Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-06-23

Taka-α-Amylaseに関する研究（第1報）：結晶化に関する因子について

吉村，貞彦
田中，昭

(Citation)
兵庫農科大學研究報告．農芸化学編,2(1):11-16

(Issue Date)
1955-12

(Resource Type)
departmental bulletin paper

(Version)
Version of Record

(JaLCDOI)
https://doi.org/10.24546/81008142

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/81008142

Taka-α-Amylaseに関する研究（第1報）

結晶化に関する因子について

吉村貞彦，田中　昭（食飼化学講座）

Studies on the Taka-α-Amylase (Part. 1)

Factors influencing on its crystallization.

Sadahiko YOSHIMURA and Akira TANAKA.

緒　　言

従来，酵素の結晶化は温度，pH，沈澱剤濃度等の条件が極めて適当な時のみ可能であると考えられて来た.[1]

しかし，これらの条件にはどの程度の許容範囲があるかという事についての研究はあまり見当らない．例えば，pH 6.0で最もよく結晶化する酵素は，それより酸性及びアルカリ性に移動するに従つて結晶化は困難となるであろうが，それでは一般にどの程度の範囲内ならば結晶化は可能なものであろうか．酵素の結晶化Rangeの検討は，その精製上の意義は兎も角としても，酵素がpHの変化と共に，どういうような行動をとるかという事を推定する上に役立つものと考えられる．例えば，蛋白質の結晶格子形成には分子中に存在する電気的分極が重大な役割を有する事が知られている.[2] そうすると，分極の変化を結晶化に還元し得る事となり，結晶化の状態図より分極の程度を窺い得る．しかし，このような点に関しては今後幾多の詳細し研究に依たねばならない．

又，性質のよく分つた酵素につき，その性質と結晶化のRangeの間の相関関係を明らかにして置けば，将来，未知の酵素の結晶化を試みる際，その結晶化許容範囲を推定する上に非常に役立つ．筆者等は以上のやうな観点に基き，比較的性質の明かなTake-α-Amylaseにつき結晶化の条件を調べ，その化学的性質との関連性について検討した．

実　験　の　部

1）結晶性 Taka-α-Amylase の抽出

市販タカジアスターゼより赤堀の方法[3]に準じて結晶状に抽出した．

2）活度の測定

荻原の澱粉沃度反応を用うる方法[4]によつた．但し識別点は全く沃度反応の陰性となる点を採用した．

3）窒素の測定

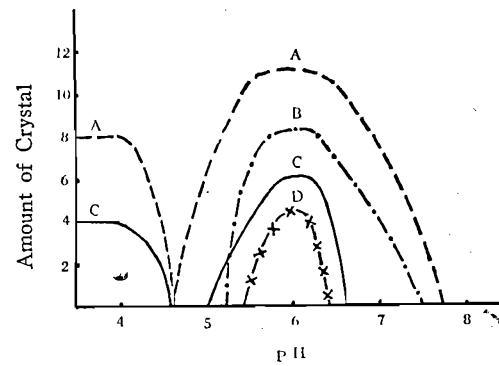
常法通り三塩化醋酸沈澱物につき，Micro-Kjeldahl法で蛋白態窒素を測定した．

〔実験 I〕 結晶化に及ぼす pH の影響

a）実験方法

再結したTaka-α-Amylase(以下Amylaseと略記する)の結晶を，$\frac{M}{50}$ $Ca(AC)_2$ pH 6.0に溶解し，酵素液(Prot. N/cc = 5.0 mg, $D^{37°}_{30'}$ = 12,500) として用いた．酵素液1 cc に種々の pH の $\frac{M}{2}$ Acetate buffer 1 cc づつを加え，所期pHにadjustしたものを，常法通りAcetoneで結晶化せしめた．12時間後の結晶生成量を比濁的に測定した結果を次に示す (Fig. I)

