。

W の決定は反応系に於て反應終了後電流を用ひて單位時間に一定の熱量 q' を與へて $\frac{dT}{dt}$ を觀測し次式によつて算出した。之は又水を用ひて得た結果とも比較した。

$$\frac{dT}{dt} + k\Delta T = \frac{q'}{W} \dots\dots\dots (3)$$

又、反應熱 Q は直接次の如くにして求めた。(1) 式を書き改むれば次の如くなる。

$$W \left(\frac{dT}{dt} + k\Delta T \right) = \frac{dQ}{dt} \dots\dots\dots (4)$$

之の(4)式から單位時間の反応系の發熱量 $\frac{dQ}{dt}$ と時間 t との關係を知りそれから圖上積分に依つてもより反應終了の時間 t_1 迄の $\int_{t_0}^{t_1} dQ$ を求むればよい。反應の終了しない時は t_1 より t_2 迄の間に反應した物質量を $x_2 - x_1$ 後の反應系の旋光力の検査によつて知る時は反應熱は算出し得る。

今本實驗の基礎を爲す $\frac{dT}{dt}$ の測定には圖の如きカロリメーターを用ひた。A は内徑約 4 糎、深さ約 17 糎の Dewer 瓶である。B はベックマン氏寒暖計。C は攪拌器である。D は加熱器で硝子管 d の先に附けた徑 0.1 糎、長さ 20.4 糎の白金線 d' は水銀を介して硝子管 d 内で導線 d'' と接続して居る。E は水約 25 ㊦を入れる硝子製容器でゴム管 e 及び硝子管 e' を經て Dewer 瓶と、又 e' に依つて外界と交通して居る。E を E' の位置に持ち來す時は E 内の内容を殆んど瞬間的に Dewer 瓶内に移すを得た。又、全裝置は測定の際には圖の如き位置迄水中に没入してある。(第一圖參照)。この裝置を用ひて反應熱に依る $\frac{dT}{dt}$ の測定を行ふには緩衝液を以て作つたある濃度の蔗糖溶液 100 ㊦を A 内に採り、又、E 内には酵素原液をある濃度に稀釋したるもの 20.2 ㊦採つた。(之だけ採る時は E を E' に置いて E 内の内容を A に移す時、A 内には丁度 20 ㊦入つた)。斯く容器に試料を充した後、接続部を蜜蠟で封じ恒溫槽内に入

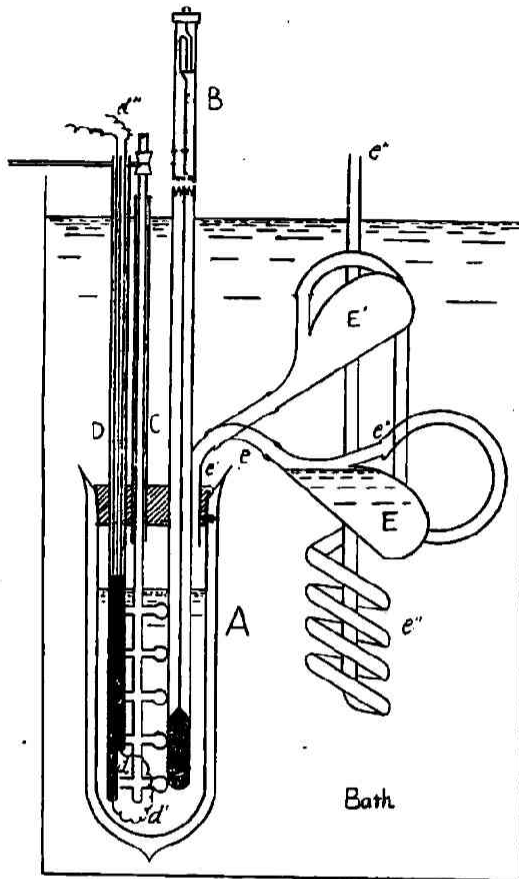


Fig. 1

れて、その後約5時間放置してA内の温度が恒温槽の温度と同一になつた時、EをE'に移して酵素液を投入し、ベックマン氏寒暖計の読みを時間的に測定した。投入後寒暖計の上昇し始める迄の時間は何れの実験に於ても常に15秒で、又電流を以て加熱した場合に電流を通じ又切つた後寒暖計の示度の上昇或は下降迄の時間も同様15秒であり、又メチレン青の溶液をE内に入れて投入実験を爲すに殆んど瞬間的に混合されるのを見た。故に投入後寒暖計の上昇し始める時間即ち投入後15秒を以て測定上の時間の零點とした。

又、 $\frac{dT}{dt}$ 観測後毎回k及びWの測定を試みた。之の目的の爲に導線d'に容量の大なる蓄電池、正確なるアンメーター及び抵抗器を直列に連結し、一定の電流を通じて時間的に温度の上昇を測定し、又電流を斷つた後自然に冷却せしめてそれを又観測した。白金線d'の抵抗は豫めホートストーン橋を用ひて37.0°C.に於て求めて置いた。W及びkの測定に反應系自身を用ひて反應系の中に存在する物質の種類及び濃度の差に依るW及びkの變化を知らうとしたが、之等は後に示す様に蒸留水

を用ひて測定した結果と殆んど差のない事を知つた。

次に豫備實驗に依つて著者の得た酵素液に依る蔗糖轉化の温度及水素イオン濃度の好適條件は温度37.0°C., pH=4.2である事を知つた。故に著者は本實驗を次の四群に分つて試みた。

第一群は蔗糖溶液の濃度を15%としpH及温度は夫々4.2, 37.0°C.で酵素原液の量を變化せしめたもの。

第二群は酵素原液13.5兎を用ひ、pH及温度は第一群と同じく夫々4.2, 37.0°C.で蔗糖溶液の濃度を變化させたもの。

第三群は酵素原液量13.5兎、蔗糖溶液の濃度15%, 温度37.0°C.とし、pHを變化させたもの。

第四群は酵素原液量13.5兎、蔗糖溶液の濃度15%, pH=4.2とし、温度を變化せしめたものである。

尙本實驗に於て記されてあるpHの値は總てポテンシオメーターを用ひて電氣的に測定した値である。緩衝液にはpH=2.9には1/10規定第二枸橼酸ソーダ溶液4兎に1/10規定鹽酸6兎を加へたもの、pH=4.2には1/5規定第二磷酸ソーダ溶液8.28兎に1/10規定枸橼酸溶液11.79兎を加へたもの、pH=5.11には1/10規定第二枸橼酸ソーダ溶液9兎に1/10規定苛性ソーダ液1兎を加へたもの、pH=6.2には1/5規定第一磷酸加里溶液50兎に1/5規定苛性ソーダ液8.6

耗を加へたもの、 $pH=7.0$ には 1/5 規定第一磷酸加里溶液 50 耗に 1/5 規定苛性ソーダ液 29.63 耗を加へたものを用ひた。

實驗結果

[I] 反應熱

(1) 冷却恒數 k 及水當量 W

本カロリメーターに 120 耗の水を充たし電氣的加熱法にて加熱曲線、冷却曲線を觀測し、それより水當量並に冷却恒數を求めた結果は次表の如くである。(第一表参照)

Table 1.
Water 120.0 c.c. Temp. of Bath 37.0°C.

| No. of Exp. | i (amp.) | q' (cal.) | W mean | k mean |
|-------------|---------------|----------------|-------------|-------------|
| 1 | 0.736 | 8.463 | 165.71 | 0.0197 |
| 2 | 0.714 | 7.950 | 165.72 | 0.0197 |
| 3 | 0.643 | 4.543 | 165.70 | 0.0197 |

又、第二表に示せる如く反應液に就いて水當量並に冷却恒數を求めて見るに純水を充たしたる時と全く一致した値を得てゐる。(第二表對照試驗 W 及 k の欄参照)

Table 2.

| Quantity of Sucrose (gm.) | Quantity of Enzyme Solution (c.c.) | Reaction (pH) | Temperature of Bath (°C) | Measurement of Reaction Heat. | | | Blank Test | |
|---------------------------|------------------------------------|---------------|--------------------------|-------------------------------|--|------------------------------|------------|------------|
| | | | | Inverted Sucrose (%) | Weight of Section Paper occupied by the $i-q$ curve, (gm.) | Reaction Heat (Cal./gm.mol.) | k | W (Cal.) |
| 15.0 | 5.0 | 4.2 | 37.0 | 100.0 | 0.3784 | 4.026 | 0.0197 | 165.71 |
| " | 10.0 | " | " | 100.0 | 0.3850 | 4.090 | 0.0197 | 165.72 |
| " | 12.5 | " | " | 100.0 | 0.3826 | 4.065 | 0.0196 | 165.73 |
| " | 16.0 | " | " | 100.0 | 0.3830 | 4.069 | 0.0198 | 165.72 |
| " | 18.0 | " | " | 100.0 | 0.3829 | 4.069 | 0.0198 | 165.72 |
| " | 20.0 | " | " | 100.0 | 0.3710 | 4.054 | 0.0195 | 165.70 |
| 2.0 | 13.5 | " | " | 100.0 | 0.0503 | 4.015 | 0.0197 | 165.71 |
| 4.0 | " | " | " | 100.0 | 0.1028 | 4.103 | 0.0197 | 165.68 |
| 5.0 | " | " | " | 100.0 | 0.1243 | 3.965 | 0.0197 | 165.71 |
| 7.5 | " | " | " | 100.0 | 0.1918 | 4.081 | 0.0196 | 165.72 |
| 10.0 | " | " | " | 100.0 | 0.2576 | 4.111 | 0.0198 | 165.71 |
| 12.5 | " | " | " | 100.0 | 0.3230 | 4.125 | 0.0199 | 165.71 |
| 20.0 | " | " | " | 100.0 | 0.5132 | 4.092 | 0.0198 | 165.71 |
| 25.0 | " | " | " | 95.8 | 0.6108 | 4.068 | 0.0198 | 165.70 |
| 30.0 | " | " | " | 90.4 | 0.7015 | 4.072 | 0.0198 | 165.72 |
| 35.0 | " | " | " | 87.2 | 0.8490 | 3.980 | 0.0197 | 165.71 |

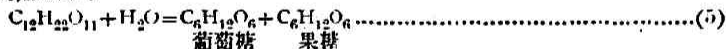
| | | | | | | | | |
|--------------------|------|------|----------|-------|--------|---------|-----------|---------|
| 15.0 | 13.5 | 7.0 | 37.0 | 17.07 | 0.0642 | 4.001 | 0.0197 | 165.73 |
| " | " | 6.2 | " | 82.2 | 0.3100 | 4.008 | 0.0196 | 165.70 |
| " | " | 5.11 | " | 100.0 | 0.2809 | 4.053 | 0.0196 | 165.70 |
| " | " | 2.9 | " | 100.0 | 0.3818 | 4.062 | 0.0197 | 165.72 |
| " | " | 4.2 | 42.0 | 89.4 | 0.3334 | 3.965 | 0.0196 | 165.71 |
| " | " | " | 38.0 | 100.0 | 0.3708 | 4.052 | 0.0197 | 165.71 |
| " | " | " | 35.0(I) | 100.0 | 0.3901 | 4.150 | 0.0196 | 165.70 |
| " | " | " | 35.0(II) | 97.0 | 0.3680 | 4.032 | 0.0196 | 165.71 |
| " | " | " | 32.0 | 100.0 | 0.3919 | 4.170 | 0.0196 | 165.70 |
| Mean | | | | | | 4.058 | 0.0197 | 165.71 |
| Mean Square Error. | | | | | | ±0.0515 | ±0.000108 | ±0.0108 |

(2) 反應熱の決定

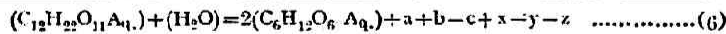
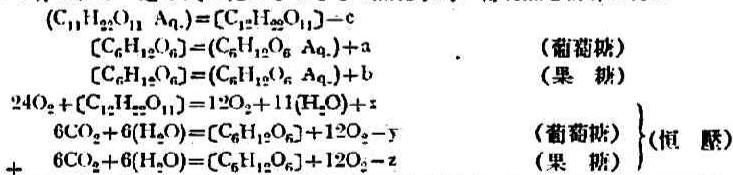
上記の如き諸條件で實驗を施行して、種々の場合に就て $t-\Delta T$ 曲線を求め延いて $\frac{dT}{dt}$ を知りそれに前節で求めた $k=0.0197$, $W=165.71$ を用ひて(4)式から $\frac{dQ}{dt}$ 即ち q を各々に就いて算出した。之の結果は次章の各表に示す如くであるが、斯くして得た $\frac{dQ}{dt}-t$ 曲線(即ち次章の圖に示されてある $\frac{dx}{dt}-t$ 曲線の $\frac{dx}{dt}$ 軸の坐標を変更したもの、但し t の單位に分、 $\frac{dQ}{dt}$ の單位に $\frac{\text{cal}}{\text{分}}$ を採つた)を畫き圖上積分法にて Q を求めた結果は第二表に示す様に各實驗皆よく一致した數値を與へ平均 4.1 Cal である。此際反應の完全に終了して居ない時は反應中絶直後に測定した反應系の旋光度から分解率を求め蔗糖 1 瓦分子即ち 342.24 瓦に對する發熱量を計算した。上表を通覽するに之の方法に依る反應熱の決定は相當信ず可き結果を齎す事、更に又之の $\frac{dQ}{dt}-t$ の關係を基として行ふ本法に依る反應速度の解析をして益々信頼するに足るものであるとの確信を抱かせるものである。

(3) 熱化學的に求めた計算値との比較

蔗糖の轉化は周知の如く



なる式に従つて行はれる。之の式に従ふものとして熱化學的に轉化熱を計算せんに



(6) 式に夫、

$$\begin{aligned} c &= -0.9 \text{ Cal}^{(3)} & x &= 1353.4 \text{ Cal}^{(4)} \\ a &= -2.3 \text{ Cal}^{(3)} & y &= 674.0 \text{ Cal}^{(4)} \\ b &= -2.3 \text{ Cal}^{(3)} & z &= 671.6 \text{ Cal}^{(4)} \end{aligned}$$

なる値を代入して計算して見れば $Q_{1\text{grammol}} = 4.1 \text{ Cal}^*$ となる。

3) Table annuelles internat., 4 (1922).

4) Landolt; Physik. Chem. Tab., (1923).

