

강력한 생전분 분해효소의 개발과 특성

정만재^{1*} · 허원녕² · 정재현³ · 谷口肇⁴

¹충북대학교 식품공학과 ²목포대학교 원예육종학과

³충주공업전문대학 식품공업과 ⁴일본 농림수산성 식품종합연구소

Studies on the Development and the Characteristics of the Powerful Raw Starch Digesting Enzyme

Chung, Man-Jae^{1*}, Won-Nyong Hou², Jae-Hyun Jeong³ and Hajime Taniguchi⁴

¹Department of Food Science and Technology, Chung Buk University

²Department of Horticultural Breeding, Mok Po University

³Department of Food Technology, Chung Ju Technical College

⁴National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan

Asp. usamii IAM 2185 was selected as a strain producing the powerful raw starch digesting glucoamylase. The optimum initial pH, the optimum temperature and the optimum cultural time for the enzyme production on wheat bran medium were pH 6-8, 25-30°C and 72 hrs, respectively. The addition of ammonium nitrate and albumin on wheat bran medium, respectively, increase slightly the enzyme production. The enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation, CM-cellulose and DEAE-cellulose column chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 34.3 U/mg protein and the yield of enzyme activity was 10.3%. The purified enzyme showed a single band on polyacrylamide disc gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 67,000 by SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis. The isoelectric point for the purified enzyme was pH 3.7. The optimum temperature and optimum pH were 60°C and pH 3.0 and the purified enzyme was stable in the pH range of 1.0-11.0. The purified enzyme was stable below 50°C and its thermostability was greatly increased by the addition of Ca²⁺. The purified enzyme showed a high hydrolysis rate on various raw starches such as corn, rice, yam, arrow root, sweet potato and glutinous rice.

호화전분은 amylase 에 의하여 용이하게 분해되지만 생전분은 일반적으로 분해되기 어렵다. 전분은 주정공업을 비롯하여 포도당, 가용성 전분, 호정 및 전분당의 제조에 막대한 양이 이용되고 있다. 전처리과정으로 전분을 호화시켜야 하는데 전분을 호화시키기 위해서는 막대한 양의 열에너지가 필요하다. 따라서 전분을 호화시키지 않고 전분을 당화시킬 수 있다면 전분가공에 있어서 획기적인 사실이 아닐 수 없다.

생전분을 당화시키는 미생물기원의 효소로서는 *Asp.*

awamori glucoamylase I(1), *Rhiz.* sp. glucoamylase (2), black *Aspergillus* glucoamylase I(3), *Asp. awamori* var. *kawachi* glucoamylase (4), *Asp. niger* IFO 8541 glucoamylase (5), *Asp.* sp. K-27 glucoamylase (6, 7), *Chalara paradoxa* glucoamylase (8), *Asp. cinnamomeus* glucoamylase (9), *Bac. circulans* F-2 α -amylase (10, 11) 등이 보고되었으나 아직까지 광범위하게 연구되어 있지않은 실정이며 실용화에는 보다 강력한 생전분 분해효소의 개발이 요구된다.

따라서 필자 등은 생전분분해력이 강력한 glucoamylase 를 생산하는 *Asp. usamii* IAM 2185 를 선정하고 본 균주에 의한 효소의 생산조건과 정제효소의 특성 및

Key words: *Asp. usamii* IAM 2185, glucoamylase, purification, gel electrofocusing

*Corresponding author

각종 생전분에 대한 분해율을 검토하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

기본배지

Wheat bran 5g 과 Tap water 5ml 를 100 ml 삼각 후라스크에 넣어 잘 혼합하고 15Lbs 에서 40 분간 가압 살균하였다.

Aspergillus 속 균주의 분리

분리재료 : 토양, 공기, 메주, 각종 생전분류, 곡자

분리방법 : 분리배지로는 potato glucose agar 배지를 사용하였고 상법에 따라 가압살균한 후 petri dish 에 분주하여 평판을 만들고 각종 균분리재료를 멸균수에 현탁시킨 액을 평판에 도말하고 30°C에서 3~4 일간 배양하여 *Aspergillus* 속 균주를 분리하였으며 공기 중에서의 분리는 분리용 평판배지를 일정장소에서 20~30 분간 뚜껑을 열었다가 닫은 후 상기와 같은 방법으로 분리하였다.

우수균주의 선정

자연계에서 분리한 *Aspergillus* 속 균주와 분양받은 *Aspergillus* 속 균주를 기본배지에 1백금이씩 접종하고 30°C에서 3 일간 배양하여 강력한 생전분 분해효소 생산 균주를 선정하였다.

조효소액의 조제

밀기울배양물에 50ml 의 증류수를 가하여 waring blender (viritis 형) 로 2 분간 마쇄하고 원심분리 (10,000 ×g) 하여 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성의 측정

1% 의 soluble starch 0.1 ml 에 효소액 0.1 ml 를 넣고 45°C에서 5 분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS 법에 의하여 정량하였다. 효소단위는 1 분간에 1 μmole 의 glucose 를 유리시키는 효소량을 1 unit 로 하였다.

생전분의 분해율측정

각종 생전분 20 mg 에 효소액 0.5 ml (20 U), 0.05 M acetate buffer (pH 3.0) 1.48 ml, toluene 0.02 ml 를 넣고 45°C에서 진탕반응 (120 oscill/min) 시켰다. 반응액을 경시적으로 0.1 ml 씩 취하여 H₂O 0.9 ml 씩 가한 후에 10,000 ×g 로 10 분간 원심분리하여 상정액과 침전물을

분리하고 이 침전물에 1 N-H₂SO₄ 5 ml 를 넣어 비등수욕 중에서 5 분간 끓여 가수분해시킨 다음 Phenol sulfuric acid 법으로 당을 정량하고 각종 생전분의 분해율을 구하였다.

생전분의 분해율 (%)

$$= \left(1 - \frac{x \text{ 시간 반응시켰을 때의 잔존 생전분량 (mg)}}{\text{미반응액의 생전분량 (mg)}}\right) \times 100$$

단백질의 정량

Bovine Serum Albumin 을 표준단백질로 하고 Lowry 등 (12) 의 방법에 따라 정량하였다.

Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis

Davis (13) 의 방법에 따라 실시하였으며 7.5% gel 을 사용하였고 gel 당 3 mA 의 전류로 영동을 실시한 다음 CBBR 250 으로 염색하고 7% acetic acid 로 탈색하였다.

SDS-Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis

Weber 와 Osborn (14) 의 방법에 따라 실시하였다. 10% gel 을 사용하였으며 gel 당 8 mA 의 전류로 실온에서 4 시간 영동하였다. 영동 후 CBBR 250 으로 염색한 후 7% acetic acid 로 탈색하였다. 분자량 측정의 경우에는 β-lactoglobulin (MW 14,300), Trypsinogen (MW 24,000), Pepsin (MW 34,700), Egg albumin (MW 45,000), Bovine albumin (MW 66,000) 을 표준단백질로 사용하였다.