Fig. I　Influence of pH on the Crystallization of Taka-α-Amylase



AA′; Shaked at 20°C, mother cryst. not added.
B;　Stood at 3～4°C, mother cryst. added.
CC′; Stood at 20°C, mother cryst. not added.
D;　Stood at 3～4°C, mother cryst. not added.

b）実験結果

この条件下では何れも活度の損失は大して認められなかつた†．pH*が同一でも温度により結晶化の状況は異る．又，温度により結晶化可能のpH範囲にも著しい差が認められた．すなわち，3～4°C 附近の低温では pH 5.6

† 20° C, pH 4.0以下では若干の活度の測少があつた．
* pHは使用したBufferのpHを示す。以下本論文中結晶化のpHはすべて加えたBufferのpHとする．

～6.2の間にのみ結晶化が認められたが，20℃ では pH 5.0～6.4 迄の範囲内であると結晶化は可能である．低温で結晶化の Range がせまいのは，蛋白分子の拡散速度が小さい為，結晶核が生成し難い故と考えられ，微量の種結晶の添加により著しく結晶化の Range の拡大を示した．更に結晶化の Range は 20℃ では低温の時に比べ主として酸性側に，低温で結晶種を添加した場合には無添加の時に比べ主としてアルカリ側に拡がるようである．更に興味のある事実は，20℃ 附近で結晶化を行うと，低温では見られなかつた pH 4.4以下に新しい結晶化の曲線がみられる事である．Amylase は pH3.6附近に等電点をもつ酸性蛋白と考えられているから，[5] pH 3.6附近では等電蛋白として存在し，それよりアルカリ側に移動するに従つて塩の形として存在する部分が多くなると考えられる．従つて pH 4.6 附近に底を有する二つの曲線は，Amylase がそれぞれ等電蛋白及び塩の形として結晶化したものと考えられ，実際 Ca を定量した結果[6]はこの推論に一致する．以上で明らかなように，少くとも該アミラーゼに関しては，結晶化の pH-Range は従来云われた如き範囲のせまいものではなく，かなりの範囲を有するものである事が明らかにされた．

なお，20℃ に於て Shaker で振盪しながら結晶化せしむると，結晶化の Range は更に拡大するが，これについては又後章で述べる．

〔実験 II〕 結晶化に及ぼす温度の影響

一般に蛋白質を結晶として得る場合，これを結晶化温度という点から分類すれば，三種類に大別される．

1) 温時溶解後放冷乃至除々に冷却

2) 温時結晶化　　3) 低温結晶化

第一の方法は温時溶解度が大で，且，安定な蛋白質又は酵素――エデスチン，[7] ペプシン等[8]――の結晶化に用いられる．第二の方法は，冷時よりも温時溶解度が低い例外的な蛋白質の結晶化に見られ，血清アルブミン[9]又は bushy-stunt-virus[10] の結晶化がその例である．第三の方法は，その他大多数の蛋白質又は酵素の如き，温時変性の危険が感ぜられる時に用いられる．Amylase も従来第三の場合に属するとして，氷室内で結晶化されて来た．[3] では Amylase の如く低温で結晶化が行われてきたものは，比較的温度が高い場合には全く結晶化しないものであろうか．又酵素の変性の起る温度と，結晶化が不可能になる温度との関係はどうであろうか．筆者等はこのような点を明かにする為本実験を試みたのである．

a) 実験方法

再結した Ca 塩結晶を $\frac{M}{50}$-Ca(AC)$_2$ に溶解し(pH6.0, Prot. N/cc＝7.15mg)アセトン存在下，1 夜0℃から30℃に至る種々の温度に保ち，結晶化の状況を観察した．