* Herzog (R. O. Herzog; Z. Physiol. C., 37, 353 (1903)) は稀釋熱を考慮に入れずに燃焼熱のみから計算して 3.1 Cal と云ふ値を得て居る。

値を定めて見た。そして $\frac{dx}{dt}$ と時間の関係及び $\frac{dx}{dt}$ と k_m の関係から之の反應を後に示す様な方法で解析しようと試みた。

先づサッカラーゼに依る蔗糖轉化の反應は古くから均一系の反應と考へられて、大體一次反應式に従ふとされて居たが、その後それには全くは一致せず、幾分の偏倚のある爲に諸家⁽⁶⁾に依つて種々の實驗式が提出されて居るが、尙完全なる説明を缺いて居る。處が本實驗に依つて得た結果に就いて見るに後掲の各表、圖に見る如く、反應初期に於て全然一次反應とは掛け離れた型式を取り、後期に於て一次反應に似た形式を取る事が認められた。即ち次掲の第二圖に $\frac{dx}{dt}$ -t 曲線 ABCD で模型的に示す様に AB なる部分、BC なる部分及び CD なる部分の三つの部分から成立つて居る事を認めた。

處がこゝに BC 部分は経過の時間から見ても後に示す如く寧ろ AB 部分より CD 部分への移行部と考へられる。それで之の AB 及び CD なる二部分の各々に就いて種々の條件に依る影響を検する爲に次に少しく判定の方法を考へて見やう。(以下全篇を通じて AB 部分、BC 部分及

(6) V. Henri (Z. physik. C., 39, 194) (1901) は a を最初の蔗糖濃度、x を轉化したモル數とする時は

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \left(1 + \frac{x}{a}\right) (a-x) \quad \text{或は} \quad 2k_2 = \frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$$

なる式が良く一致すると云ひ、又後に (Compt. rend., 115, 416,) (1902)

$$\frac{dx}{dt} = \frac{V(a-x)}{a-x+K_m} \quad \text{こゝに } K_m \text{ は蔗糖酵素結合物の解離恒數}$$

なる式を呈出して居る。

H. P. Barendrecht (Z. physik. C., 49, 456) (1904) は最初 100 珪中にある蔗糖の五數を a、轉化せずに残れる蔗糖量を y、最初の一分間に轉化した量を m、又 n を轉化糖と酵素との結合に関係する恒數とする時

$$-\frac{dy}{dt} = m \frac{y}{y+n(a-y)}$$

であらはされる事を主張し、

A. W. Visser (Z. Physik. C., 52, 257) (1905) は c を蔗糖の濃度、I を酵素の觸媒作用の強さをあらはす目安とする時

$$-\frac{dc}{dt} = \left\{ k_1 c - k_2 (c_0 - c)^2 \right\} I \quad \text{然も} \quad I = \frac{k_3}{4c_0^2 + 2c_0 c + c^2}$$

となると云ひ、

L. Michaelis 及び M. L. Menten (Bioch. Z., 49, 333) (1913) は酵素蔗糖結合物の濃度を p、酵素の全濃度を e、酵素蔗糖結合物の解離恒數を K_m とする時

$$v \left(= -\frac{dx}{dt} \right) = kp = \frac{kex}{K_m + x}$$

なる式を與へ

J. M. Nelson 及 D. I. Hitchcock (J. A. C. S., 43, 2632) (1921) は

$$t = \frac{1}{N} \left\{ \log \frac{100}{100-p} + 0.002642 p - 0.00000886 p^2 - 0.0000001034 p^3 \right\}$$

なる式が實驗的によく一致する事を見出し、

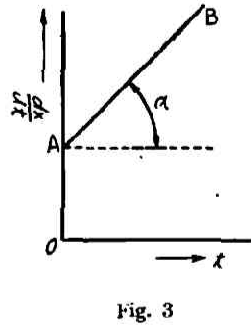
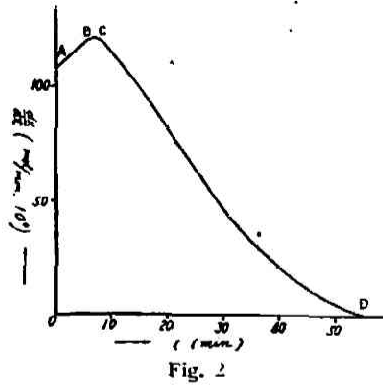
J. B. S. Haldane (Enzymes, 76,) (1930) は Michaelis 等の考と似た推論で、更に酵素葡萄糖結合物の解離恒數を K_g 、酵素果糖結合物の解離恒數を K_f として

$$-\frac{dx}{dt} = \frac{Vx}{x + K_m \left(1 + \frac{a-x}{K_g} + \frac{a-x}{K_f} \right)}$$

或は

$$V_t = \left(1 - \frac{K_m}{K_f} - \frac{K_m}{K_g} \right) (a-x) + K_m \left(1 + \frac{a}{K_f} + \frac{a}{K_g} \right) \ln \frac{a}{x}$$

なる式を與へて之が Nelson 及 Hitchcock の式と同様の傾向を示すと云ふて居る。



び CD 部分と云ふ時は之の意味である.)

(i) AB 部分

之の部分は何れの實驗に於ても同様に第六圖, 第九圖, 第十二圖及第十五圖に就いて見られる如く總て $\frac{dx}{dt}-t$ 坐標で直線となるのを知つたので次の如くにして反應速度式を求めた。

第三圖に於て $AO=a'$, $\tan a=b$ と置いて AB 直線の式を求むれば

$$\frac{dx}{dt} = bt + a' \dots\dots\dots(11)$$

積分して

$$x = \frac{b}{2} t^2 + a't + C$$

積分常數 C は, $t=0$ の時 $x=0$ であるから, $C=0$ となる。

$$\therefore x = \frac{b}{2} t^2 + a't$$

之から

$$t = \frac{-a' + \sqrt{a'^2 + 2bx}}{b} \quad (\text{負號は吟味上捨てる})$$

之を(11)式に代入して

$$\frac{dx}{dt} = \sqrt{a'^2 + 2bx}$$

こゝに $\sqrt{2b} \equiv k_1$
 $\frac{a'^2}{2b} \equiv a_1$ と置けば

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \sqrt{a_1 + x} \dots\dots\dots(12)$$

なる式で示される。

それで種々の條件に於て, a, b を求め, 之等から k_1, a_1 を算出して, 之の k_1, a_1 が種々の條件に依つて如何に變化するかを調べて見た。

(ii) CD部分

之の部分に就いて k_m を概観して見るに, 大體に於て一致する如きも, 一樣の傾向で偏倚し

てあるのを見る。それで今 $\frac{dx}{dt} - k_m$ 坐標で通観して見るに次節以下の第七圖、第十圖、第十三圖及び第十六圖に示す如く、何れの實驗でも直線關係になるのを見た。故に次の如くにして反應速度式を求めた。

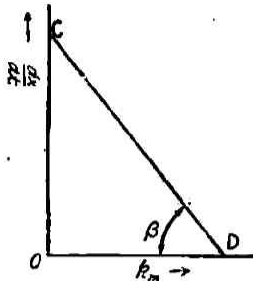


Fig. 4

第四圖に於て $OD=b, \cot \beta=c$ とする時は直線 CD は次式であらはされる。

$$c \frac{dx}{dt} + k_m = b_1 \dots\dots\dots (13)$$

處が $k_m = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{a-x}$ であるから、之を(13)式に代入して

$$\frac{dx}{dt} = b_1 \cdot \frac{a-x}{ac+1-cx} = b_1 \cdot \frac{a-x}{1+c(a-x)} \dots\dots (14)$$

こゝに $ac+1 \equiv a_2$ と置けば

$$\frac{dx}{dt} = b_1 \cdot \frac{1}{a_2 - cx} \cdot (a-x) \dots\dots\dots (14)'$$

故に種々の實驗から b_1, c を求めて更に a_2 を算出し之等 b_1, a_2 及 c が夫等の條件に依つて如何に變化するかを見た。

(2) 酵素量と反應速度

酵素量と反應速度に關してはペブシンに就ては Schütz⁽⁷⁾ が

$$x = k \cdot t \cdot \sqrt{F} \dots\dots\dots (15)$$

こゝに k は恒數、 F は酵素量、 x は t 時間に分解した量を示す。なる式の成立する事を古くに述べて居るが、サッカラーゼに於ては諸家⁽⁸⁾の實驗の結果は一定時間内の反應物質量は直接酵素量に比例する事に一致して居る。即ち

$$x = k \cdot F \cdot t \dots\dots\dots (16)$$

即ち初速度を v とする時 $v = k \cdot F$ と云ふ様な關係になるのを見、速度が酵素と蔗糖夫々の濃度の積に比例すると云ふ均一系反應としての推論によく一致すると云ふて居るが、酵素反應は決して均一系の反應ではなく、實驗の結果その様に見えたのは外見上の問題であつたと考へる人⁽⁹⁾もあるが本實驗の結果の如く二段の型式を取る様に見えるものに就いてその關係は如何になつて居るかは興味ある事と考へる。

蔗糖濃度15%, $pH=4.2$, 温度 $37.0^\circ C$ でサッカラーゼ原液夫々5兪, 10兪, 13.5兪, 16兪, 18兪, 及び20兪を投入して反應せしめた實驗の結果は第五圖に示す如くである。實驗數値はサッカラーゼ原液5兪, 13.5兪及び20兪の三つの場合のみを第三表, 第四表及び第五表に掲げる。

7) E. Schütz; Z. physiol. C., 9, 577 (1885).
 8) C. O'Sullivan & F. W. Tompson; J. C. Soc. London, 57, 834 & 848 (1890).
 C. S. Hudson; Am. J. C. S. 39, 1664 & 1575 (1908).
 H. v. Euler & O. Svanberg; Z. physiol. C., 107, 269 & 275 (1919).
 R. Willstätter, J. Graser & R. Kuhn; Z. physiol. C., 125, 72 (1922).
 9) J. B. S. Haldane; Enzymes (1930).

(神前) 熱解析による酵素作用の研究

(原報) 77

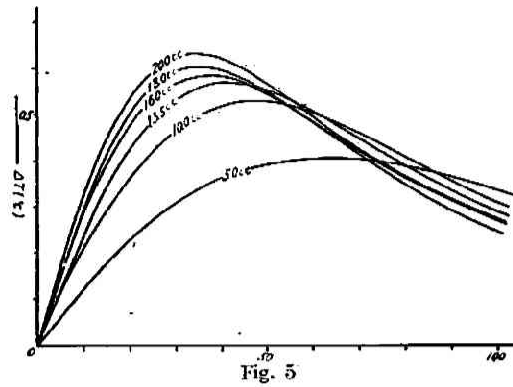


Table 3* Enzyme 5 c.c.

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|------|-------|-----------------|-------|-----------------|----------|-------|-------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.0242 | 2.058 | 5.0 | | 40.0 | 0.363 | 0.00370 | 1.797 | 5.4 | 0.01231 |
| 1.0 | 0.012 | 0.01242 | 2.096 | 5.1 | -0.02018 | 50.0 | 0.393 | 0.00206 | 1.623 | 3.9 | 0.01162 |
| 2.0 | 0.025 | 0.01242 | 2.139 | 5.2 | -0.02018 | 60.0 | 0.406 | 0.00080 | 1.423 | 3.5 | 0.01206 |
| 3.0 | 0.037 | 0.01242 | 2.177 | 5.3 | -0.02018 | 70.0 | 0.405 | 0.00077 | 1.193 | 2.9 | 0.01309 |
| 4.0 | 0.050 | 0.01242 | 2.220 | 5.4 | -0.02018 | 80.0 | 0.390 | 0.00195 | 0.949 | 2.3 | 0.01464 |
| 5.0 | 0.062 | 0.01242 | 2.260 | 5.5 | -0.02018 | 90.0 | 0.367 | 0.00263 | 0.760 | 1.8 | 0.01572 |
| 7.0 | 0.087 | 0.01242 | 2.341 | 5.7 | -0.02039 | 100.0 | 0.338 | 0.00301 | 0.603 | 1.4 | 0.01659 |
| 9.0 | 0.110 | 0.01212 | 2.366 | 5.8 | -0.01008 | 110.0 | 0.307 | 0.00312 | 0.483 | 1.1 | 0.01721 |
| 12.5 | 0.151 | 0.01141 | 2.382 | 5.8 | -0.00285 | 120.0 | 0.275 | 0.00306 | 0.389 | 0.9 | 0.01765 |
| 15.0 | 0.179 | 0.01084 | 2.379 | 5.8 | 0.00039 | 130.0 | 0.246 | 0.00417 | 0.111 | 0.26 | 0.01742 |
| 17.5 | 0.207 | 0.01030 | 2.381 | 5.8 | -0.00400 | 140.0 | 0.219 | 0.00389 | 0.069 | 0.16 | 0.01748 |
| 20.0 | 0.230 | 0.00942 | 2.311 | 5.6 | 0.01180 | 150.0 | 0.195 | 0.00375 | 0.015 | 0.03 | 0.01738 |
| 25.0 | 0.274 | 0.00791 | 2.203 | 5.4 | 0.01024 | 160.0 | 0.174 | 0.00323 | 0.002 | 0.005 | 0.01768 |
| 30.0 | 0.312 | 0.00658 | 2.107 | 5.1 | 0.00976 | | | | | | |

Table 4 Enzyme 13.5 c.c.