Gel Electrofocusing

Wrigley (15) 의 방법에 따라 실시하였으며 pH 3.0 ~ 10.0 의 ampholine 을 사용하고 350 V 에서 4 시간 통전하였다. 이 때 두개의 gel 을 병행하여 실시하였으며 그 중 한개는 5% TCA 로 세척하여 ampholine 을 완전히 제거하고 amido black 10B 로 염색한 후 탈색하였다. 나머지 한개는 5 mm 간격으로 절단하고 각 slice 를 2 ml 의 증류수에 넣어 하룻밤 침출하여 pH 를 측정하였다.

Paper Chromatography

Whatman No.1 여지에 반응액을 10 μl 씩 spot 하고 60°C에서 상승법에 의하여 2 회 전개시켰다. 전개제로는 65% n-propyl alcohol 을 사용하였으며 전개 후 glucoamylase 를 처리하고 40°C에서 1 시간 반응시켜 Alkaline silver nitrate dip method (16) 에 의하여 발색

시켰다.

효소의 정제

조효소액을 ammonium sulfate fractionation, CM-cellulose column chromatography, DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 정제하였다.

결과 및 고찰

강력한 생전분분해효소를 생산하는 우수균주의 선정

전기방법에 따라 자연계에서 분리한 *Aspergillus* 속 균주 121주와 분양받은 *Aspergillus* 속 균주 37주를 밀기울배지에 배양하여 효소를 추출하고 이들 효소의 raw corn starch에 대한 분해율을 비교한 결과 분양받은 *Aspergillus usami* IAM 2185가 생산하는 조효소액의 생전분 분해율이 24시간에 94.8%로써 가장 높은 생전분 분해율을 나타내었으므로 이 균주를 우수균주로 선정하였다.

효소의 생산조건

Initial pH: 기본배지의 pH를 3.0~9.0로 조절하고 30°C에서 3일간 배양한 결과는 Fig.1과 같이 최적 initial pH는 6.0~8.0이었다.

배양온도: 15~40°C에서 3일간 배양한 결과는 Fig.2와 같이 최적배양온도는 25~30°C이었다.

배양시간: 기본배지에 일정시간 배양한 결과는 Fig.3과 같이 최적배양시간은 72시간이었다.

질소원, 탄소원 및 무기염류의 첨가시험: 각종 무기질 소원과 무기염류는 밀기울배지에 각각 0.2%씩, 각종 유

기질소원과 탄소원은 밀기울배지에 각각 1%씩 첨가하고 배양한 결과는 Table 1~4와 같이 ammonium nitrate와 albumin의 첨가는 각각 15.6%, 12.8%의 효소생산을 증가시켰으나 다른 성분의 첨가효과는 거의 인정할 수 없었다.

효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation: 조효소액 2,000 ml에 ammonium sulfate를 0.8 포화도가 되도록 서서히 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 10,000×g로 10분간 원심분리하여 supernatant를 제거하고 침전물을 소량의 0.05M acetate buffer(pH3.5)에 녹인 다음 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 supernatant를 분

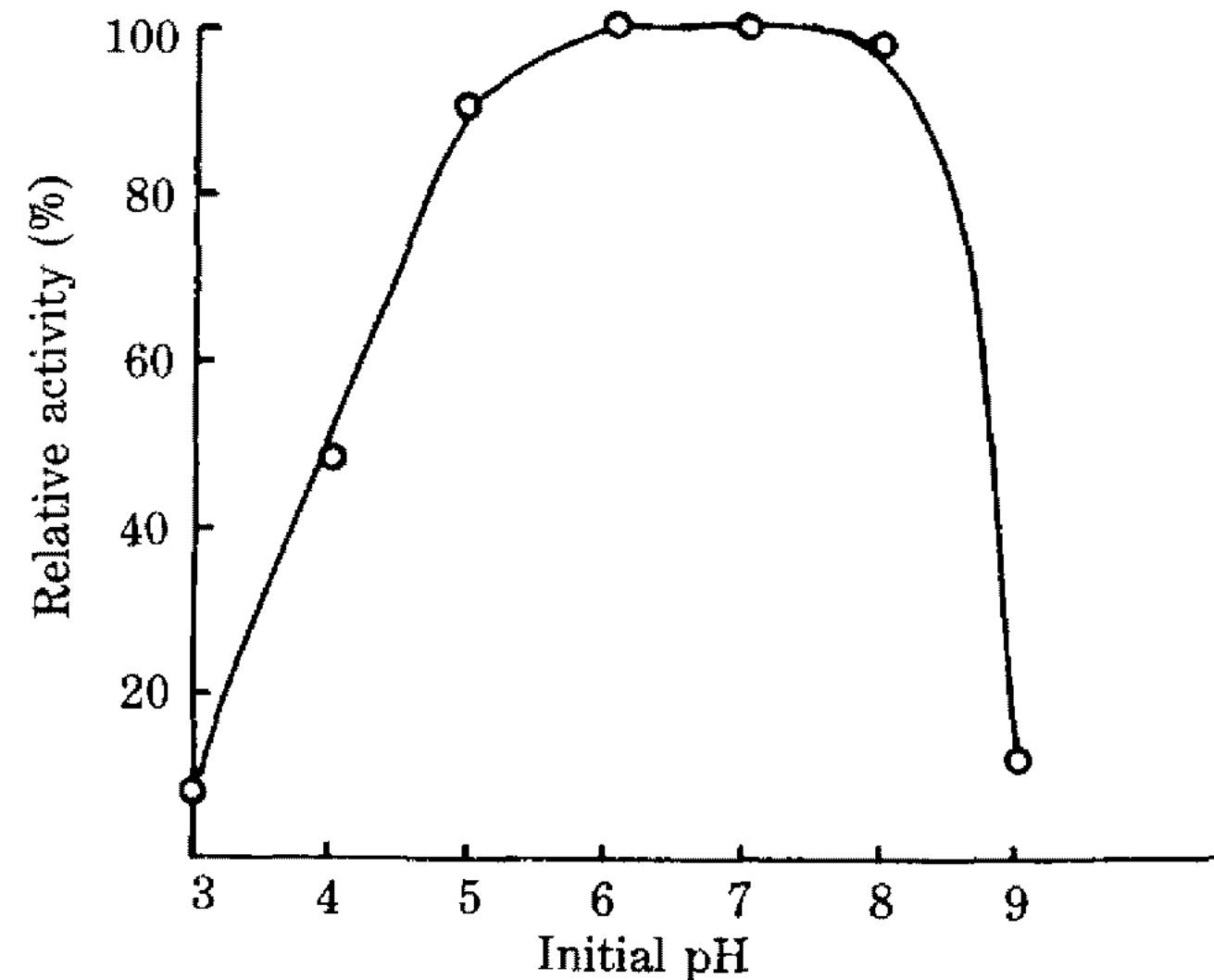


Fig. 1. Effect of initial pH on the enzyme production.