b) 実験結果

結晶化は0℃より27℃ 迄は可能である．20℃ 以上になると一部分の蛋白が変性を起す為か，不溶性無定形沈澱を分離する．この傾向は温度の上昇と共に著しくなり，30℃になれば最早結晶は析出しない．しかし，この状態に於ても顕著な活度の減少はない．この変性蛋白が Amylase に帰因するものか，不純物乃至は Amylase分子内の不要性部分によるものかは明かでない．結晶化は0℃ 附近の如き低温では起り難く，20℃附近迄は温度の上昇と共に容易になるようである．25℃附近からは不溶性沈澱分離が顕著となり，結晶の生成も再び困難となる．結晶は温度が高い程大きいものが得られる．又，温度が高い程結晶化可能 pH Range が拡大する事，及び等電蛋白としても結晶化が可能となる事は既に示した．以上示した如く，少くとも Amylase に関しては，結晶化可能の温度範囲も極めて広いものであり，失活が起らぬ程度の温度ならば結晶化は可能と考えられた．

〔実験 III〕 結晶化に及ぼす酵素濃度の影響
（又は沈澱剤濃度の影響）

一般に酵素溶液に沈澱剤を添加して結晶化を行う際，結晶化に最も適した沈澱剤濃度があると考えられる．酵素溶液に沈澱剤を添加して，かすかに混濁の生ずる時，その沈澱剤濃度が丁度この Opt. に一致するならば，最もよく結晶化が起る．その際，酵素溶液は無定形沈澱に対しては丁度飽和した状態になつているが，結晶に対してはなお過飽和であると考えられるから，その差だけが結晶として析出される．今，酵素溶液を稀釈して結晶化を試みる場合，白濁点迄沈澱剤を加えるには稀釈前よりも同一容量に対して多量の沈澱剤が必要なわけで，その分だけ沈澱剤濃度は Opt より高くなり，結晶化は起り難くなる．ではどの程度迄の稀釈液からは結晶化が可能であろうか．筆者等はこのような観点に立つて実験を試みた結果を次に示した．

a) 実験方法

再結した Amylase の結晶を $\frac{M}{50}$-Ca(AC)$_2$ pH6.0 に溶解，同液に対して充分透析しアセトンを完全に除いた酵素液 (Prot. N/cc＝3.340mg. $D_{30'}^{37°}$ ＝ 9.018　pH＝6.0) を Sample とした．

この酵素液を1ccから0.1cc.迄種々の量だけとり，$\frac{M}{50}$ Ca (AC)$_2$ を加えて全体を1ccとし，稀釈酵素液とした．上記稀釈液を常法通り氷室内でアセトンにより結晶化せしめ，結晶生成可能の限界を調べた結果を次に示した．

b) 実験結果

第一表に依ると Prot. N/cc 1.34mg すなわち蛋白濃度として0.9%程度では結晶化は可能であるが，Prot. N/cc ＝0.67mg，蛋白濃度として0.44%となれば，もはや結晶

Table 1. Relation between the Concentration of Taka-α-Amylase and its Crystallization.

Sample mixture	Amylase solution, cc	1.00	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1
	Water added, cc	0	0.2	0.4	0.6	0.8	0.9
	Prot.-N/cc	3.34	2.67	2.00	1.34	0.67	0.33
	Amylase, %	2.23	1.78	1.33	0.89	0.44	0.22
	Acetone, %	35.8	36.0	37.5	41.0	42.5	45.6
Amount of crystal formed, after ( ): trace of mother crystal added	1.5hrs.	trace (+)	+ (+)	− (trace)	− −	− −	− −
	4.0hrs.	+ (++)	++ (++)	trace (+)	trace (+)	+ (trace)	− −
	24.0hrs.	++++ (++++)	+++ (+++)	++ (++)	+ (+)	(trace)	(trace)

しない．結晶種を添加した場合には蛋白濃度として0.22%程度でもなおわずか結晶の増殖を認め得る．その際の Aceton 濃度は約45%であり，赤堀[3]が結晶化の完結に用いた濃度と一致する．又，Amylase は5〜10%程度の濃厚溶液からでも容易に結晶化するから，結晶化可能な酵素濃度も亦かなり広い事が明らかとなつた．