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|------|-------|-----------------|-------|-----------------|----------|-----|-------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.02473 | 4.098 | 10.0 | | 40 | 0.588 | 0.00083 | 1.990 | 4.8 | 0.02548 |
| 2.0 | 0.05 | 0.02473 | 4.260 | 10.4 | -0.02039 | 50 | 0.551 | 0.00319 | 1.269 | 3.1 | 0.03015 |
| 4.0 | 0.10 | 0.02473 | 4.424 | 10.8 | -0.02039 | 60 | 0.501 | 0.00584 | 0.666 | 1.6 | 0.03676 |
| 6.0 | 0.15 | 0.02410 | 4.482 | 10.9 | -0.00501 | 70 | 0.448 | 0.00589 | 0.485 | 1.1 | 0.03593 |
| 8.2 | 0.20 | 0.02316 | 4.480 | 10.9 | 0 | 80 | 0.387 | 0.00603 | 0.263 | 0.6 | 0.03945 |
| 10.3 | 0.25 | 0.02169 | 4.409 | 10.7 | 0.09471 | 90 | 0.332 | 0.00616 | 0.062 | 0.13 | 0.03950 |
| 15.3 | 0.35 | 0.01838 | 4.187 | 10.2 | 0.00819 | 100 | 0.284 | 0.00535 | 0.040 | 0.08 | 0.03962 |
| 21.6 | 0.45 | 0.01290 | 3.605 | 8.8 | 0.001604 | 110 | 0.244 | 0.00451 | 0.004 | 0.01 | 0.03980 |
| 30.0 | 0.532 | 0.00703 | 2.901 | 7.1 | 0.01979 | | | | | | |

* t は分を, ΔT は °C. を, $\frac{dT}{dt}$ は °C./分を, q は cal を, $\frac{dx}{dt}$ は モル/分 × 10⁴ を示してゐる。
以下各表は總て之と同じ單位の取方をした。

Table 5
Enzyme 20 c.c.

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|------|-------|-----------------|-------|-----------------|-----------|------|-------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.03551 | 5.884 | 14.4 | | 40.0 | 0.628 | 0.00422 | 1.350 | 3.3 | 0.04290 |
| 2.0 | 0.070 | 0.03551 | 6.111 | 14.9 | - 0.02039 | 44.0 | 0.607 | 0.00554 | 1.062 | 2.5 | 0.04461 |
| 4.0 | 0.140 | 0.03551 | 6.340 | 15.5 | - 0.02039 | 48.0 | 0.583 | 0.00644 | 0.835 | 2.0 | 0.04604 |
| 8.0 | 0.273 | 0.02728 | 5.410 | 13.2 | 0.03922 | 52.0 | 0.558 | 0.00656 | 0.734 | 1.7 | 0.04698 |
| 12.0 | 0.383 | 0.02467 | 5.337 | 13.0 | 0.02067 | 56.0 | 0.530 | 0.00712 | 0.550 | 1.3 | 0.05115 |
| 16.0 | 0.470 | 0.01978 | 4.810 | 11.7 | 0.02249 | 60.0 | 0.500 | 0.00767 | 0.381 | 0.8 | 0.05105 |
| 20.0 | 0.540 | 0.01496 | 4.238 | 10.3 | 0.02490 | 64.0 | 0.470 | 0.00828 | 0.165 | 0.4 | 0.05201 |
| 24.0 | 0.590 | 0.00935 | 3.474 | 8.5 | 0.02992 | 68.0 | 0.442 | 0.00818 | 0.086 | 0.2 | 0.05211 |
| 28.0 | 0.620 | 0.00558 | 2.947 | 7.2 | 0.03188 | 72.0 | 0.415 | 0.00795 | 0.022 | 0.05 | 0.05125 |
| 32.0 | 0.635 | 0.00196 | 2.396 | 5.8 | 0.03464 | 76.0 | 0.392 | 0.00768 | 0.003 | 0.003 | 0.05150 |
| 36.0 | 0.637 | 0.00041 | 2.010 | 4.9 | 0.03584 | | | | | | |

之等の結果を綜合する爲に $\frac{dx}{dt}$ の t=0 の値より、a' を、第六圖に示す $\frac{dx}{dt}$ -t 曲線から b を求め、更に k_1 及 a_1 を算出し、第七圖に示す $\frac{dx}{dt} - k_m$ 曲線から b_1 , c 及 a_2 を求めた。

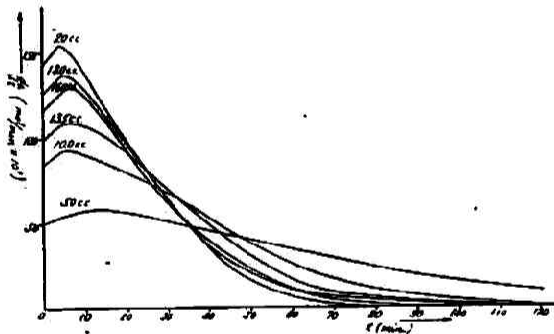


Fig. 6

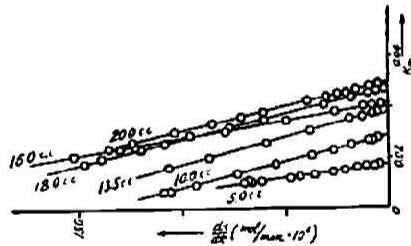


Fig. 7

その結果吾人の反應速度式

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \sqrt{a_1 + x} \quad (\text{初期})$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{b_1(a-x)}{a_2 - cx} \quad (\text{後期})$$

の各恒数は第六表に示す如くである。

先づ AB 部分に就いては k_1 は殆んど恒数と見られるが、酵表量の増加と共に平行して大となる傾向を見せて居る。 a_1 も同様に酵素量と殆んど平行して増加する傾向を示しては居るがやはり殆ど恒常と見做し得る。

CD 部分に就いては b_1 はやはり酵素量と殆んど平行して居るが、c には相當の振動はある

Table. 6

| Enzyme | $a'(\times 10^4)$ | $b(\times 10^6)$ | $k_1(\times 10^3)$ | $a_1(\times 10^2)$ | b_1 | c | a_2 |
|----------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------|------|--------|
| 5.0 c.c. | 5.0 | 1.00 | 1.41 | 1.24 | 0.018 | 1.12 | 1.0448 |
| 10.0 " | 8.5 | 1.87 | 1.93 | 1.92 | 0.029 | 2.00 | 1.0800 |
| 13.5 " | 10.0 | 2.03 | 2.01 | 2.44 | 0.040 | 2.08 | 1.0832 |
| 16.0 " | 11.7 | 2.63 | 2.29 | 2.60 | 0.042 | 1.36 | 1.0544 |
| 18.0 " | 12.6 | 2.63 | 2.29 | 3.00 | 0.048 | 2.00 | 1.0872 |
| 20.0 " | 14.4 | 2.80 | 2.36 | 3.68 | 0.050 | 1.02 | 1.0768 |

が定まつた方向への變化は見られない。 a_2 に就いては酵素量に關係なく殆ど一定の値を取つて居る。即ち b_1 は酵素量に關係する因子を含むが、 c 及び a_2 は酵素量には殆ど無關係な數である之を要するに b_1 は酵素量を F 、酵素量に無關係な恒數を b_1' とする時は $b_1'F$ とあらはし得る事が知られ、又 a_2 及 c は F には無關係な量である事が分つた。 k_1 は殆ど恒數と見得るが尙 $k_1'F$ とあらはし得る傾向を示し、 a_1 は同様の傾向ある如きも大體恒數と見做し得るを知つた。之の k_1 及 b_1 即速度恒數には相當すべき恒數が $k_1'F$ 、 $b_1'F$ とあらはし得る事は勿論同日には比較し得ないとしても、叙上の諸家の實驗の結果とその軌を一にするものと思はれる。

尙 AB 部分經過の時間は大體 4 分—5 分間で餘り時間的に長短の差を認めないが、唯酵素量の少い場合少しく長くなつて居るに過ぎない。BC 部分は最初の AB 部分に於ける $\frac{dx}{dt}$ が大きい程短く、その最も大きい場合には殆ど時間的の延長を有せず、寧ろ AB 部分より CD 部分への轉移點と考へられる様な傾向を示して居る。

(3) 蔗糖濃度と反應速度

蔗糖濃度と反應速度とに關しては古く Brown⁽¹⁰⁾は 5~40% の範圍内で反應速度は蔗糖濃度に平行して増加する事、即ち一次反應速度恒數が常に恒數として與へられる事からサッカラーゼに依る蔗糖の轉化も一次反應の要求する處を満足すると報じたが、その後の研究⁽¹¹⁾の結果反應速度は蔗糖濃度 5% 迄は一次反應式の要求通り、即ち $k_m = \text{const.}$ になる様に増加するがそれ以上の濃度では Brown の得た様な結果にはならない。然しその内でも 5~20% の範圍では $k_m \times c = \text{const.}$ (こゝに c は蔗糖濃度を % であらした數字を示す) と云ふ式に従ひ、反應速度は蔗糖濃度に關して 5% で最大値を示す事が見出された。之は如何にしても從來の一次反應の説明では満足に解釋出来ない。Nelson 及び Ingersoll⁽¹²⁾は反應系内の蔗糖及水の濃度を反應には與らない酒精で一部分置換する事に依つて變更して反應速度に對して水、蔗糖何れが主に影響するかを見た結果、蔗糖濃度 5% 以上では水の濃度が主に影響する事を認めた。それで Nelson⁽¹³⁾は之の一次反應の要求に従はない點、即ち反應速度に蔗糖濃度に關して最大値の存する事は水を考慮して、然も均一系の反應としてでなく、寧ろ吸着現象を主とする不均一系の反

10) A. S. Brown; J. C. Soc. London, 81, 373 (1902).

11) L. Michaelis & M. L. Menten; Bioch. Z., 49, 333 (1913).

J. M. Nelson & W. C. Vosburgh; J. A. C. S., 39, 790 (1917).

L. Michaelis; Biochem. Z., 115, 269 (1921).

12) J. M. Nelson & M. D. Schubert; J. A. C. S., 50, 2188 (1925).

C. D. Ingersoll; Bull. soc. chim. biol., 8, 264 & 276 (1926).

13) J. M. Nelson; Chem. Rev. 12, 1 (1933).

應として考へる時に良くその要求する處に適合すると云ふて居る。

扱て本實驗に於ては如何なる結果を得たか、酵素量を 13.5 兊, $pH=4.2$, 温度 $37.0^{\circ}C$. として蔗糖夫々 2 瓦, 4 瓦, 5 瓦, 7.5 瓦, 10 瓦, 12.5 瓦, 20 瓦, 25 瓦, 30 瓦及び 35 瓦を用ひて行つた實驗の結果は第八圖に見る如くである。

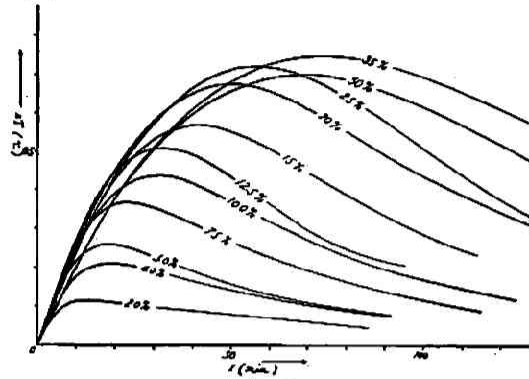


Fig. 8

實驗數値は蔗糖濃度 2%, 25% 及び 35% のみを第七表, 第八表及第九表に掲げ他は省略した。15% のものは前節酵素量 13.5 兊の處に掲げた。

Table. 7 Sucrose 2%

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|-----|------------|-----------------|-------|-----------------|----------|------|------------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.02055 | 3.405 | 8.3 | | 10.0 | 0.115 | 0.00205 | 0.714 | 1.7 | 0.17538 |
| 0.5 | 0.01 | 0.02055 | 3.436 | 8.4 | -0.04037 | 12.5 | 0.117 | 0.00011 | 0.362 | 0.8 | 0.19642 |
| 1.0 | 0.02 | 0.02055 | 3.469 | 8.5 | -0.04037 | 15.0 | 0.115 | 0.00100 | 0.208 | 0.5 | 0.20091 |
| 2.0 | 0.04 | 0.01758 | 3.042 | 7.4 | 0.13098 | 20.0 | 0.110 | 0.00167 | 0.080 | 0.15 | 0.16185 |
| 3.0 | 0.057 | 0.01593 | 2.825 | 6.9 | 0.09940 | 30.0 | 0.101 | 0.00187 | 0.019 | 0.04 | 0.09974 |
| 5.0 | 0.083 | 0.01088 | 2.073 | 5.1 | 0.12817 | 40.0 | 0.093 | 0.00183 | 0 | 0 | 0.07776 |
| 7.5 | 0.105 | 0.00640 | 1.401 | 3.4 | 0.13906 | | | | | | |

Table. 8 Sucrose 25%

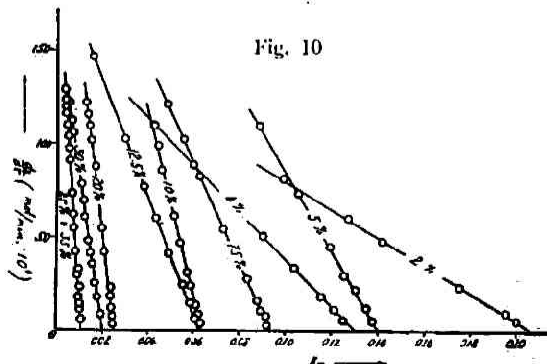
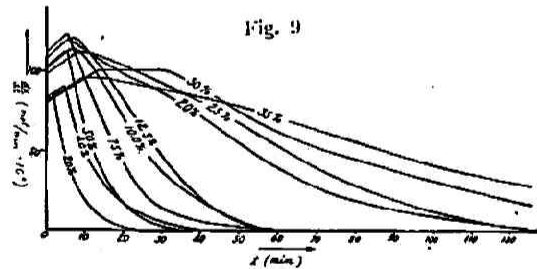
| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|------|------------|-----------------|-------|-----------------|----------|-------|------------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.02420 | 4.010 | 9.8 | | 32.0 | 0.60 | 0.01277 | 3.711 | 9.0 | 0.00410 |
| 2.2 | 0.05 | 0.02420 | 4.172 | 10.2 | -0.01853 | 37.3 | 0.65 | 0.00708 | 3.443 | 8.4 | 0.00440 |
| 4.0 | 0.10 | 0.02420 | 4.336 | 10.6 | -0.02267 | 45.0 | 0.70 | 0.00170 | 3.063 | 7.4 | 0.00508 |
| 6.1 | 0.15 | 0.02420 | 4.499 | 11.0 | -0.01942 | 55.0 | 0.725 | 0.00075 | 2.490 | 6.0 | 0.00597 |
| 8.1 | 0.20 | 0.02363 | 4.568 | 11.1 | -0.00501 | 65.0 | 0.715 | 0.00280 | 1.869 | 4.5 | 0.00723 |
| 10.3 | 0.25 | 0.02188 | 4.441 | 10.8 | 0.00897 | 75.0 | 0.675 | 0.00450 | 1.456 | 3.5 | 0.00781 |
| 12.7 | 0.30 | 0.02110 | 4.475 | 10.9 | -0.00416 | 85.0 | 0.623 | 0.00626 | 0.995 | 2.4 | 0.00902 |
| 15.1 | 0.35 | 0.01946 | 4.366 | 10.6 | 0.00358 | 95.0 | 0.535 | 0.00706 | 0.641 | 1.5 | 0.01025 |
| 17.8 | 0.40 | 0.01754 | 4.212 | 10.3 | 0.00496 | 105.0 | 0.482 | 0.00726 | 0.379 | 0.9 | 0.01161 |
| 20.8 | 0.45 | 0.01578 | 4.083 | 9.9 | 0.00462 | 115.0 | 0.412 | 0.00867 | 0.238 | 0.5 | 0.01245 |
| 24.0 | 0.50 | 0.01428 | 3.908 | 9.7 | 0.00401 | 125.0 | 0.347 | 0.00621 | 0.102 | 0.2 | 0.01462 |
| 27.0 | 0.55 | 0.01277 | 3.910 | 9.5 | 0.00379 | | | | | | |