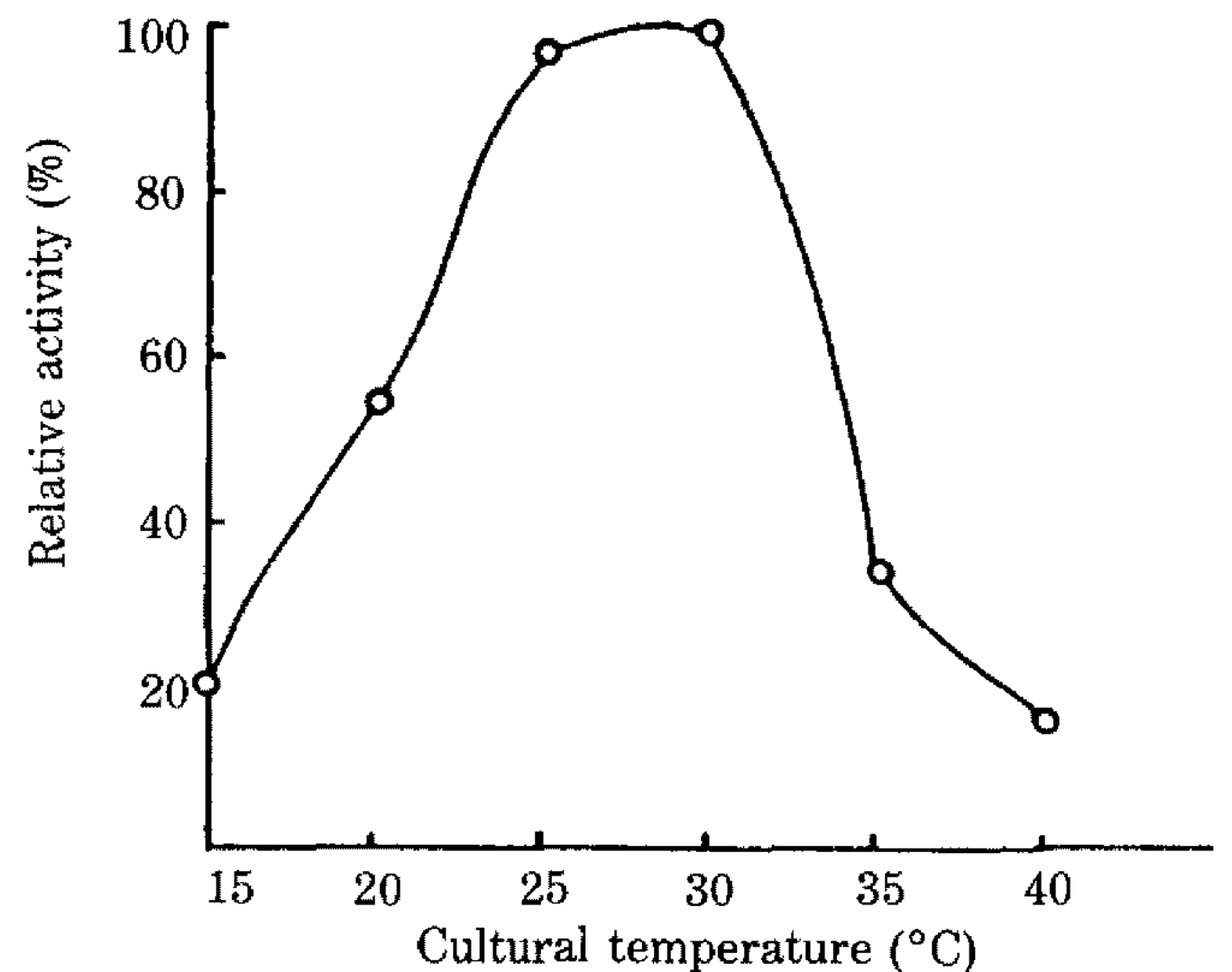


Fig. 2. Effect of cultural temperature on the enzyme production.