〔実験 IV〕 結晶化に対する不純物の影響

A) 無機塩類の影響

蒸溜水に難溶で，塩類溶液に溶解し易い酵素の結晶，例えば牛肝カタラーゼ[11]，納豆菌プロテアーゼ[12]が比較的塩類濃度が稀薄な際，結晶化し易い事は容易に首肯し得る．それでは，アミラーゼの如く，塩類溶液のみならず，蒸溜水に対してもよく溶解するものはどうであろうか．

筆者等が実験した所によると，活性を害せず且アセトンにより沈澱を生じないような無機塩類は結晶化を妨害しないようである．例えば，$\frac{M}{2}$ Acetate buffer 中でも Amylase は容易に結晶化する．又，後述の如く，蛋白質の如き複雑な有機物ですら，或程度以上分解されると殆ど阻害現象を呈さない事実からも一層明らかとなる．但し Amylase と共存する無機塩類により結晶化沈澱剤濃度に変化を起し，且その無機イオンの塩類となつて結晶化する事はあり得る．例えば，Amylase を $Ca(AC)_2$ 中で pH 6.0で結晶化すると針状の Ca 塩となるが，$Ca^{\cdot\cdot}$ 不充分の状態で $Na^{\cdot}$ の濃度を増加して行くと盤状結晶（恐らく Na 塩であろう）になり易い．Ca含量定量の結果もこの推論に一致する[6]．Amylase 濃度約2%の時，$\frac{M}{50}$ Ca $(AC)_2$ 及び $\frac{M}{4}$ NaAC 中に於ける結晶析出アセトン濃度はそれぞれ35%及び45%である．

B) 蛋白質及びその分解産物の影響

結晶の単離操作上に於て．実際上最も問題となるのは，蛋白質であろうと考えられるが，精製酵素中に不純物として含まれる蛋白質は必ずしも原材料中の形態そのまゝとは考えられない．それは混在する Protease や，操作上に用うる試薬類による変性蛋白や，分解産物等を含むからである．筆者等はこれら蛋白質や，その分解産物等が，酵素の結晶化に及ぼす影響を調べる為，蛋白質の代表として casein を選び，それを硫酸で各種段階に分解したものの Amylase の結晶化に及ぼす阻害作用を調べた．

a) 実験方法

casein-hydrolysate の調整：市販カゼインを H_2SO_4 で煮沸分解し，$Ba(OH)_2$ で中和したものを Total N/cc = 5.0mg に調整し，casein-hydrolysate とした．なお以下 F.N/T.N は Formol N/Total N を表わす．

酵素液：二回再結した Amylase の結晶（Ca塩）を $\frac{M}{50}$ $Ca(AC)_2$ (pH 6.0)に溶解，酵素液(Prot. N/cc = 5 mg, $D^{37°}_{30'}$ = 12,500) とした．酵素液0.5ccに対し，casein-hydrolysate をそれぞれ第二表に示した如く加え，$\frac{M}{50}$ Ca $(Ac)_2$ にて全体を1ccとし，然る後，これらの混合液を3〜4°Cに於て，shakerで振盪しながらアセトンで結晶化せしめた．振盪結晶化に関しては後に詳しく記すが，この方法により与えられた条件に正確に response せしめた．（実験V参照）なお振盪数は一分間150回とした．

b) 実験結果

蛋白質は分解度が進むにつれて急速に結晶化妨害作用を減少するようであつた．例えば，未分解の cesein(F.N/T.N = 0.030) は窒素として2〜4%(Amylase-N に対し) 程度で著しい阻害作用を示した (Table. 2-a) が，25% H_2SO_4 で 10分間分解したもの (F.N/T.N = 0.146) は約40%，25% H_2SO_4 で 90分間分解したもの (F.N/T.N = 0.399) は約80%としなければ同程度の阻害現象を示さない．更に35% H_2SO_4 で45時間分解したもの (F.N/T.N = 0.592) では同量加えても全く結晶化を妨げる事はなかつた．実際問題として，F.N/T.N = 0.399 程度分解されたものは硫安によつても全く塩析されないから，除去は容易であり，大して問題とならない．F.N/T.N = 0.300 以下となると acetone は勿論，硫安によつても塩析されるようになるから，結晶化の母液中に挾雑してくる可能性があり，酵素の結晶化を阻害する事は Tab. 2-b に示す通りである．