Table. 9

Sucrose 35%

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|-------|------------|-----------------|-------|-----------------|----------|-------|------------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.02000 | 3.314 | 8.1 | | 85.0 | 0.737 | 0.00170 | 2.132 | 5.2 | 0.00833 |
| 1.25 | 0.025 | 0.02000 | 3.395 | 8.3 | -0.02435 | 95.0 | 0.712 | 0.00311 | 1.807 | 4.4 | 0.00932 |
| 2.50 | 0.050 | 0.02000 | 3.476 | 8.5 | -0.01217 | 105.0 | 0.675 | 0.00387 | 1.560 | 3.8 | 0.00994 |
| 3.75 | 0.075 | 0.02000 | 3.557 | 8.7 | -0.02435 | 115.0 | 0.634 | 0.00424 | 1.365 | 3.3 | 0.01026 |
| 5.00 | 0.100 | 0.02000 | 3.640 | 8.9 | -0.02435 | 125.0 | 0.589 | 0.00452 | 1.173 | 2.8 | 0.01070 |
| 6.25 | 0.125 | 0.02000 | 3.721 | 9.1 | -0.02435 | 135.0 | 0.542 | 0.00490 | 0.956 | 2.3 | 0.01148 |
| 7.50 | 0.150 | 0.02000 | 3.803 | 9.3 | -0.01217 | 145.0 | 0.594 | 0.00468 | 0.836 | 2.0 | 0.01162 |
| 10.00 | 0.200 | 0.01971 | 3.919 | 9.6 | -0.01632 | 155.0 | 0.450 | 0.00434 | 0.749 | 1.8 | 0.01160 |
| 12.50 | 0.250 | 0.01825 | 3.839 | 9.4 | 0.00706 | 165.0 | 0.407 | 0.00421 | 0.629 | 1.5 | 0.01197 |
| 15.00 | 0.300 | 0.01694 | 3.786 | 9.3 | 0.00393 | 175.0 | 0.365 | 0.00395 | 0.530 | 1.3 | 0.01222 |
| 20.0 | 0.375 | 0.01486 | 3.685 | 9.0 | 0.00465 | 185.0 | 0.328 | 0.00347 | 0.495 | 1.2 | 0.01197 |
| 25.0 | 0.444 | 0.01302 | 3.605 | 8.8 | 0.00437 | 195.0 | 0.295 | 0.00312 | 0.445 | 1.0 | 0.01190 |
| 30.0 | 0.506 | 0.01146 | 3.549 | 8.7 | 0.00421 | 205.0 | 0.265 | 0.00292 | 0.381 | 0.9 | 0.01208 |
| 35.0 | 0.560 | 0.01013 | 3.506 | 8.6 | 0.00377 | 215.0 | 0.237 | 0.00284 | 0.301 | 0.7 | 0.01266 |
| 45.0 | 0.646 | 0.00708 | 3.281 | 8.0 | 0.00534 | 225.0 | 0.210 | 0.00268 | 0.240 | 0.5 | 0.01312 |
| 55.0 | 0.705 | 0.00452 | 3.049 | 7.5 | 0.00580 | 235.0 | 0.183 | 0.00257 | 0.170 | 0.4 | 0.01408 |
| 65.0 | 0.735 | 0.00194 | 2.719 | 6.7 | 0.00692 | 250.0 | 0.146 | 0.00244 | 0.071 | 0.2 | 0.01687 |
| 75.0 | 0.745 | 0.00008 | 2.444 | 6.0 | 0.00750 | | | | | | |

之から求めた $\frac{dx}{dt} - t$ 曲線及び $\frac{dx}{dt} - k_m$ 曲線は次の第九圖及び第十圖に示す如くである。



以上の諸表及び諸圖から前に述べた如くにして吾人の速度式の恒数 k_1 , a_1 , b_1 , c 及び a_2 を求めれば第十表に示す如くなる。

之等の結果に就いて通覽するに、先づ AB 部分に関しては、 k_1 は最初 5% 迄は幾分増加する様であるが 5%~20% の間では全く一定の値を取り、それ以後は再び僅かに減少し居る。然し大體一定な値を取り蔗糖量には餘り關係しない様に見える。 a_1 は最初 7.5% 迄蔗糖量と平行して多少増加の傾向があるが、それ以後 20% 迄は増減あつて如何とも云ひ難いが、大體の傾向は漸減する如くである。20% 以後は k_1 と同様に漸減して居る。即ち k_1 は殆んど蔗糖濃度と關係は無いが、 a_1 は蔗糖量に影響され、然もその影響は蔗糖濃度

Table 10

| Sucrose | $a'(\times 10^4)$ | $b(\times 10^6)$ | $k_1(\times 10^3)$ | $a_1(\times 10^2)$ | b_1 | c | a_2 |
|---------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|--------|
| 2.0% | 8.3 | 1.60 | 1.79 | 2.16 | 0.207 | 13.20 | 1.0792 |
| 4.0 " | 8.3 | 1.60 | 1.79 | 2.16 | 0.120 | 7.76 | 1.0222 |
| 5.0 " | 10.3 | 2.03 | 2.01 | 2.60 | 0.140 | 4.64 | 1.0713 |
| 7.5 " | 11.3 | 2.03 | 2.01 | 3.12 | 0.094 | 3.68 | 1.0832 |
| 10.0 " | 10.2 | 2.03 | 2.01 | 2.56 | 0.064 | 2.00 | 1.0600 |
| 12.5 " | 10.9 | 2.03 | 2.01 | 3.48 | 0.063 | 3.12 | 1.1168 |
| 15.0 " | 10.0 | 2.03 | 2.01 | 2.44 | 0.040 | 2.08 | 1.0832 |
| 20.0 " | 10.8 | 2.03 | 2.01 | 3.44 | 0.025 | 1.04 | 1.0624 |
| 25.0 " | 9.8 | 1.77 | 1.88 | 2.72 | 0.011 | 0.32 | 1.0240 |
| 30.0 " | 8.0 | 1.60 | 1.79 | 2.00 | 0.020 | 1.20 | 1.1080 |
| 35.0 " | 8.1 | 1.60 | 1.70 | 2.04 | 0.011 | 0.32 | 1.0316 |

の稀薄なる場合を除外して蔗糖量の増加と共に漸減するのを見た。それで之の部分に關しては上述の諸家の結果と少しく軌を一にしない事を知つた。

CD 部分に就いては b_1 c 共に蔗糖量の小なる 7.5% 迄の範圍に於ては蔗糖量の増加と共に減少するが、それ以上の範圍では略恒數となるのを見た。又 a_2 は酵素量の場合と同じく殆んど恒常な値を示す事を知つた。

以上を要するに k_1 及び a_2 は殆んど蔗糖濃度に無關係な量で、 a_1 は 2%~7.5% の範圍を除外しては蔗糖濃度の増加と共に減少する。 b_1 及び c は蔗糖量の小なる場合を除きて凡そ蔗糖量に關係のない恒數と認められる。

次に AB 部分及び BC 部分の時間的關係を見るに AB 部分は 2 分乃至 12 分で最初の蔗糖濃度の小なる程短くなつて居る。又 BC 部分も蔗糖量の多い程長くなつて居て、蔗糖濃度の比較的小なるものでは殆んど瞬間的で時間的延長を認められなかつた。

(4) 水素イオン濃度と反應速度

水素イオン濃度のサッカラーゼに及ぼす影響は Sørensen⁽¹⁴⁾ の 52.5°C に於て及び Michaelis⁽¹⁵⁾ の 18.0°C に於て測定した報告があるが、前者の温度では恐らく サッカラーゼは破壊された事であらうから信用出来ない。後者によれば⁽¹⁵⁾ pH とサッカラーゼ作用とを圖示して見ると pH = 4.5 で最大値を示す恰も解離曲線の如き曲線を得られるから、サッカラーゼは pH = 4.5 が等電

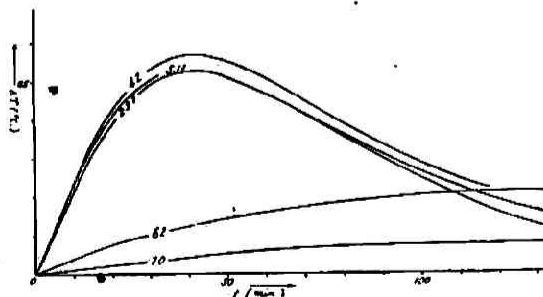


Fig. 11

點である兩性電解質で、然も解離しない部分が轉化作用に關係するので、pH が影響を及ぼすのであると云ふて居る。然しその後 Nelson⁽¹⁶⁾等は pH = 4.0 より酸性側ではサッカラーゼは著しく破壊作用を受けるから必しも Michaelis の云ふ如く等電點が好適點となると云ふ譯ではなからうと云ふて居る。然し乍ら之に代る完全な説明は今日尙發表されて居ない。

14) S. P. L. Sørensen; Bioch. Z., 21, 268 (1909).
 15) L. Michaelis & H. Davidson; Bioch. Z., 35, 386 (1911).
 16) J. M. Nelson & G. Bloomfield; J. A. C. S., 46, 1025 (1924).

(神前) 熱解析による酵素作用の研究

(原報) 79

本実験の結果を見るに、酵素量 13.5 兪, 蔗糖濃度 15%, 温度 37.0°C. で p_H を夫々 2.9, 4.2, 5.11, 6.2 及び 7.0 として反応させたがその結果は第十一圖に示す如くである。

實驗値は $p_H=7.0$, $p_H=2.9$ を第十一表及第十二表に掲げた。但し $p_H=4.2$ のものは第二節の酵素量 13.5 兪と同じである。

Table. 11

p_H 7.0

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|------|------------|-----------------|-------|-----------------|----------|-------|------------|-----------------|-------|-----------------|----------|
| 0 | 0 | 0.00110 | 0.182 | 0.4 | | 55.0 | 0.057 | 0.00072 | 0.304 | 0.7 | 0.00197 |
| 5.0 | 0.005 | 0.00110 | 0.197 | 0.4 | -0.01666 | 65.0 | 0.064 | 0.00065 | 0.316 | 0.7 | -0.00407 |
| 10.0 | 0.010 | 0.00110 | 0.213 | 0.5 | -0.04461 | 75.0 | 0.070 | 0.00051 | 0.311 | 0.7 | 0.00098 |
| 15.0 | 0.017 | 0.00110 | 0.236 | 0.5 | -0.02106 | 85.0 | 0.075 | 0.00028 | 0.289 | 0.7 | 0.00430 |
| 25.0 | 0.028 | 0.00110 | 0.273 | 0.6 | -0.01862 | 100.0 | 0.076 | 0.00010 | 0.263 | 0.6 | 0.00520 |
| 35.0 | 0.039 | 0.00110 | 0.313 | 0.7 | -0.01853 | 115.0 | 0.077 | 0.00008 | 0.263 | 0.6 | 0.00363 |
| 45.0 | 0.050 | 0.00091 | 0.313 | 0.7 | 0 | 130.0 | 0.078 | 0.00008 | 0.266 | 0.6 | 0.00253 |

Table. 12

p_H 2.97

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|------|------------|-----------------|-------|-----------------|----------|-------|------------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.02148 | 3.559 | 8.7 | | 25.0 | 0.430 | 0.01028 | 3.171 | 7.8 | 0.01899 |
| 1.25 | 0.025 | 0.02148 | 3.640 | 8.9 | -0.02435 | 30.0 | 0.493 | 0.00675 | 2.727 | 6.7 | 0.02189 |
| 2.30 | 0.050 | 0.02148 | 3.721 | 9.1 | -0.02900 | 35.0 | 0.517 | 0.00329 | 2.232 | 5.5 | 0.02543 |
| 3.50 | 0.075 | 0.02148 | 3.803 | 9.3 | -0.02526 | 40.0 | 0.527 | 0.00061 | 1.821 | 4.4 | 0.02803 |
| 5.0 | 0.108 | 0.02148 | 3.910 | 9.6 | -0.02720 | 50.0 | 0.510 | 0.00360 | 1.036 | 2.5 | 0.03519 |
| 7.5 | 0.161 | 0.02148 | 4.084 | 10.0 | -0.01632 | 60.0 | 0.465 | 0.00500 | 0.689 | 1.6 | 0.03630 |
| 10.0 | 0.215 | 0.02136 | 4.240 | 10.4 | -0.01632 | 70.0 | 0.413 | 0.00546 | 0.442 | 1.0 | 0.03766 |
| 12.5 | 0.267 | 0.01926 | 4.061 | 10.0 | 0.01567 | 80.0 | 0.357 | 0.00634 | 0.114 | 0.25 | 0.04173 |
| 15.0 | 0.312 | 0.01735 | 3.892 | 9.5 | 0.01537 | 90.0 | 0.302 | 0.00588 | 0.010 | 0.02 | 0.04656 |
| 17.5 | 0.355 | 0.01560 | 3.743 | 9.2 | 0.01627 | 100.0 | 0.251 | 0.00494 | 0 | 0 | 0.04782 |
| 20.0 | 0.391 | 0.01323 | 3.468 | 8.5 | 0.01588 | | | | | | |