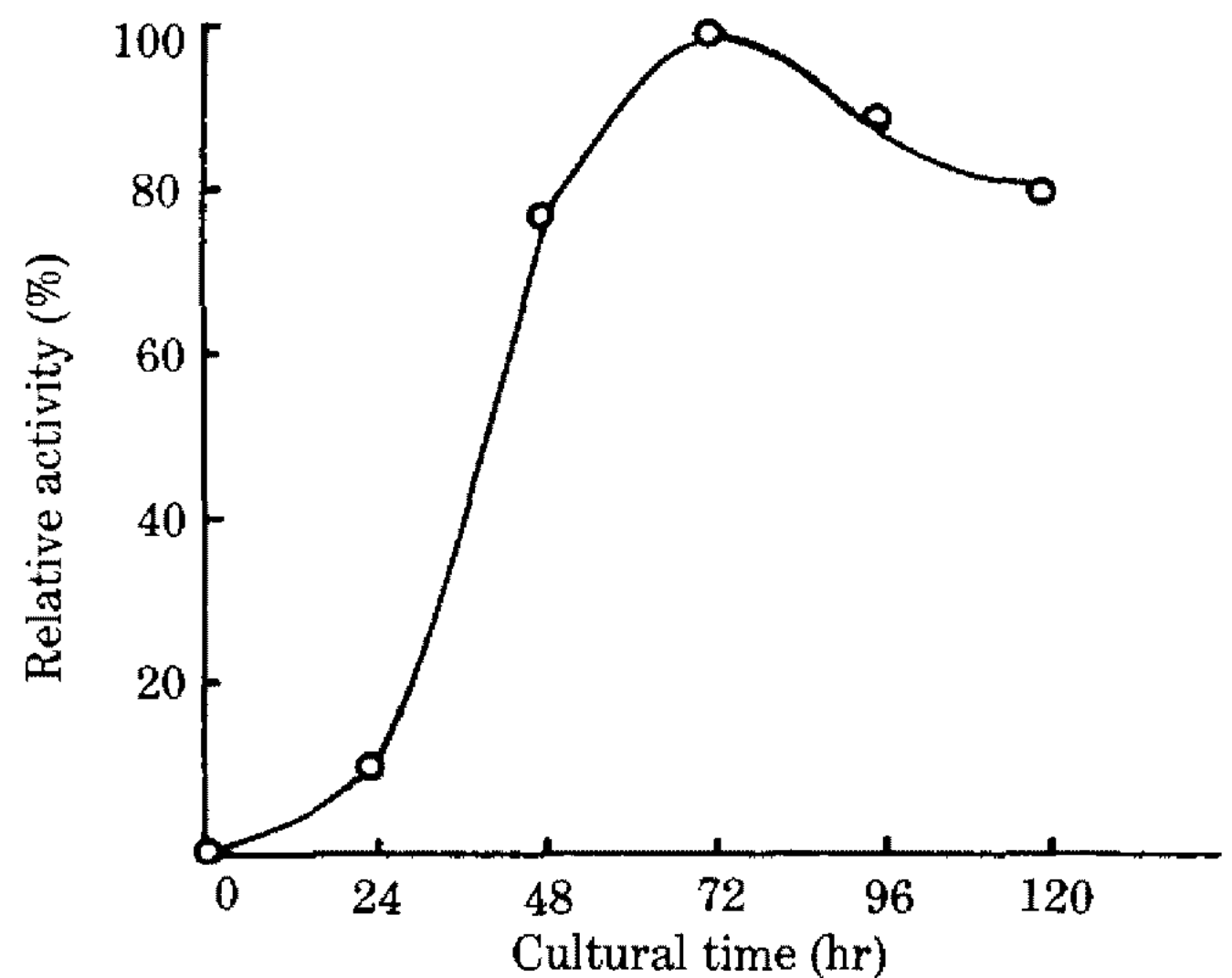


Fig. 3. Effect of cultural time on the enzyme production.

Table 1. Effect of inorganic nitrogen sources on the enzyme production

Inorganic nitrogen sources	Relative activity (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	98.3
NH ₄ NO ₃	115.6
NH ₄ Cl	97.1
(NH ₄) ₂ HPO ₄	98.6
(NH ₂) ₂ CO	102.4
KNO ₃	99.2
Control	100.0

Table 2. Effect of organic nitrogen sources on the enzyme production

Organic nitrogen sources	Relative activity (%)
Casein	100.8
Peptone	103.2
Yeast extract	94.5
Albumin	112.8
Control	100.0

리하고 0.05 M acetate buffer (pH 3.5)로 24 시간 투석하여 투석액 228 ml를 얻었다.

CM-cellulose column chromatography: 투석액을 50 mM acetate buffer (pH 3.5)로 평형화시킨 column (2.0 × 40 cm)에 주입하고 50 mM acetate buffer (pH 3.5) 200 ml로 column을 세척한 다음 reservoir에는 0.5 M NaCl을 함유하는 50 mM acetate buffer (pH 3.5) 300 ml와 mixing chamber에는 50 mM acetate buffer (pH 3.5) 300 ml를 넣고 용출시켰다. 이 때 용출속도는 시간당 20 ml였고 9 ml씩 분획하였다. Fraction No. 10~55에서 활성 peak가 나타났다.

DEAE-cellulose column chromatography: CM-cellulose column chromatography의 peak 부분을 모아 50 mM Tris buffer (pH 8.0)로 투석하였다. 이것을 50 mM Tris buffer (pH 8.0)로 평형화시킨 column에 주입하고 column chromatography를 실시하였다. Reservoir에는 50 mM Tris buffer (pH 8.0, 0.5 M NaCl 함유) 300 ml와 mixing chamber에는 50 mM Tris buffer (pH 8.0) 300 ml를 넣고 용출시켰다. 이 때 용출속도는 시간당 20 ml였고 9 ml씩 분획하였다. Fraction No. 50

Table 3. Effect of carbon sources on the enzyme production

Carbon sources	Relative activity (%)
Glucose	101.0
Galactose	102.4
Maltose	98.5
Sucrose	97.7
Lactose	97.2
Soluble starch	100.5
Control	100.0

Table 4. Effect of inorganic salts on the enzyme production

Inorganic salts	Relative activity (%)
KH ₂ PO ₄	99.7
K ₂ HPO ₄	101.8
NaH ₂ PO ₄	101.3
Na ₂ HPO ₄	99.5
MgSO ₄	98.6
CaCO ₃	98.8
Control	100.0

~80에서 활성 peak가 나타났으며 이 부분을 모아 0.1 M acetate buffer (pH 3.0)로 투석하여 정제효소로 사용하였다.

이상의 정제과정을 통하여 Table 5에서 보는 바와 같이 본 정제효소의 specific activity는 34.3 U/mg·protein, yield는 10.3%이었다.

정제효소의 특성

정제효소의 polyacrylamide disc gel electrophoresis: polyacrylamide disc gel electrophoresis의 결과는 Fig. 6과 같이 relative mobility가 0.71인 single band를 나타내었다.

분자량: SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 측정된 분자량은 Fig. 7과 같이 67,000으로 추정되었다.

등전점: Wrigley (15)의 방법에 따라 등전점을 측정한 결과는 Fig. 8과 같이 본 효소의 isoelectric point는 pH 3.7이었다.