然し，casein の結晶化妨害作用は，その分解度の増加と共に著しく減じ，F.N/T.N = 0.146のもの (casein 1分

Table 2-a. Inhibitory Action of admixed Casein on the Crystallization of Taka-α-amylase.
(These experiments were carried out by mixing the varying quantities of the casein or of casein-hydrolysate listed in the tables with 0.5 cc amylase solution (Prot. N/cc = 5mg, $D^{37°}_{30'}$ = 12,500) and made up the respective mixture to 1 cc with water; pH = 6.0)

Crystallization after, hrs.	Casein solution (N = 5 mg/cc), cc					
	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0
3	−	−	−	−	−	++
15	−	−	−	+	++	++++
50	−	−	−	++	+++	+++++

Table 2-b. Inhibitory Action of admixed Casein-hydrolysate on Crystallization of Taka-α-amylase.

Hydrolysis-condition			Crystallization after, hrs,	Casein-hydrolysate (N = 5 mg/cc), cc					
H_2SO_4	Duration	F.N./T.N.		0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
35%	45 hrs.	0.592	3	++	++	++	++	++	++
			15	++++	++++	++++	++++	++++	++++
			50	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
25%	1½ hrs.	0.399	3	−	−	−	trace	+	++
			15	−	++	++	+++	++++	++++
			50	−	+++	+++	++++	+++++	+++++
25%	10 min.	0.146	3	−	−	−	−	trace	++
			15	−	−	−	trace	+++	++++
			50	−	−	trace	++	++++	+++++
Control, unhydrolyzed		0.030	3	−	−	−	−	−	++
			15	−	−	−	−	−	++++
			50	−	−	−	−	−	+++++

子が4〜5個に分解したものと考えられるですら，その阻害力は$\frac{1}{10}$〜$\frac{1}{20}$程度である．従つて，実際の結晶単離操作に於ける蛋白質分解物の影響は，それがあまり多くない限り，原蛋白質に比べて無視し得るのではないかと考えられた．

〔実験 V〕 結晶化に及ぼす振盪の影響

物理的な刺戟が結晶化を促進するという事は古くより知られ，結晶化が困難な際，一般にガラス棒で器壁を摩擦するか，或は攪拌する操作はよく用いられる処である．筆者等の実験によると，酵素の結晶化の場合，器壁の摩擦程度の刺戟では大して効果がない場合が多かつた．連続的な攪拌は効果的であつたが，多量の酵素液を必要とする缺点がある．Na を Natrium-Magnesium-Uranyl-Acetate の結晶として分離定量する際，反応液を shaker で振盪すれば静置する場合に比べてより迅速，確実に定量値に達する事が報告されている[13]．この振盪結晶化法を酵素の結晶化に応用し得るかを確めた．即ち，Amylase を pH，温度，濃度等の条件を一定にし，不純物含量のみを少しづつ変化させた状態で結晶化せしめた処，純度が高い場合でも，必ずしも早く結晶化が始まらない場合がある事を見出した．この際，少量の結晶種を添加して置くか，Shaker で振盪を行うと，結晶化は迅速になるのみならず，更に確実に純度に比例するような結果を得た．この事は，酵素の結晶化，特に結晶核の生成に於て，物理的な刺戟が重大な影響を及ぼす事を意味する．以上のような事実より，結晶析出に及ぼす振盪の効果は明らかであるが，振盪結晶化法を実際問題としてとり入れる際，その影響を一層具体的に知つて置く事は有意義と考えられたので，これに関し行つた実験結果を次に示す．