之等から求めた $\frac{dx}{dt} - t$ 曲線及び $\frac{dx}{dt} - k_m$ 曲線は次に示す第十二圖及び第十三圖の如くである。

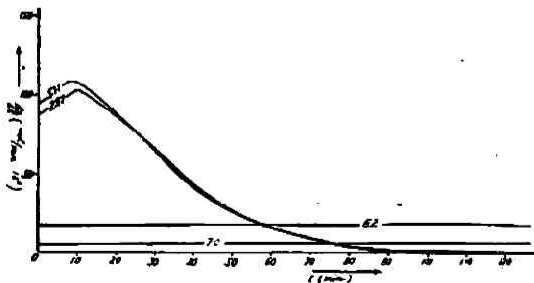


Fig. 12

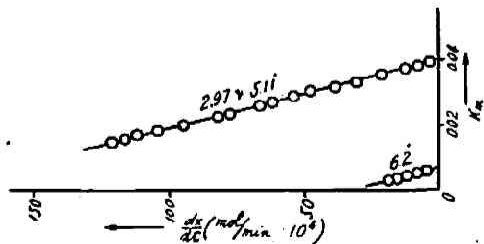


Fig. 13

以上の諸表及び諸圖から前に述べた様にして吾人の速度式の恒数 k_1 , a_1 , b_1 , c 及び a_2 を求むれば第十三表に示す如くなる。

Table 13

| pH | $a'(\times 10^4)$ | $b(\times 10^6)$ | $k_1(\times 10^3)$ | $a_1(\times 10^2)$ | b_1 | c | a_2 |
|------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------|------|--------|
| 7.0 | 0.4 | 0.03 | 0.21 | 0.32 | 0.007 | 2.08 | 1.08.2 |
| 6.2 | 1.6 | 0.03 | 0.21 | 5.12 | 0.007 | 2.08 | 1.0832 |
| 5.11 | 9.5 | 1.65 | 1.82 | 2.72 | 0.040 | 2.08 | 1.0832 |
| 4.2 | 10.0 | 2.03 | 2.01 | 2.44 | .0040 | 2.08 | 1.0832 |
| 2.9 | 8.7 | 1.87 | 1.93 | 2.00 | 0.040 | 2.08 | 1.0832 |

之等の結果を通覽するに先づ AB 部分に就いては k_1 は pH=5.11 迄は多少増減して 4.2 で最大値を示す様であるが大體一定に近い値を取つて居る。然しそれより大なる pH の値では著しく減少してゐる。 a_1 は pH=6.2 迄は漸増し、それ以後は pH=7.0 迄急激に減少して居る。

CD 部分に就いては b_1 は k_1 と類似の傾向で pH=5.11 迄は全く一定でそれ以後は激減してゐる。 c 及び a_2 は共に pH 如何に關せず一定の値を取つて居る。

之を要するに k_1 及び b_1 、即ち各部分の速度恒数とも云ふ可き數字は兩者とも殆んど同様の傾向を示してゐて pH=5.11 までは一定であるがそれより pH 増加する時、急に減少する事を見た唯その内でも緻細に檢すれば pH=4.2 に於て最も恒数が大である様あるが、之の差は極めて僅少で pH=2.0~5.11 の範圍内では殆んど水素イオン濃度には影響を受けない様に見える。又、 a_2 及 c は 2.9~7.0 の總ての範圍内で pH には無關係で、唯 a_1 が少しく複雑なる關係を示す如くであるが、之は寧ろ一定値の周圍に振動してゐると見るのが妥當の如くである。

それで主に k_1 及び b_1 に就いて考ふるに、之は Michaelis 等の云ふ如き解離曲線と少しく趣きの變つた傾向を示してゐる。それで之の様な結果になるのはサッカラーゼ精製の際に屢々見られる如く、又本實驗に於ても後に附録の部に掲げた第十八圖に示す如く、サッカラーゼを吸着剤に吸着或は脱吸着させる際に pH は相當な影響を及ぼす事、然もその影響の傾向の類似してゐる事から見て、サッカラーゼに依る蔗糖の轉化は均一系反應としてよりは寧ろ不均一系反應即ち吸着現象の結果であると考えらば強ち無理のない事と思はれる。

次に AB 部分及び BC 部分の時間的關係であるが、AB 部分は pH=2.9~5.11 では殆んど時間的の差無く、pH=6.2 及び 7.0 で著しく之の間が長い。BC 部分は pH=2.97~5.11 迄は殆んど時間的延長なく、pH=6.2~7.0 の間では相當長い、唯 pH=7.0 では CD 部分は見られなかつた。

(5) 温度と反應速度

温度との關係に就いては、古くから論じられてゐるが、平衡恒数は酸に依る分解の場合と同じく轉化熱が小さい爲に温度に依る影響は極めて少いが、反應速度は一方 van't Hoff の法則に依つて温度の上昇と共に増加するが他方温度の上昇するに従ひ熱に依る酵素の不活性化される爲に、酸分解に依る場合と違つて、温度に好適點を示す様になると云はれてゐて、之に關しては總ての人の考は一致してゐるが、⁽¹⁷⁾ その好適點に關しては確たる事は云はれないで、大體 55.0°C.⁽¹⁸⁾ と云はれてゐる。温度係數としては大體 30~40°C. の範圍内では 1.58⁽¹⁹⁾ と云ふ値が

17) W. M. Bayliss; Nature of Enzyme Action, 93 (1914).

18) J. B. S. Haldane; Enzymes, 65(1930).

19) H. v. Eutes & J. Laurin; Z. Physiol. C., 108, 64 (1919).

興へられてゐる。又サッカラーゼに依る反應に於ては Arrhenius⁽²⁰⁾の式に依つて算出した活性化熱 E の値は 8900 cal と云ふ値を示し酸に依つて加水分解せしめた場合の E = 25500 cal に比して著しく小さい事が知られてゐる。⁽¹⁹⁾

本研究に於ては 酵素量 13.5 耗, 蔗糖量 15 瓦, pH=4.2 で温度を 32.0°C., 35.0°C., 37.0°C., 38.0°C. 及び 42.0°C. に選んで實驗した。更に熱に依る不活性化の影響を同一にして置いて温

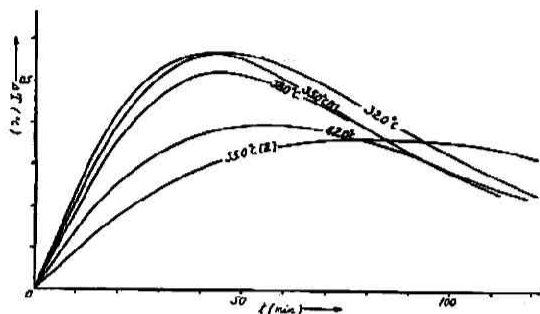


Fig. 14

度に依る反應速度の變化を見んとして、豫め 42.0°C に一時間保つた試料を 35.0°C で反應せしめてその結果を見た。全篇を通じて、35.0°C. (II) で示したのは之の實驗の結果をあらはす。之等の結果は第十四圖に示す如くであるが、37.0°C. に於ける實驗の結果は第二節の酵素量 13.5 耗の結果と全く同一である爲に省略した。

實驗數値は 32.0°C., 35.0°C. (II) の二つのみを掲げた。(第十四表及第十五表)。

Table 14.

32.0°C.

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|------|-------|-----------------|-------|-----------------|----------|-------|-------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.02137 | 3.541 | 8.7 | | 35.0 | 0.542 | 0.00550 | 2.679 | 6.6 | 0.01800 |
| 1.30 | 0.025 | 0.02137 | 3.622 | 8.9 | -0.02341 | 40.0 | 0.501 | 0.00236 | 2.222 | 5.4 | 0.02138 |
| 2.60 | 0.050 | 0.02137 | 3.704 | 9.1 | -0.02341 | 45.0 | 0.567 | 0.00004 | 1.856 | 4.5 | 0.02352 |
| 4.00 | 0.083 | 0.02137 | 3.811 | 9.3 | -0.02175 | 50.0 | 0.563 | 0.00130 | 1.622 | 3.9 | 0.02387 |
| 5.00 | 0.110 | 0.02137 | 3.899 | 9.6 | -0.04081 | 55.0 | 0.554 | 0.00230 | 1.426 | 3.5 | 0.02410 |
| 7.5 | 0.158 | 0.02137 | 4.057 | 10.0 | -0.01632 | 65.0 | 0.517 | 0.00480 | 1.891 | 2.1 | 0.02826 |
| 10.0 | 0.212 | 0.02137 | 4.232 | 10.4 | -0.01632 | 75.0 | 0.465 | 0.00540 | 0.623 | 1.5 | 0.03156 |
| 12.5 | 0.266 | 0.01992 | 4.169 | 10.2 | 0.00395 | 85.0 | 0.409 | 0.00554 | 0.415 | 1.0 | 0.03093 |
| 15.0 | 0.312 | 0.01746 | 3.911 | 9.6 | 0.01537 | 95.0 | 0.355 | 0.00521 | 0.286 | 0.7 | 0.03167 |
| 20.0 | 0.392 | 0.01434 | 3.656 | 9.0 | 0.01397 | 105.0 | 0.305 | 0.00537 | 0.104 | 0.25 | 0.03169 |
| 25.0 | 0.458 | 0.01135 | 3.375 | 8.3 | 0.01487 | 115.0 | 0.261 | 0.00495 | 0.022 | 0.06 | 0.03146 |
| 30.0 | 0.508 | 0.00786 | 2.959 | 7.2 | 0.01786 | 125.0 | 0.221 | 0.00420 | 0.009 | 0.02 | 0.03280 |

Table 15

35.0°C. (II)

| t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m | t | ΔT | $\frac{dT}{dt}$ | q | $\frac{dx}{dt}$ | k_m |
|-----|-------|-----------------|-------|-----------------|----------|------|-------|-----------------|-------|-----------------|---------|
| 0 | 0 | 0.00937 | 1.552 | 3.8 | | 35.0 | 0.264 | 0.00477 | 1.652 | 4.0 | 0.00438 |
| 1.0 | 0.008 | 0.00937 | 1.577 | 3.8 | -0.02018 | 40.0 | 0.287 | 0.00426 | 1.642 | 4.0 | 0.00386 |
| 2.0 | 0.017 | 0.00937 | 1.607 | 3.9 | -0.03045 | 45.0 | 0.307 | 0.00366 | 1.607 | 3.9 | 0.00384 |
| 3.0 | 0.028 | 0.00937 | 1.643 | 4.0 | -0.03045 | 50.0 | 0.324 | 0.00287 | 1.532 | 3.7 | 0.00522 |

20) Sv. Arrhenius; Z. physik. C., 4, 226 (1889).

| | | | | | | | | | | | |
|------|-------|---------|-------|-----|----------|-------|-------|---------|-------|-----|---------|
| 4.0 | 0.037 | 0.00937 | 1.672 | 4.1 | -0.03045 | 55.0 | 0.337 | 0.00215 | 1.454 | 3.5 | 0.00605 |
| 5.0 | 0.047 | 0.00937 | 1.705 | 4.2 | -0.03045 | 60.0 | 0.346 | 0.00171 | 1.411 | 3.4 | 0.00589 |
| 7.5 | 0.070 | 0.00937 | 1.779 | 4.5 | -0.01217 | 70.0 | 0.360 | 0.00092 | 1.327 | 3.2 | 0.00598 |
| 10.0 | 0.094 | 0.00906 | 1.807 | 4.4 | -0.01217 | 80.0 | 0.365 | 0.00016 | 1.217 | 2.9 | 0.00649 |
| 12.5 | 0.116 | 0.00846 | 1.779 | 4.3 | 0.00791 | 90.0 | 0.368 | 0.00026 | 1.141 | 2.8 | 0.00653 |
| 15.0 | 0.136 | 0.00803 | 1.773 | 4.3 | 0.00119 | 100.0 | 0.360 | 0.00060 | 1.075 | 2.6 | 0.00642 |
| 20.0 | 0.174 | 0.00733 | 1.781 | 4.3 | 0.00200 | 110.0 | 0.348 | 0.00152 | 0.883 | 2.1 | 0.00796 |
| 25.0 | 0.209 | 0.00644 | 1.748 | 4.3 | 0.00198 | 120.0 | 0.328 | 0.00198 | 0.742 | 1.8 | 0.00897 |
| 30.0 | 0.238 | 0.00548 | 1.683 | 4.1 | 0.00589 | | | | | | |

之から求めた $\frac{dx}{dt} - l$ 曲線及び $\frac{dx}{dt} - k_m$ 曲線は次の第十五圖及第十六圖に示す如くである。

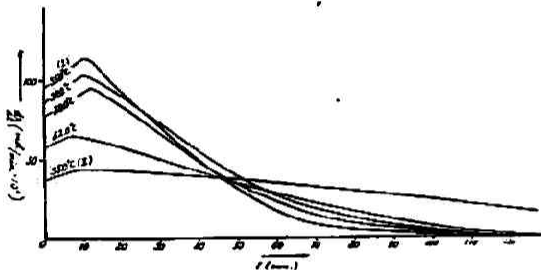


Fig. 15

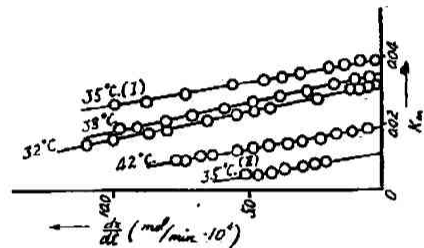


Fig. 16

以上の諸表及び諸圖から上述の如くにして吾人の速度式の恒数、 k_1 、 a_1 、 b_1 、 c 及び a_2 を求めれば第十六表の如くである。

Table. 16

| Temperature (°C.) | $a'(\times 10^3)$ | $b(\times 10^6)$ | $k_1(\times 10^3)$ | $a_1(\times 10^2)$ | b_1 | c | a_2 |
|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|-------|------|--------|
| 32.0 | 8.7 | 1.87 | 1.93 | 2.00 | 0.032 | 1.60 | 1.0640 |
| 35.0 (I) | 9.7 | 1.87 | 1.93 | 2.48 | 0.029 | 1.28 | 1.0512 |
| 37.0 | 10.0 | 2.03 | 2.01 | 2.44 | 0.040 | 2.08 | 1.0832 |
| 38.0 | 7.8 | 1.50 | 1.72 | 2.01 | 0.035 | 1.68 | 1.0672 |
| 42.0 | 5.8 | 1.12 | 1.49 | 1.48 | 0.019 | 1.28 | 1.0512 |
| 35.0 (II) | 3.8 | 0.80 | 1.26 | 0.80 | 0.011 | 1.28 | 1.0512 |