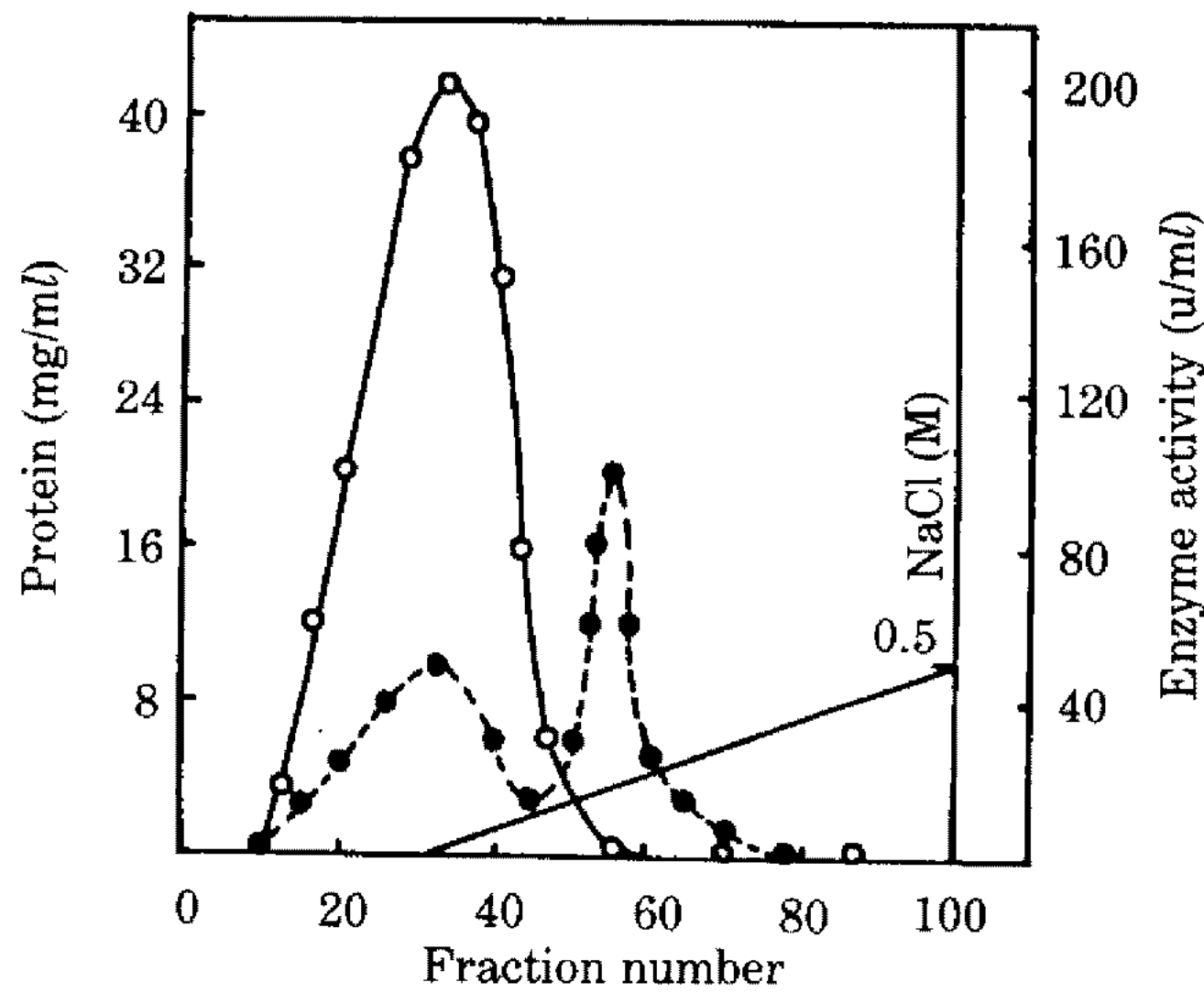


Fig. 4. Column chromatography on CM-cellulose.

— : activity
 - - - : protein

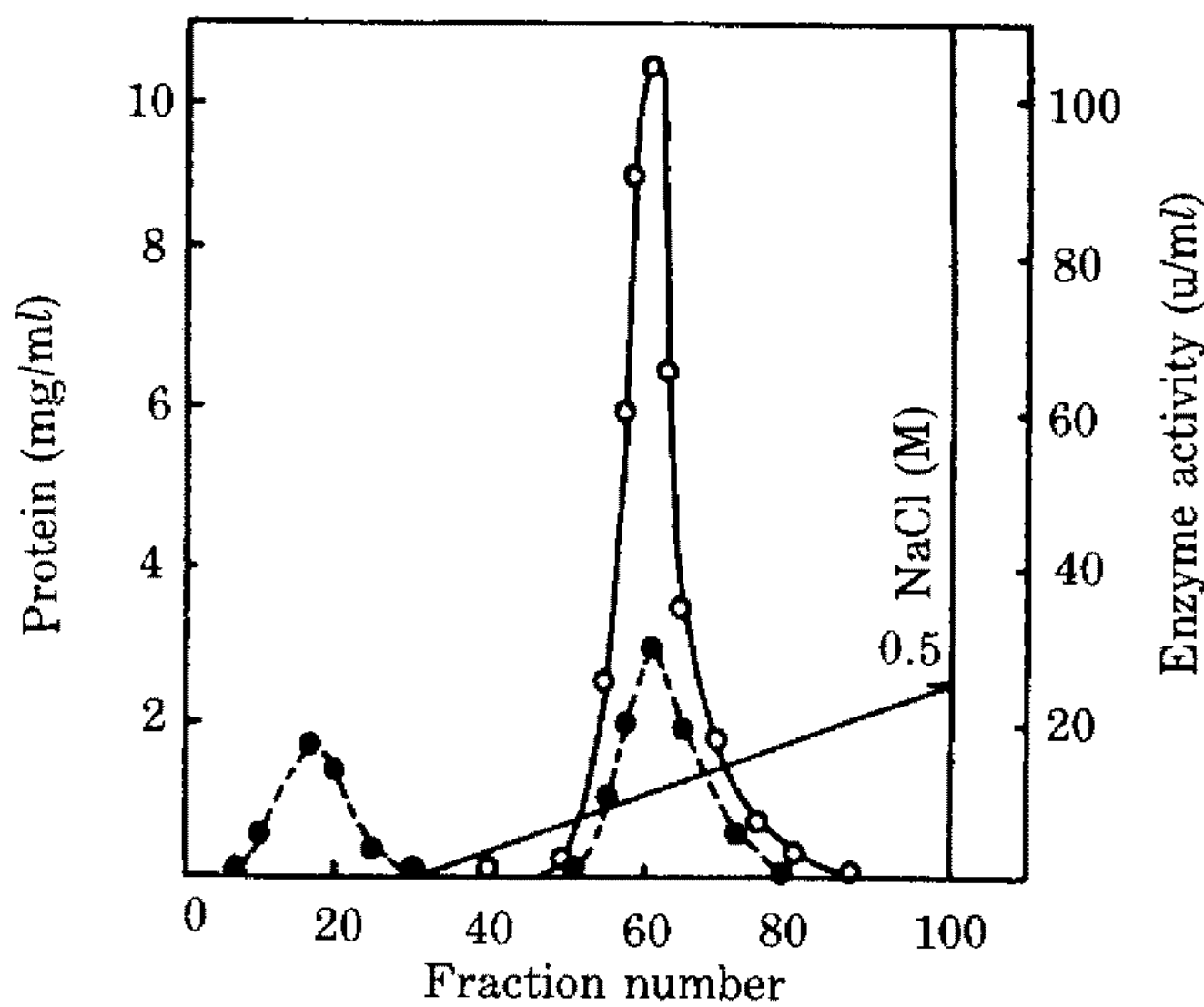


Fig. 5. Column chromatography on DEAE-cellulose.

— : activity
 - - - : protein

최적 온도 : 30~70°C에서 효소활성을 측정된 결과는 Fig.9와 같이 최적온도는 60°C이며 65°C 이상에서는 급격하게 효소활성이 감소되었다.

열안정성 : 효소액을 소정온도로 5~20분간 처리한 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과는 Fig.10과 같이 50°C에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나, 60°C에서 5분간 처리하였을 때 50%의 잔존활성을 나타내었고 10분 이상에서는 활성이 급격하게 감소되었다.