i) 結晶化可能 pH Range との関係

Amylase 溶液を 3〜4°C で静置して結晶化せしめる場合，その Ca 塩としての結晶化可能範囲は pH5.6〜6.2であり，20°Cでは pH 5.0〜6.4 と Range を拡大する事は既に示した．（実験 I 参照）これに対し，20°Cで振盪を行うと pH-Range は一層拡大し，Ca 塩として pH 4.8〜7.4 迄は結晶化可能となつた．一方，Amylase を等電蛋白として結晶化させる時には，振盪により pH 3.6〜4.4 なる Range は変らないが，結晶化は速くなる事が知られた．（実験I参照）

ii) 結晶化開始までの時間との関係

Amylase を Ca 塩及び Na 塩として結晶化する際，最適条件下では30分以内に結晶化が始まる．このように，結晶化が容易な場合にはこれを更に振盪してもあまり効果が認められなかつた．しかし，条件が不適当で結晶化が困難な際には著しい効果を示した．第三表は温度が高く，結晶化が困難な際でも，振盪すれば容易に結晶化する事を示す．又，Rivanol-Amylase complex の無定形沈

Table 3. Influence of Shaking on the Crystallization of Taka-α-Amylase. (27°C)

Conc. of Enzyme: Prot.-N/cc	Acetone %	shaked			not shaked		
		1.5 hrs.	6.0 hrs.	20.0 hrs.	1.5 hrs.	6.0 hrs.	20.0 hrs.
2.5 mg	37	trace trace	+ + +	+ + + + +	− −	− −	trace trace
	35	− −	trace trace	+ +	− −	− −	− −
5.0 mg	37	trace trace	+ + + + + +	+ + + + + + + + + +	− −	− −	+ + + +
	35	− −	+ + +	+ + + + + + +	− −	− −	trace trace
	33	− −	− −	− −	− −	− −	− −

澱は，これを少量の$\frac{M}{2}$ Acetate buffer pH 6.0 にとかし，濃厚溶液として，室温又は氷室内に放置するだけでも，1〜2日後には結晶状に析出する事もあつたが，確実とは言えない．この様な場合この溶液に振盪結晶化法を採用した処，2〜3時間以内で確実に結晶化せしめ得ることを明らかにし得た．

以上の二実験結果は Amylase の結晶化に於て，その溶液を振盪する事は啻にその結晶化速度を増大するだけでなく，更にその溶液の結晶化可能 pH Rangeを拡大し得る事を示し，かゝる事実が Amylase 以外の酵素の結晶化にも適用し得るとすれば，意義深いものと考えられた．

一般に酵素は溶液の状態よりも沈澱の方が安定とされている．従つて，酵素の結晶化を比較的不安定な状態で試みなければならない場合でも，大部分の酵素が沈澱として存在し，結晶化の進行と共に沈澱が結晶に変るという形式をとる事が出来れば比較的安全である．然るに，このような方法は従来行われているように静置して結晶化するような場合には，沈澱から結晶への移行速度は小さく，無定形沈澱のまま残留する可能性が多い故そのまゝ用いる事は出来ない．然し，微量の結晶種を混ずる Amylaseの無定形沈澱は，振盪により容易に結晶に変化するから，振盪結晶化法を用いる際には，酵素を母液中に一時沈澱として貯えるという事も可能となり，酵素を操作中に於ける破壊から相当に保護し得る事が考えられる．

Amylase を等電蛋白として結晶化させる場合，前述したように20°Cに於て，$\frac{M}{4}$Acetate buffer pH 4.0附近で行うが，このような条件は，Amylaseにとつては殆ど変性の限界点に近いものと考えられる．今，アセトン濃度を約45%とし振盪を行うと，数分後には多量の無定形沈澱（恐らく等電沈澱）を生じ，約1.5時間後に結晶化が始まり，更に数時間振盪を続けると Amylase の無定形沈澱は全部結晶に変る．この間活度の減少は殆ど認められない．すなわち，Amylase は本操作中殆どすべて沈澱の状態で存在するから，このような変性し易い条件下でも比較的安定に存在し得ると考えられた．