之等の結果を通覧するに AB 部分に就いては k_1 は 37.0°C. 迄は温度の上昇と共に増加してゐるが、それ以後は 38.0°C. 迄の間で急に減少した後 42.0°C. 迄漸減してゐる。然し細細に見れば既に 35.0°C. より幾分熱に依る不活性化が起り 37.0°C. ~ 38.0°C. の間で最もその影響強くそれ以後は漸次に不活性化が増加して行つて居る様に見える。 a_1 は 35.0°C. 迄増加しそれ以後は 37.0°C. 迄は稍減少し、37.0°C. ~ 42.0°C. の間で漸減して居る。然しその増減も大局から見れば察る一定値の上下に振動してゐると見られる程度のものである。

CD 部分に就いては b_1 は k_1 と同様に 37.0°C. 迄は漸増しそれ以後は急減して居る。然し細細に見るに既に 35.0°C. ~ 37.0°C. の間に於て熱に依る不活性化が見られてゐる。 c は殆んど温度に關係なく、多少の振動はあるが、よく一定の値を示してゐる。 a_2 も同様に殆んど一定の値を示してゐる。

之を要するに k_1 , a_1 , 及び b_1 は夫々略同様の傾向を示してゐて、何れの部分に就いても大體現今迄述べられて居ると同じ結果になつてゐる。唯、好適點が 37.0°C である事は少しく從來のものとは趣きを異にしてゐる。c 及び a_2 は温度に關係のある因子を含んでは居ない。

次に AB 部分及 BC 部分の時間的的關係であるが、AB 部分は 42.0°C . 及び 35.0°C . (II) では短いがその他の 32.0°C .~ 38.0°C . では殆んど温度に關係のない値を取つて居り、BC 部分は 35.0°C . (II) を除いた他は總て甚だ短い。

次に本實驗の結果から假に各部分に就いて k_1 及び b_1 即ち速度恒數とも云ふべき恒數の温度係數を求めて更にそれ等から Arrhenius の式に依る活性化熱 E を求めて見る。

| | | |
|-------|-------|------|
| 温度係數は | AB 部分 | 1.26 |
| | CD 部分 | 2.03 |

で、各 k_1 の間に幾分の差はあるが大體現今迄求められた値と大差はない。

| | | |
|-------|-------|-----------|
| 活化化熱は | AB 部分 | 4013 cal |
| | CD 部分 | 15175 cal |

で斯く之の値に距りのあるのは基より本實驗に於ては二段の全く異つた反應速度が與へられ、速度恒數も同一の因子を含んでゐる許りではないと考へられる事よりして、當然の事ではあるが、各 k_1 が假りに同型として見ても、4013—15175 cal で尙酸分解の際の 25500 cal に比して低い値にある事が分る。

即ち以上を綜合すれば温度に關係する範圍に於ては大體現今迄得られたものと同様の傾向を見た。

(6) 總 括

以上數節に分つて記載した結果を綜合するに次の如くなる。即ちサッカラゼに依る蔗糖の轉化は二つの段階から成り、第一の段階に關しては

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \sqrt{a_1 + x}$$

なる式が與へられ、然も、 k_1 は酵素量に比例する因子を含み、蔗糖量には殆んど關係は無いが水素イオン濃度に関しては pH が 2.9~5.11 の範圍内では略恒數であるが、 pH が 5.11~7.0 の間では非常に小さくなる事、又、温度に關しては好適温度を示す關係にある。 a_1 は酵素量に關係する因子を含まず、蔗糖量には 2%~7.5% の範圍を除き蔗糖量の増加と共に減少し、水素イオン濃度及び温度に關しては明かな方向を示して居ない。初期反應型持続時間は酵素量に殆んど關係なく蔗糖量に重大な關係を有し、蔗糖量が小さい程短いと云ふ結果を得て居る。水素イオン濃度に就いては、之が大で $\text{pH} = 6.2 \sim 7.0$ の如き場合、即ち非常に酵素の吸着能が妨げられて居る場合に短くなつて居る。又、温度に就いては、 42.0°C . で反應させたもの及び 42.0°C . で前處理した後 35.0°C . で反應させたもの、即ち何れにしても熱に依る不活性化を起させたものでは著しく短いと云ふ事を示した。

第二の段階は

$$\frac{dx}{dt} = b_1 \cdot \frac{a-x}{1+c(a-x)} \quad \text{或は} \quad \frac{dx}{dt} = b_1 \cdot \frac{a-x}{a_2-cx}$$

とあらはされ、 b_1 は酵素量には比例する因子を含み、蔗糖量には 2.0%~7.5% を除き殆んど無關係で、水素イオン濃度及温度に關しては上の k_1 と同じ傾向を有して居る。c は酵素量、水素イオン濃度及び温度には全然無關係で、蔗糖量には b_1 と同様に 2.0%~7.5% の範圍を除

き殆んど無関係である。a₀ は蔗糖濃度、酵素量、水素イオン濃度及温度の何れの条件にも全然無関係で、總ての場合に一定値を取つてゐる。

理論的考察

本実験の結果、蔗糖の轉化は從來考へられた如く一段階の反應ではなくて二段階の反應と考へられる事は既に前篇に於て詳述した如くで、その各段階に關しても既に詳細なる解析を施したのは上の如くである。之の様な事實は今迄に與へられてゐる反應速度式では如何にしても説明出來ない事で、之は前節に於ても少しく斷片的に觸れた如く、不均一系の反應として處理するならば説明され様と推察される。又實際酵素液は膠質系であつて決して均一系でないから均一系の反應として取扱ふ上に如何にしても無理の生ずる事は容易に了解される。

それで次に今迄考へられて居る均一系の反應としての考を離れて膠質系が接觸媒作用を演ずる反應として理論式を誘導して以上の實驗結果と一致するや否やを檢して見よう。

[I] 反應速度式の理論的誘導

先づ反應機構を次の様に考へて見よう。酵素の表面は Langmuir⁽²¹⁾ の考へる様な均一な吸着表面⁽²²⁾ でそれに蔗糖分子及水分子が単一分子層で吸着されて、その吸着された蔗糖及水は吸着の爲に活性化されて、夫等の間に反應が起ると考へる。而も蔗糖の吸着される割合の方が水のそれよりも遙かに大で、酵素投入前酵素表面は總て水分子で占有されてゐるが、投入された瞬間直ちに大部分は蔗糖で吸着されて終つて水は酵素表面から殆んど驅逐されて終ふ。然しそれ以後蔗糖の濃度が反應の進行と共に減少するに従つて次第に蔗糖の吸着されてゐる面積は減少して來ると考へる。それで最初蔗糖の量の極めて多い間は反應速度は主として吸着されて居る水に關係し、次第に蔗糖で吸着されて居る面積が減少してある割合以下になると反應速度は吸着されて居る蔗糖に關係して來るとして見る。而も水の吸着される場合には分子状態ではなく H⁺, OH⁻ と云ふ様に解離して吸着されるとして見る。

以上の様な機構で反應が進行すると考へて反應速度式を誘導して見よう。

先づ酵素の通算全表面積を S とする。之は酵素液の分散度及び酵素濃度に關係した量である。之の酵素表面の蔗糖分子及び水分子(最初簡單の爲に水分子と考へて計算して見る)に依つて吸着占領された面積の部分比を夫々 θ_s , θ_{H_2O} とする。然る時は反應速度は夫々、水に關係する部分では水は解離して H⁺ と OH⁻ になつて居るとしたから $S \cdot \theta_{H_2O}^+$ に、蔗糖に關係する部分では $S \cdot \theta_s$ に比例する。

θ_{H_2O} 及 θ_s は Langmuir の平衡に依れば夫々次の如くなる。

$$\theta_s = \frac{b_s C_s}{1 + b_s C_s + b_{H_2O} C_{H_2O}} \dots \dots \dots (17)$$

$$\theta_{H_2O} = \frac{b_{H_2O} C_{H_2O}}{1 + b_s C_s + b_{H_2O} C_{H_2O}} \dots \dots \dots (18)$$

21) J. Langmuir: J. A. C. S., 49, 1361 (1918).

J. Langmuir: Trans. Farad. Soc., 17, 621 (1922).

22) 金屬觸媒に對しては均一表面と考へる事はその後の研究に依り不充分で活性中心を考へるのが真いとされては居るが、こゝには嚴密な意味ではなく Langmuir の云ふ如くに考へて型式としては略一致するし、又本研究の結果ともよく一致する故之の簡單な假定を採る事とした。

こゝに b_s, b_{H_2O} は夫々蔗糖及水の吸着係数である。又 C_s, C_{H_2O} は夫々蔗糖及水の濃度である。

處が (17) 式及 (18) 式に於て $b_s \gg b_{H_2O}$ で C_{H_2O} は略恒數と考へられるから

$$1 + b_s C_s + b_{H_2O} C_{H_2O} \approx 1 + b_s C_s$$

故に式(17)は
$$\theta_s = \frac{b_s C_s}{1 + b_s C_s}$$

式(18)は
$$\begin{aligned} \theta_{H_2O} &= \frac{b_{H_2O} C_{H_2O}}{1 + b_s C_s} \\ &\approx \frac{b_{H_2O} C_{H_2O}}{b_s} \left(\frac{1}{b_s} - C_s \right) \\ &= \frac{b_{H_2O} C_{H_2O}}{b_s} \left\{ \left(\frac{1}{b_s} - a \right) + x \right\} \end{aligned}$$

(C_s は比較的小さい値であるから第二項以下を省略した)

となる。

之等の θ_s, θ_{H_2O} より前期の反應速度式は上記の假定より

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot S \cdot \sqrt{\frac{b_{H_2O} C_{H_2O}}{b_s}} \cdot \sqrt{\left\{ \left(\frac{1}{b_s} - a \right) + x \right\}} \dots\dots\dots (19)$$

となり、こゝに

$$\left. \begin{aligned} k \cdot S \cdot \sqrt{\frac{b_{H_2O} C_{H_2O}}{b_s}} &\equiv k_1 \\ \frac{1}{b_s} - a &\equiv a_1 \end{aligned} \right\} \text{と置く時は上記の實驗式(12), 即ち AB 部分の實驗式}$$

と全く同じ型式

$$\frac{dx}{dt} = k_1 \sqrt{a_1 + x}$$

と云ふ式を得て、理論式と實驗式とが良く一致して居る。

次に反應の後期に就いては同様にして

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= k' \cdot S \cdot \frac{b_s C_s}{1 + b_s C_s} \\ &= \frac{k' \cdot S \cdot b_s (a - x)}{1 + b_s (a - x)} \dots\dots\dots (20) \end{aligned}$$

となり、こゝに

$$\left. \begin{aligned} k' \cdot S \cdot b_s &\equiv b_1 \\ b_s &\equiv c \end{aligned} \right\}$$

と置く時は上記の實驗式(14)即ち CD 部分の實驗式と全く同型の

$$\frac{dx}{dt} = \frac{b_1 (a - x)}{1 + c (a - x)}$$

と云ふ式を得て、よく理論式と實驗式との一致するのを見た。即ち上述の如き吸着の機構から理論的に誘導した式はよく前に實驗的に得た反應速度式とその型式を同じくして居る事を知つた。それで次には前に實驗的に求めて吟味した恒數が理論式に於けるそれに相當する恒數の要求する様な關係を満足するや否やを検し同時にそれ等恒數の意味を少しく論じて見よう。

[II] 反應速度に関する理論式と實驗式の比較

(1) AB 部分

(i) 恒数の吟味

先づ前期反應に重要な關係を有する速度恒數に相當す可き $k_1 = k \cdot S \sqrt{\frac{b_{H_2O} \cdot C_{H_2O}}{b_a}}$ に就き論ずる。酵素量との關係を見るに $\sqrt{\quad}$ の中は恒數で、 S は酵素量に關係して居るから酵素量の増加と共に S 更に k_1 がある關係で平行して増加する事は背き得る事である。實驗の結果も殆んど恒數と云ひ得るが尙酵素量と平行して増加するの傾向を示して居る。蔗糖量に關しては關係する因子を含まない故全く無關係である可きで實驗の結果も殆んど無關係である。次に之が水素イオン濃度に關して $pH=5.11 \sim 7.0$ で非常に小さい事はどう考へられるか。之は恐らく S に關係するもので、即ち吸着される可き面積が $pH=5.11$ 以上では既に反應開始前に著しく制限されて終ふのでは無いかと考へられる。その制限される機構は以上の實驗のみでは俄かに決定出來ないが、熱處理に依つて表面積の制限されるのと同様な制限を受けるのでは無からうか。但し之の S の制限は果して分散度が影響さる爲に起るものであるか、將又分散度は不變でも表面が何等かの方法で障礙されて起るものかは此處には決定し難いが、唯一般に膠質系の性質から考へて恐らくその影響は分散度に及ぼされるのでは無いかと考へられる。

(ii) 時間的關係の吟味

次に之の部分には先に機構の條下に述べた如く、蔗糖の吸着面積が次第に減少してある割合以下になる迄繼續す可きであるから、その時間的延長は最初の蔗糖の吸着面積に關係する量である可きである。處が

$$\theta_s = \frac{b_{sa}}{1 + b_{sa}} = \frac{1}{\frac{1}{b_{sa}} + 1}$$

で θ_s は a が大なる程大になる事が分る。従つて AB 部分の時間は a が大である程それに平行して長くなる事を要求して居る。之は上記の實驗結果とよく一致して居る。酵素量に關しては關係する因子はない。水素イオン濃度及溫度に關しては先に k_1 に就いて論じた如く吸着面積が著しい制限を受けると考ふればよく實驗事實に符合する。

以上の如く、この實驗結果より檢索した AB 部分は理論的に導いた反應初期に於て蔗糖が吸着表面の大部分を占めて居る場合の反應速度式と良くその型式も恒數も又時間的關係も一致するのを見た。