열안정성에 미치는 Ca²⁺의 영향 : 효소액에 동량의 20 mM CaCl₂를 혼합하고 60°C에서 5~20분간 처리한 후 잔존활성을 측정된 결과는 Fig.11과 같이 Ca²⁺의 첨가

Table 5. Purification procedure of the enzyme

Procedure	Total activity (u)	Total protein (mg)	Specific activity (u/mg protein)	yield
Crude enzyme	73,200	10,919	6.7	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	45,349	2,759	16.4	62.0
CM-cellulose column chromatography	21,868	1,096	20.0	29.9
DEAE-cellulose column chromatography	7,542	220	34.3	10.3

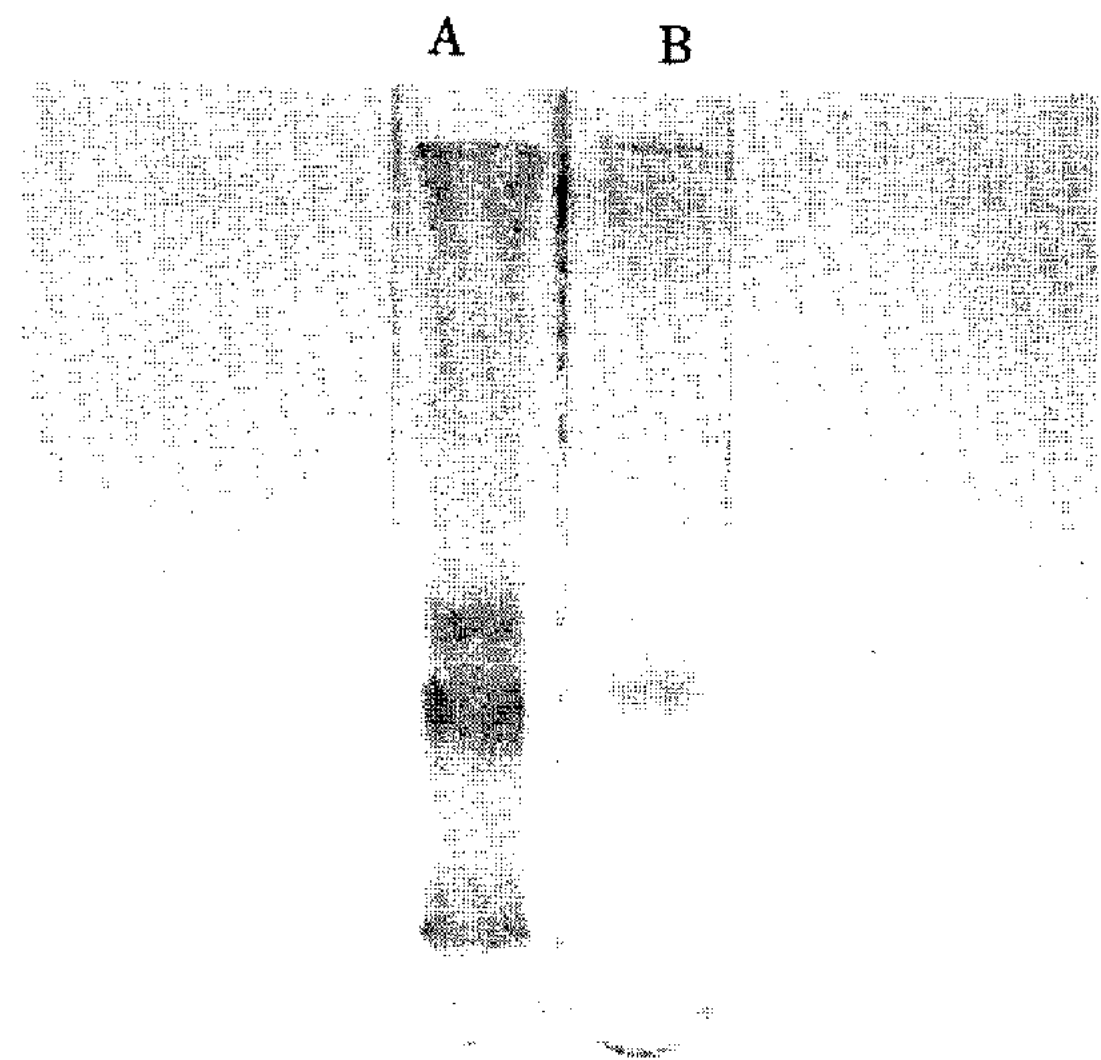


Fig. 6. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the crude enzyme and the purified enzyme.

A: Crude enzyme
 B: Purified enzyme

는 내열성을 크게 증가시켰다. 즉 60°C에서 20분간 처리하였을 때 Ca²⁺의 첨가구는 70%의 잔존활성을 나타내었으나 무첨가구는 6%의 잔존활성을 나타내었다.

최적 pH : acetate buffer를 사용하여 효소의 최적 pH를 측정된 결과는 Fig.12와 같이 최적 pH는 3.0이었다.

pH 안정성 : pH 0.5~5.0은 acetate buffer, pH 5.5~8.0은 McIlvaine buffer, pH 8.5~11.0은 Atkins와 Pantin buffer, pH 11.5~12.5는 Ringer buffer를 사용하여 효소액의 pH를 소정 pH로 조절하고 4°C에서 24시간 방치한 후 pH를 3.0으로 조절하여 잔존활성을 측정된 결과는 Fig.13과 같이 pH 1.0~11.0의 범위에서 안정하였다.