以上，酵素の結晶化に際し振盪法の有利であると考えられる諸点について述べたが，この方法により得られる結晶は極めて微細で遠心沈澱法で分離し得ない場合もあつた．従つて酵素の結晶性純品を直接得るためにこの方法は望ましくなく，結晶化の困難な際，その mother crystal を得る目的，或は結晶化の条件を決定する場合等に有効な手段であると考えられた．

総　　括

従来，酵素の結晶化に対する温度，pH，沈澱剤濃度等の許容範囲は極めて小さいものと考えられて来たが，筆者等が Taka-α-Amylase についてこれらの条件を調べた結果は予想に反し結晶化は何れもかなり広汎な範囲に亘り可能である事を見出した．又，酵素の結晶化に対する振盪の影響を検討した処，結晶化の速度を増大するのみならず，これら上記諸因子の制約は静置法に較べ，更に軽減せしめられる事を見出し，振盪結晶化法が酵素の研究に対し有力な手段となり得る事を指摘した．又，casein 及びその硫酸加水分解物が，Amylase の結晶化に及ぼす影響から，共存する蛋白質分解物が酵素の結晶化に及ぼす影響を推定した．

最後に，本研究に際し，終始御懇篤な御指導を賜つた三宅捷先生，多大の御援助を賜つた橋谷義人君に対し，心から感謝の意を表する．　　（昭30. 8. 31受領）

引 用 文 献

1) Northrop, J. H., M. Kunitz and R. M. Herriott : *Crystalline Enzyme*, 253 (1948)
2) Edsall, J. T. : *Advances in Protein Chemistry*, Vol. III, 411 (1947)
3) Akabori, S., T. Ikenaka and B. Hagihara ; *J. Biochem.*, **41**, 577 (1954)
4) 荻原文治：標準生化学実験法; p. 232, 昭和28年
5) 林：日化誌, **62**, 1 (1941)
6) 吉村，田中：昭和30年6月25日日本農化会関西支部例会にて口頭発表
7) 赤堀四郎：アミノ酸及び蛋白質; p. 601 (昭和23年)

8) Northrop, J. H. : *J. gen. Physiol*; **13**, 739 (1930)

9) 赤堀四郎：アミノ酸及び蛋白質; p. 549 (昭年23年)

10) Bowden, Pirie : *Brit. J. Exp. Pathol.* : **19**, 251 (1938)

11) Sumner, J. B., A. L. Dounce : *J. biol. Chem.*, **123**, 417 (1937)

12) 三宅捷，清水淳一：兵庫農科大学研究報告，**1**, 農化篇; 11 (1953)

13) 石橋雅雄：基礎容量分析法，中巻; p. 535

Summary

Factors affecting the crystallization of Taka -α-Amylase—pH, temperature, enzyme concentration, impurities, and physical stimulations—were studied.

The crystallizable pH ranges of Take -α- Amylase as salt form were pH 5.6-6.2 at 3-4°C, pH 5.0-6.4 at 20°C, and pH 4.8-7.4 by shaking at 20°C.

Crystallization in acetate buffer of pH 3.6-4.4 at 20°C resulted in a formation of new type of crystal.

It was probably assumed to be isoelectric precipitate. Ash analysis also supported this assumption.

Casein, hydrolysed to Formol N/Total N = 0.146, had a inhibitory action of only 1/20～1/10 of orignial casein (Formol N/Total N = 0.03) against crystal formation of Taka-α-Amylase.

This action of casein hydrolysate (Formol N/Total N = 0.592) was below 1/50 of the original casein.