(2) CD 部分

反應後期に重要な關係を有する速度恒數とも云ふ可き

$$b_1 = k' \cdot S \cdot b_s$$

であるが、 S なる因子を含む事に依つて酵素量の増加と平行して増加す可きである。之は實驗の結果もその通りである。次に蔗糖量に關しては如何。理論からは關係する因子を含まないが實驗結果も上記の如く蔗糖量の小なる場合を除外して殆んど恒數と見做し得る。又水素イオン濃度に關しては b_s は關係は無いが S がある故先に k_1 に就いて述べた如く水素イオン濃度に關して $pH=5.11 \sim 7.0$ では著しく S の制限される爲に減少する事になる。之もよく實驗事實と一致する處である。次に溫度に關しても k_1 に就いて述べた如く S を含む故に同様の變化を受けるものである。

[III] 結 論

以上論じた如くにして本篇に於て吸着現象を基として理論的に誘導した反應速度式の吟味の結果は上述の實驗成績の吟味の結果と全く良く一致するのを見た。即ち本研究の結果は初期の反應に對して今迄に見出されて居なかつた新しい反應速度の關係を見出し、それによく符合する説明を與へると共に、現在迄均一系の反應として満足に説明し得なかつたサッカラーゼに依る蔗糖の轉化反應に對して斷片的に唯推論されて居たに過ぎない不均一系の反應としての考察及び水の之等に對する影響をよく理論的に導いて反應の全經過を通じて満足なる解答を與へたものと信ずる。

摘 要

- 1) 比較的簡單なる方法を用ひてよく使用に耐ふる然も現在得られて居るものの中では相當純粹と思はれる時間價 0.25 なるサッカラーゼの分離精製に成功した。
- 2) そのサッカラーゼを用ひて行つた蔗糖轉化を熱解析せんとした。
- 3) 反應熱を計算して相當正確なる實測値 4.1 Cal per gm. mol を得た。
- 4) サッカラーゼ作用と酵素量、蔗糖濃度、水素イオン濃度及び溫度との關係を熱解析法で檢索した。
- 5) 熱解析の結果サッカラーゼに依る蔗糖轉化は初期に於ては $\frac{dx}{dt} = k_1 \sqrt{a_1 + x}$ 、後には $\frac{dx}{dt} = \frac{b_1(a-x)}{1-c_1(a-x)}$ と云ふ速度式に従ふ事を見た。
- 6) サッカラーゼの觸媒作用は膠質系の吸着現象に因るものと考へて理論的に誘導した反應速度式の結果は良く(4)及び(5)のそれと一致するのを見た。

附録 サッカラーゼの分離及精製

(1) 原 料

ユニオンビール會社西宮工場の下面醗酵酵母、即ち *Saccharomyces cerevisiae* を主なる部分とするもの、を數回洗滌、粗大なる夾雜物を除去して壓搾し、灰白卵色ゴム様の塊としたもの約 2 匁を使用した。之を檢鏡するに第十七圖の如き形狀、大きさを示し空胞等の退行性變化を認めず、蔗糖轉化の時間價⁽²³⁾を測定するに下記の如く 280.0 である。

$$R_{\max} = 17.72^\circ$$

10分間後 10.60°

15分間後 7.10°

旋光度を零とする迄に要した時間 25分
(爾後 t_z にて表はす)

所要乾燥量 560.0匁

23) サッカラーゼの純粹度の測定法としては C. O'Sullivan 及 F. W. Tompson の時間價 (J. C. Soc. London, 57, 834 (1890)), R. Willstätter 及 F. Racke の質量時間商 (Liebig. Ann., 425, 1 (1921)) H. v. Euler 及 O. Svanberg の轉化力 (Z. physiol. C., 107, 269 (1919)), R. Willstätter 及 R. Kuhn のサッカラーゼ單位及サッカラーゼ價 (Ber. deutsch. C. G., 56, 509 (1923)) 等が用ひられてゐるが本研究に於ては C. O'Sullivan 及 F. W. Tompson に従ひ時間價を用ひた。即ち蔗糖 4.0 匁を 1% 第一磷酸ソーダ溶液に溶解して 20.0 匁となし、酵素液 5.0 匁を加へて 15.5°C に於て反應せしめ 10 分後及び 15 分後に旋光度を觀測し、別に 5 匁中の乾燥量を測定して 50 匁の酵素を用ひて旋光度零迄分解するに要する時間を算出し、之の値を以て時間價とした。

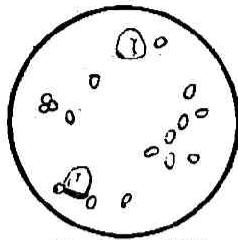


Fig. 17 (x200)

又、Nelson 及 Hitchcock⁽²⁴⁾に従ひ式(21), 即ち

$$t = \frac{1}{N} \left[\log \frac{100}{100-p} + 0.002642 p - 0.00000886 p^2 - 0.000001034 p^3 \right] \dots\dots\dots 21$$

を用ひて N を算出するに第十七表の示す如く、N は満足なる一致を示さず、彼等の所謂異常型と見られる事を知つた。

Table 17.

15% Sucrose Solution 100.0 c.c.
Enzyme Solution 20.0 c.c.
PH = 4.2, at 37.0°C.

| t | Hydsolyzed | N | t | lHydrolyzed | N |
|--------|------------|--------|---------|-------------|--------|
| 1 min. | 0.51% | 0.0092 | 40 min. | 78.5% | 0.0160 |
| 5 .. | 5.4 .. | 0.0098 | 50 .. | 87.8 .. | 0.0169 |
| 10 .. | 19.5 .. | 0.0108 | 80 .. | 92.3 .. | 0.0173 |
| 20 .. | 47.3 .. | 0.0121 | 100 .. | 96.5 .. | 0.0102 |

(2) 酵母のサッカラーゼ含有量の増加

原料の時間價大なる爲、時間價を小にして條件を良好にする目的で Euler 及 Svanberg⁽²⁵⁾の説く處に従ひ、酵母を下記養液中にて蔗糖を加へつゝ培養してサッカラーゼ含有量を高むるを得た。

養液としては Euler 等に依れば第一磷酸アムモニウム、第一磷酸加里及び硝酸マグネシウムを含める液を用ひて居るが、著者は更にグルタミン酸曹達及びオリザニンを加へた液を使用した處、下記の如く兩者共に加へた場合の成績が最も良好であるのを見、加之オリザニンを加へた場合には培養後検鏡の結果加へない場合に比較して退行現象を見る細胞が著しく少く、且つ長時間を経て測定してもサッカラーゼ作用に變化の無い事を知つた。

| I. | | II. | | III. | |
|------------------------------------|--------|--------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| 無機鹽類のみで、オリザニン、味の素を加へない場合 (27.0°C). | | オリザニンのみを加へた場合. (27.0°C.) | | オリザニン、味の素共に加へた場合. (27.0°C.) | |
| 時間價 | 220.0 | 時間價 | 180.0 | 時間價 | 165.0 |
| 10分間後 | 11.18° | 10分間後 | 9.70° | 10分間後 | 10.89° |
| 15分間後 | 7.90° | 15分間後 | 5.61° | 15分間後 | 7.50° |
| tz | 27.0分 | tz | 22.0分 | tz | 26.0分 |
| 乾燥量 | 407.0㍑ | 乾燥量 | 409.0㍑ | 乾燥量 | 317.0㍑ |

24) J. M. Nelson & D. I. Hitchcock: J. A. C. S., 43, 2632 (1921).
25) H. v. Euler & O. Svanberg; Z. physiol. C., 107, 269 (1919).
O. Svanberg; Z. physiol. C., 109, 65 (1920).
H. v. Euber & Ugglas; Z. physiol. C., 70, 279 (1910).

培養液中の鹽類に關しては Euler 等の報告の他, Fassnacht⁽²⁶⁾に依れば炭酸アモニウムの缺乏が, 又, Doby⁽²⁷⁾等に依れば加里, 磷或はマグネシウムの缺乏が, 培養せられた酵母中のサッカラーゼの量のみならず, 反應型式にも著しい影響を及ぼして異常型のサッカラーゼを産出すると報じて居るが, 本實驗に使用した酵母は *Saccharomyces cerevisiae* なるに拘らず含まれて居るサッカラーゼは上記の如く, 所謂異常型なる爲に之の間の吟味を止めて鹽類に關しては大體 Euler 等の言ふ處に従つた。

又, 培養温度に就いては 27.0°C. と 16.0°C. とを比較するに 16.0°C. に於て他の條件は上記 I と同様にして實驗せるに次の如く前者の優れる事を知つた。

| IV (16.0°C.) | |
|--------------|--------|
| 時間價 | 260.0 |
| 10分間後 | 10.0° |
| 15分間後 | 6.15° |
| 比 | 23.0分 |
| 乾燥量 | 565.0g |

以上の結果より考へて著者は Euler 等の方法を少しく改良した次の如き方法に従つて酵母を培養してサッカラーゼ含有量を高めんとした即ち 1 瓶の酵母をその 1 立中に

| | |
|------------|------|
| 第一磷酸アモニウム | 2g |
| 第一磷酸加里 | 2g |
| 硝酸加里 | 1g |
| 結晶硝酸マグネシウム | 1g |
| 味の素 | 2.5g |
| 三共オリザン液 | 2.5g |

を含む養液 20 立中に浮遊し 27.0°C. に保ちつゝ通氣攪拌し, 20% の蔗糖溶液を一時間約 150 轉の速さにて添加し乍ら, 約 72 時間後に一同攪拌を中止し, 傾瀉して養液を新にした。斯の如き方法にて培養した後のサッカラーゼ時間價は上記 III に示す如く 165.0 であつて, 培養前の時間價 280.0 に比較して相當サッカラーゼ含有量の増加したのを見た。培養後檢鏡所見は培養前と著しき差を認めなかつた。

(3) 自己消化

酵母細胞中に含まれてゐるサッカラーゼを酵母細胞より分離して溶液に移行せしめる爲には以前は酵母を乾燥してその儘⁽²⁸⁾ 或は砂と共に⁽²⁹⁾ 水にて抽出し, 或は 100°C. で乾燥して蛋白質を不溶解性として後抽出する⁽³⁰⁾ 等の方法が試みられてゐたが C. O. Sullivan 及 F. W. Tompson⁽³¹⁾ が室温で酵母を放置して一部分自己消化するのを待つて抽出すると云ふ方法を發

26) Fassnacht; cited from J. M. Nelson, Chem. Rev., 12, 1 (1933).

27) G. v. Doby & R. H. Hibbard; Bioch. Z., 176, 165 (1926)

G. v. Doby & Z. I. Kertez; Z. physiol. C., 189, 177 (1930).

G. v. Doby & E. Fehér; Z. physiol. C., 196, 89 (1931).

28) E. Fischer; Z. physiol. C., 26, 60 (1898).

29) L. Michaelis; Bioch. Z., 7, 488 (1907).

30) M. Barth; Ber. deutsch. C. G., 11, 474 (1878).

31) C. O. Sullivan & F. W. Tompson; J. C. Soc. London, 57, 834 (1890).

表して後は専ら之の自己消化の法が用ひられる様になり、その後諸家の研究に依り、種々の方法が夫々材料の経歴如何、又その後の処置の種類如何に依つて考案せられて居る。多くは短期間でトルオール、醋酸エチルエステル、クロ、ホルム、第二磷酸アムモニウム等の細胞毒を加へて自己消化時間を短縮し、或は稀釋した浮游液を中性⁽³³⁾或は酸性⁽³⁴⁾にて自己消化せしめ、或は比較的稀釋しない浮游液を中性で極めて急速に自己消化せしめて居るものもある。⁽³⁵⁾又、自己消化開始後最初の一時間に分離されるサッカラーゼ含有量少き液を去つてそれ以後の自己消化液を集めると云ふ分別自己消化法の有效なる事を主張せる報告もある。⁽³⁶⁾之等は總て短期間であるが Willstätter⁽³⁷⁾ は等量の水で稀釋して約半年間自己消化して有效であつた實驗を報告してゐる。

以上何れの報告に依るも總て酵母に水を加へて自己消化せしめてゐる。本實驗に於ては爾後の操作の必要上、酒精にて沈澱せらる可き水溶性含窒素化合物を能ふる限り少量に含み、然もサッカラーゼ含有量のなる自己消化液を得る目的で自己消化に依つてサッカラーゼを酵母基質より遊離するのみならず、更に自己消化液中に夾雜物として存在する蛋白質を殆んど完全に分解せんとし、酵母を壓搾してゴム様となしたるものに水を加ふる事なしに、第二磷酸アムモニウムの粉末となしたるものを加へて捏ね、液化せしめ、後トルオールを加へて防腐し、自己消化の結果酸性となる爲にサッカラーゼの被害及び蛋白質分解酵素の作用の阻害される事⁽³⁸⁾は加へた第二磷酸アムモニウムの緩衝作用に依つて防ぎつゝ約 20.0°C. の室温にて三ヶ月間放置した。

(4) 酒精沈澱

前節の操作に依つて自己消化したる酵母の殘骸を傾瀉に依つて除き母液を Glasfilter で濾過し、濃褐色透明な自己消化液約 1.5 立を得た。反應はリトマス中性で、その時間價は次の如く 120 であつた。

| | |
|-------|--------|
| 10分間後 | 8.75° |
| 15分間後 | 4.41° |
| tz | 20.0分 |
| 乾燥量 | 300.0g |

之の自己消化液から酵母ゴム質以外の夾雜物を比較的効果的に除去する爲に、Willstätter 及び Schneider⁽³⁹⁾ の酒精沈澱操作の詳細なる注意に従つて二回次の如くにして酒精沈澱を行つた。

先づ自己消化液の約百分ノ一容量の一規定醋酸を加へて $pH=4.6$ とした。その際極めて輕微な蛋白質に依る沈澱を生ぜる爲に之を濾過澄明となして攝氏零度に冷却した。之の沈澱は轉化力を殆んど有して居なかつた。之に豫め -20°C. に冷却した酒精を等容量加へた。 $pH=4.6$ としたのは之に依つてサッカラーゼを酒精の害作用から保護する爲である。⁽⁴⁰⁾冷却したのは酒精

32) C. S. Hudson; J. A. C. S., 31, 1564 (1908).

33) R. Willstätter & F. Racke; Liebig. Ann., 425, 1 & 45 (1921).

34) C. S. Hudson & H. J. Paine. J. A. C. S., 32, 774 (1910).

35) R. Willstätter & K. Schneider; Z. physiol. C., 142, 257 & 266 (1924/1925).