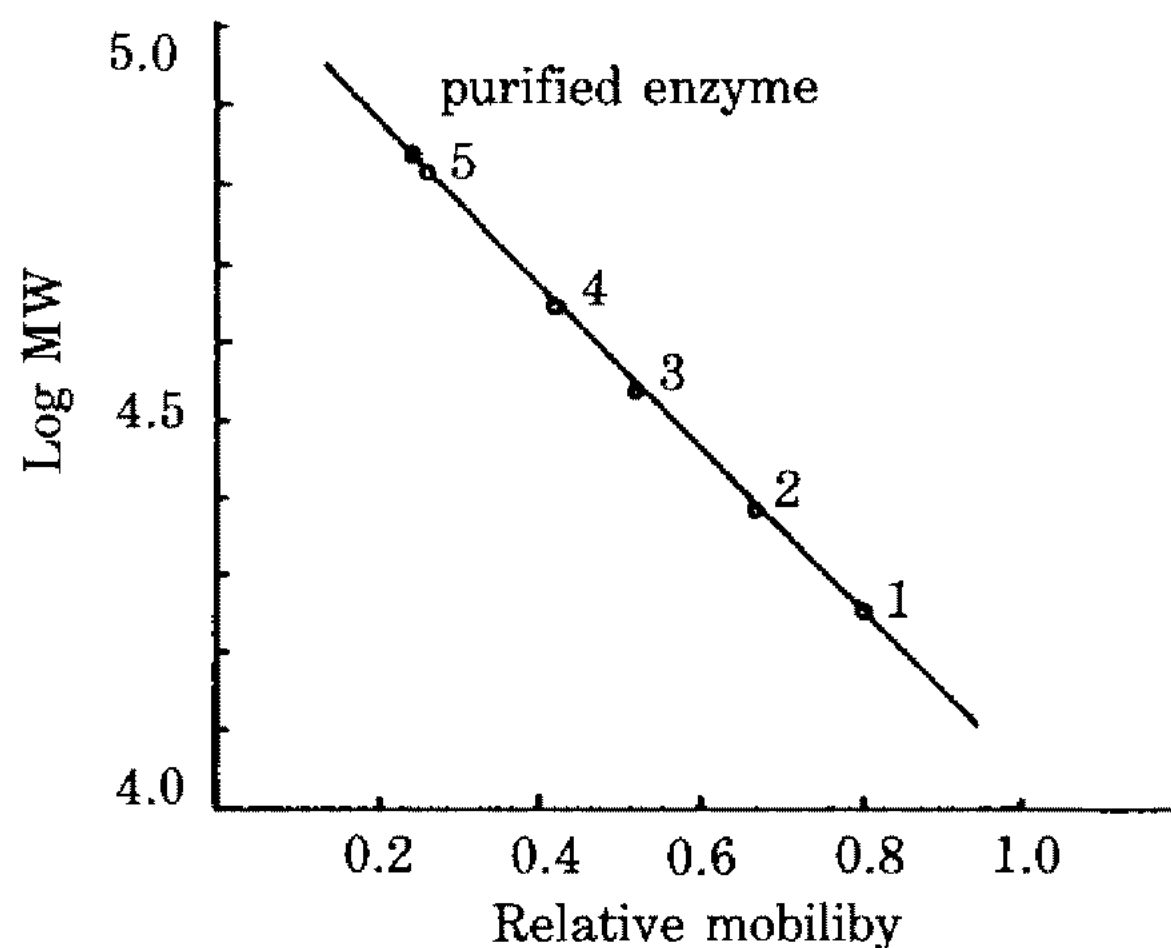


Fig. 7. Determination of MW by SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified enzyme.

1. β -lactoglobulin
2. Trypsinogen
3. Pepsin
4. Egg albumin
5. Bovine albumin

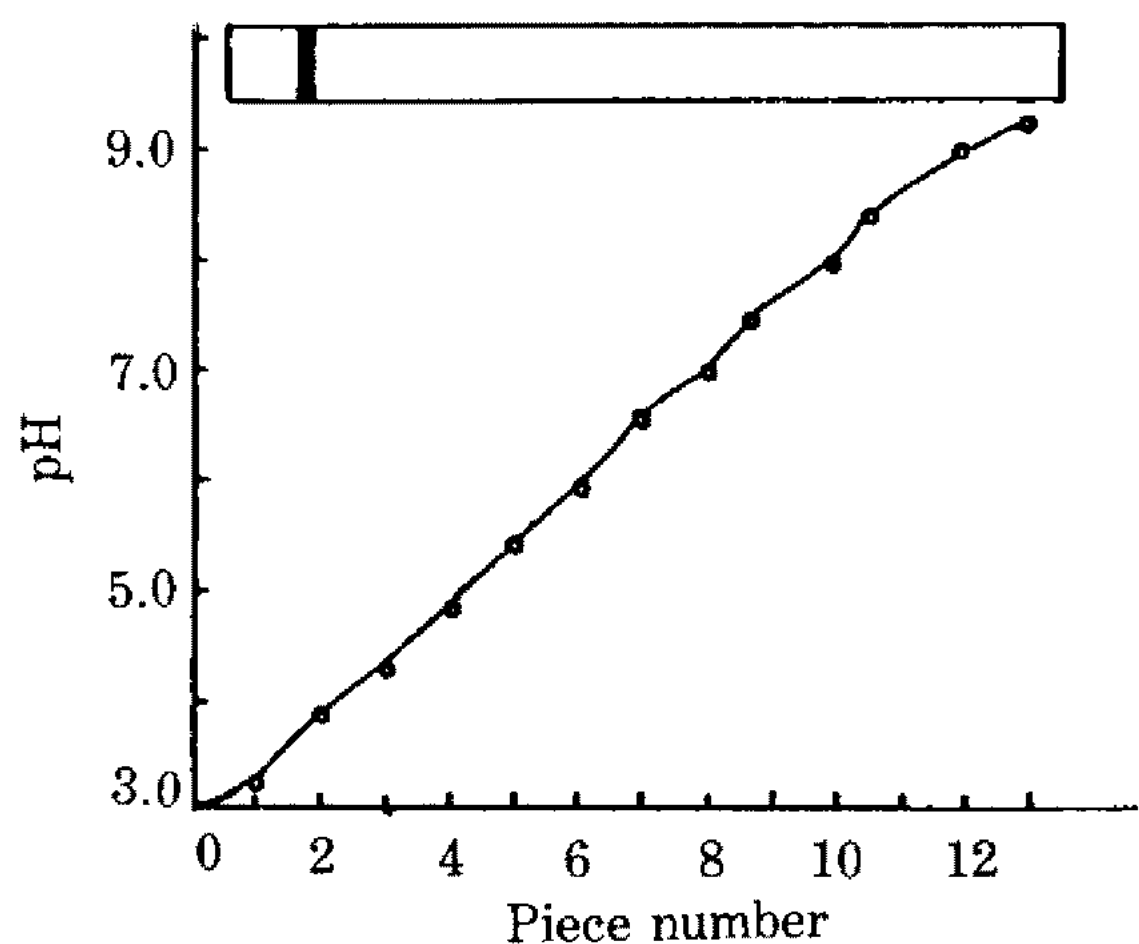


Fig. 8. Gel electrofocusing of the purified enzyme.