36) R. Willstätter, K. Schneider & E. Bamann; Z. physiol. C., 147 248 (1925).

37) R. Willstätter & K. Schneider; Z. physiol. C., 142, 257 (1925).

38) R. Willstätter; Proc. Roy. Soc. London. 111B, 282 (1932).

39) R. Willstätter & K. Schneider; Z. physiol. C., 133, 193 (1924); 142, 257 (1925).

40) R. Willstätter, K. Schneider & E. Wenzel; Z. physiol. C., 151, 12 (1925).

の存在に於てはサッカラーゼが極めて熱に對して敏感なる爲に酒精と水との混合に依る温度の上昇を除く爲である。酒精注加の際には黒褐色の粘稠なる沈澱及び帶黄灰白色の沈澱を生じたが、之等を傾寫に依つて大量の母液より別ち、後、Büchner 氏漏斗に豫め熱處理を施した硅藻土を以て約2耗の厚さの濾過層を作つたもの數個を用ひて出來得る限り短時間(平均約20分間)内に酒精を含んだ母液より分離し、尙充分に乾燥しない間に(之は沈澱を乾燥する迄放置する時は水に不溶性の轉化力を有する物質に變化するからである)先づ少量の蒸餾水に溶解して、更に蒸餾水を加へて最初の自己消化液の約 $\frac{1}{4}$ 容量とし、その際生じた不溶解性の黒褐色の澱沈を濾過に依つて分離し黄褐色透明の溶液を得た。斯くして得た液の時間價を見るに28.5であつて、

| | |
|-------|-------|
| 10分間後 | 7.85° |
| 15分間後 | 2.90° |
| tz | 18.0分 |
| 乾燥量 | 77.0疋 |

極めて微弱にトリプトファン及びチロジンの反應を與へ、ニンヒドリン反應は殆んど陰性であるが、酵母ゴムに對する Salkowski 氏反應⁽⁴¹⁾は極めて著明に陽性であつた。

之に更に一規定の醋酸約百分ノ一容量を加へて pH=4.6 とした。之の際は前回と異り沈澱は最早生じなかつた。之に前回同様の方法で酒精を加へ、生じた帶黄灰白色の沈澱を迅速に半乾燥の儘原液の約 $\frac{1}{4}$ 容量の蒸餾水に溶解し、溶解しない部分を濾別し去つて、淡帶褐黄色の透明なる液を得た。その液の時間價は次の如くにして 15.0 で、

| | |
|-------|-------|
| 10分間後 | 9.30° |
| 15分間後 | 5.10° |
| tz | 15.0分 |
| 乾燥量 | 35.5疋 |

ニンヒドリン反應は陰性、トリプトファン及びチロジンの反應殆んど陰性で、Salkowski 氏反應は前回同様強陽性であつた。

以上二回の酒精沈澱の結果、酵母ゴム質を除く他の夾雜物を比較的完全に除去し得た。然もこの二回の操作の間に失はれたサッカラーゼ量は全量の約 20% であつた

(5) カオリン吸着

前節迄の操作に依つて得られた酵素液の主なる不純物は酵母ゴムである。酵母ゴムの除去には従來種々の方法が用ひられて居るが、大別すれば醋酸鉛を用ふる方法、カオリンを用ふる方法及び礬土を用ふる方法の三つである。醋酸鉛を用ふる方法⁽⁴²⁾は本實驗にある如き酵母ゴム質以外の夾雜物を含む事の少い酵素液には應用し得ない。又、實際試みて見たが効果を擧げ得なかつた。

カオリン⁽⁴³⁾にて吸着する際には従來酵素及び酵母ゴム以外の夾雜物をカオリンに吸着して酵母ゴム質より分離する分法が用ひられ、その場合酵素のカオリンに依る不活性化を防ぎ、又濾出の際サッカラーゼを脱吸着し易からしめる爲にはカオリンを豫め濃鹽酸にて處理する事を

41) E. Salkowski; Z. physiol. C., 61, 1 (1909).

42) C. S. Hudson; J. A. C. S., 30, 1160 (1908).

43) R. Willstätter & F. Racke; Liebig. Ann., 425, 1 (1920/21).

R. Willstätter & K. Schneider; Z. physiol. C., 133, 200 (1924).

要し、且精製せらる可き酵素液が酵母ゴム質以外の夾雑物を相当多量に含有し、尙餘りにサッカラーゼ含有量の大でない比較的稀釋した溶液である事を必要なる條件としてゐる。之等の條件の中前者は容易に満足し得るが、後者は本實驗の酵

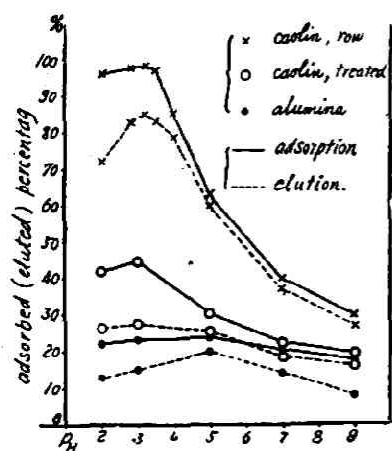


Fig. 18

液素の有する條件とは相容れない條件である。又、約 $\frac{1}{3}$ 重量の吸着剤を加へ0.3%アムモニア水にて脱吸着せしめた豫備實驗の結果も第十八圖に於て○で示す如く應用し得る様な結果を得て居ない。

次に纂上にて除去する際には⁽⁴⁴⁾カオリンにて前處理して酵母ゴム質を少くせる後に行へるものもあるが之は上に記す如き理由に依つて徒らにサッカラーゼの損失を多くするのみで濃厚なるサッカラーゼ液を多量得る爲には用ひられない。直接吸着する方法は數回の吸着を反覆する事を要し、各回毎に酵素の損失のみ大で、又完全に酵母ゴム質を除去する事が困難である。實際本酵素液を用ひ Willstätter 及 Kraut⁽⁴⁵⁾に依りて最

も安定有效にして且つ常に恒常な性恒質の生成物を作り得ると云はれてゐる纂上じを酵素液の $\frac{1}{3}$ 重量加へ吸着せしめた後、0.3%アムモニア水にて脱吸着せしめた試験の成績を見るに第十八圖に於て○で示す如く甚だ吸着率が低い。

然るに著者は酵素液中に前處置を施さない市販のカオリンを投入せるに母液中の Salkowski 氏反應の全く消失する事、カオリンは吸着後約60分間は相當強き蔗糖轉化作用を示す事、約30分間以内に稀薄アムモニア水にて浸出する時はサッカラーゼを殆んど完全に脱吸着せしめ得る事(第十九圖參照、縦軸に脱吸着後の收量を吸着前の酵素液に對する百分率で示し、横軸に吸着後の時間を分で示したが、30分間迄は大體徐々に減少するが、それよりは急激に減少して、1時間後には殆んど恒常になる。之と平行してカオリン吸着物は20分後位から次第に粘着性を増し、60分後には吸着直後のカオリンとは全く性質の違つた糊泥様のものとなるのを見た。)、及びカオリンに吸着した酵母ゴム質は再び通常の方法に依つては脱吸着し得ない事を確め得た。

即ち、前處理を施さないカオリンに依つて酵母ゴム質は再び如何なる方法を以てしても脱吸着し得ない程強固に吸着され、爲にカオリンは恰も被覆された如く共に吸着せらる可き酵素の強く吸着される事及び不活性化される事を妨げ、従つて酵母ゴム質以外の夾雑物を含む事極めて少く、且つ酵素含有量相當大なる酵素液より酵母ゴムを除去する目的には前處理せざるカオリンは最適である事を知り得た。尙前處理せざるカオリンで吸着する際の pH に關しては豫備實驗に依つて第十八圖に於



Fig. 19

44) R. Willstätter & K. Schneider; Z. physiol. C., 142, 288 (1924).
 H. v. Euler & K. Josephson; Ber. deutsch. C. G., 56, 445 & 453 (1923).
 R. Willstätter & H. Kraut; Ber. deutsch. C. G., 56, 149 & 1117 (1923).
 45) R. Willstätter & H. Kraut, Ber. deutsch. C. G., 56, 1117 (1923).

て×で示す如く脱吸着後の収量は $p_{H}=3.2$ に於て最も多い事を知つた。

依つて著者は上記の要項に従ひ次の如き方法でカオリン吸着を行ひ酵母ゴム質の除去並に前回の操作に依つて尙除去し得なかつた含窒素化合物を除去する事を得た。先づ中性淡帯褐色の酵素液に一規定醋酸を約 $\frac{1}{2}$ 容量加へて $p_{H}=3.2$ になる如くした。上記の如く之の酸度が吸着に最も好適である事を見たからである。次に之に 100 耗酵素液に對し約 20 瓦のカオリンを加へた。カオリンは市販の黄色のものを二回 0.3% アムモニア水にて洗滌、次に數回蒸餾水にて洗滌したものを用ひた。カオリンを加へて約 5 分間振盪後母液より分離し、五回水洗後 0.3% アムモニア水を原液の略 $\frac{4}{5}$ 容量迄加へて強く振盪し濾過に依つてカオリンを除き淡黄色透明な液を得た。カオリン投入より之迄の時間は上記の理由に依つて 30 分を超過しない様に注意した。次にアムモニア浸出液を約 12 時間水流ポンプにて吸引しアムモニア瓦斯を驅逐し、更に 2 日間濾過を用ひて透析して次節に示す様な性質を有した液約 700 耗を得たが、之を以て酵素原液とした。之の (5) の操作に依つて失はれたサッカラーゼ量は僅かに原量の約 20% であつた。

(6) 酵素原液の性状

透明、淡黄色、リトマス中性、施光力を有せず、Salkowski 氏反應、ニンヒドリン反應、Millon 氏反應、Adamkiewicz 氏反應及び鹽素水に依るトリプトファンの反應總て陰性である。そのサッカラーゼ時間價は次に示す如く 0.25 であつて、之は全實驗期間中(約三ヶ月間)數回檢したが少しも差を見なかつた。

| | |
|-------|-------|
| 10分間後 | 7.35° |
| 15分間後 | 2.10° |
| 12 | 15.0分 |
| 乾燥量 | 0.7耗 |

20 耗中の乾燥物質量は 2.9 耗で灰分は 1.75% であつた。又蛋白質、脂肪を分解する性質を有せず、更に澱粉、麥芽糖を分解する能力も無く、サッカラーゼ作用は α -メチルグルコースに依つて少しも影響されない。

以上の所見から考へて之の酵素原液は比較的純粹に近い β -h-フルクトシダーゼであつて、 α -グルコシダーゼを全く含⁽⁴⁶⁾まないものと考へられる。要約するに現在得られてゐる最も時間價の小さいのは Willstätter の報告に⁽⁴⁷⁾かゝる時間價 0.1 のものであるが、之は毎常得られた譯では無く、又實際之を用ひて實驗を施行し得る程多量に得られては居ない。本研究のサッカラーゼは時間價は 0.25 で少しく彼のものに劣るとは云へ相當多量に得られた事、又現在迄のサッカラーゼ液に比して著しく夾雜物の少い事から見て充分應用し得る方法を提供したものと考へられる。即ち培養に依つて時間價を比較的小さくした酵母を全然稀釋する事なしに中性で長期間放置して得た自己消化液を二回酒精沈澱に依つて精製後直接前處理しないカオリンに吸着せしめ稀薄なアムモニア水で脱吸着せしめると云ふ簡単な操作に依つて相當優秀なる精製の効果を擧げ得る事を知つた。

尚こゝに一言費し度きは本章第一節に記載した方法で Nelson 及 Hitchcock⁽⁴⁸⁾兩氏の恒數 N を求めて見ると第十八表に示す如く寧ろ異常型と思はれる結果を示してゐる。彼等⁽⁴⁸⁾に依れば

46) R. Weidenhagen: Erg. Enzymforsch., 1, 168 (1932); 2, 90 (1933).

47) R. Willstätter, K. Schneider & E. Wenzel: Z.physiol. C., 151, 1 (1926).

48) J. M. Nelson: Chem. Rev. 12, 1 (1933).

Saccharomyces cerevisiae から得たサッカラーゼで異常型に属するものは非常に不安定で、長時間その活性を一定に保つ事が出来ぬと云ふが、現在本実験に用ひたサッカラーゼは三ヶ月間少しもその時間價に変化を見ず、又約二ヶ月間を隔てて反復した同一條件の實驗に於ても實驗誤差範囲を超ゆる些少の差異も認め得なかつた點先づ彼等の云ふ所に首肯し難い處を見る。尙更

Table. 18

15% Sucrose Solution 100.0 c.c.,
Enzyme Solution. 20.0 c.c.,
pH=4.2, at 37.0°C.

| t | Hydrolyzed. | N | t | Hydrolyzed | N |
|--------|-------------|--------|--------|------------|--------|
| 1 min. | 5.9% | 0.0408 | 5 min. | 59.7% | 0.1004 |
| 2 " | 20.3 " | 0.0572 | 10 " | 88.6 " | 0.1050 |
| 3 " | 34.9 " | 0.0653 | 15 " | 96.9 " | 0.1067 |
| 4 " | 48.4 " | 0.0882 | 20 " | 98.0 " | 0.0887 |

に彼等に依れば正常型は α -メチルグルコシードに依つて約 73—80% に抑制されるが異常型は影響少く、假令抑制されても 60% 以下に止ると云ふ。之は本實驗のサッカラーゼも α -メチルグルコシードで全然影響されない故、よく彼等の報する處に一致する様に見えるが、果して之はサッカラーゼとしては異常型であらうか。一步進んで考へるならば、サッカラーゼ即ち α -グルコシダーゼを含まない β -D-フルクトシダーゼが α -メチルグルコシードに依つて正常型では抑制されると云ふ事が甚しく論理に反する如くであり、又實際サッカラーゼは α -メチルグルコシードで影響されない事は既に幾多の研究者が報告してゐる⁽¹⁰⁾。要するに彼等の説く處は直ちに採用し難い點を含む故、現今の状態に於てはそれに拘泥するを要しないと信ずるものである。

終りに臨み本實驗を行ふに當り、終始御熱心御懇篤なる御指導を賜りたる堀場先生に滿腔の謝意を表す。尙本研究の研究費に就て帝國學士院の補助を得たり。こゝに感謝の意を表す。

昭和九年七月

京都帝國大學物理化學研究室に於て