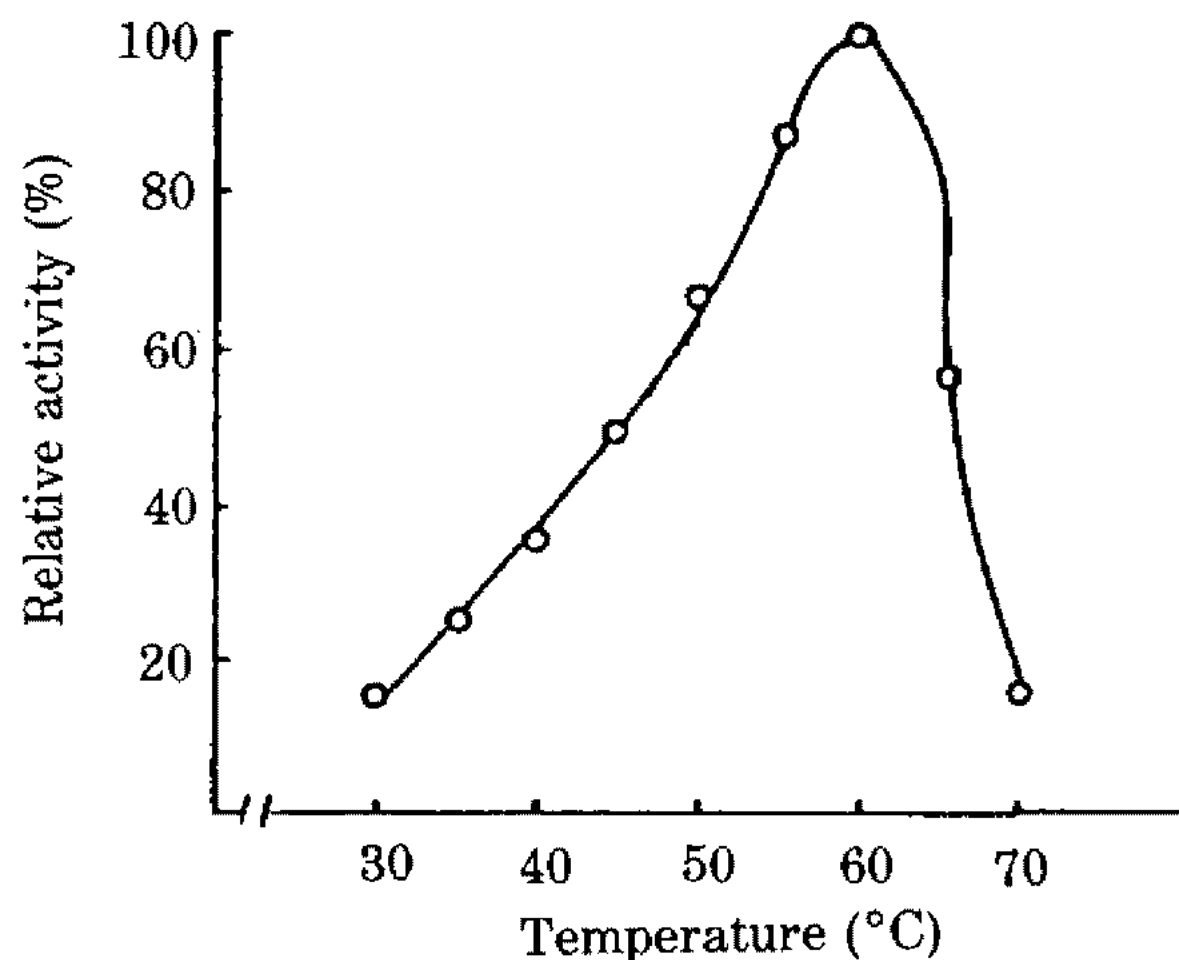


Fig. 9. Effect of temperature on the purified enzyme activity.

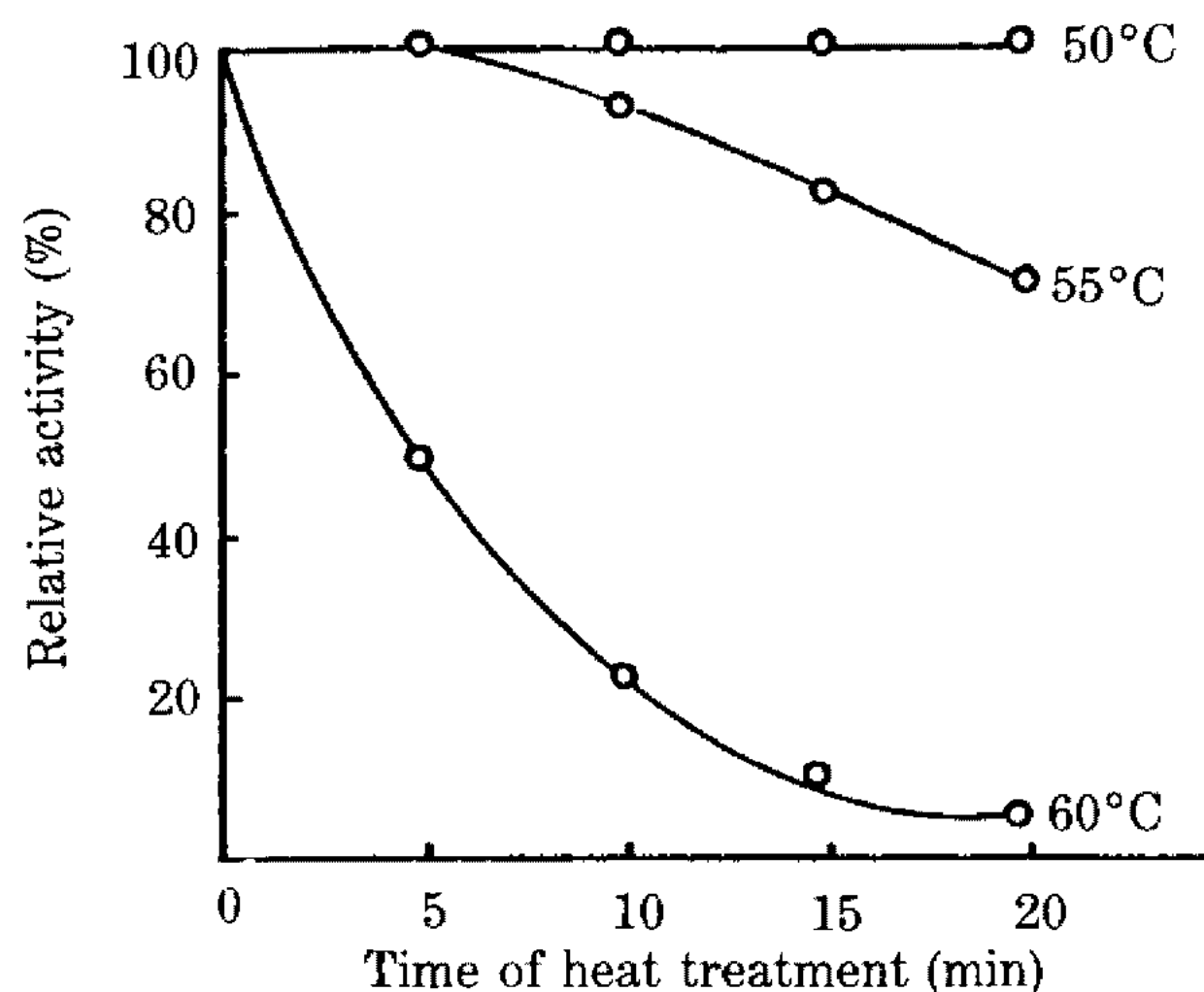


Fig. 10. Thermal stability of the purified enzyme.

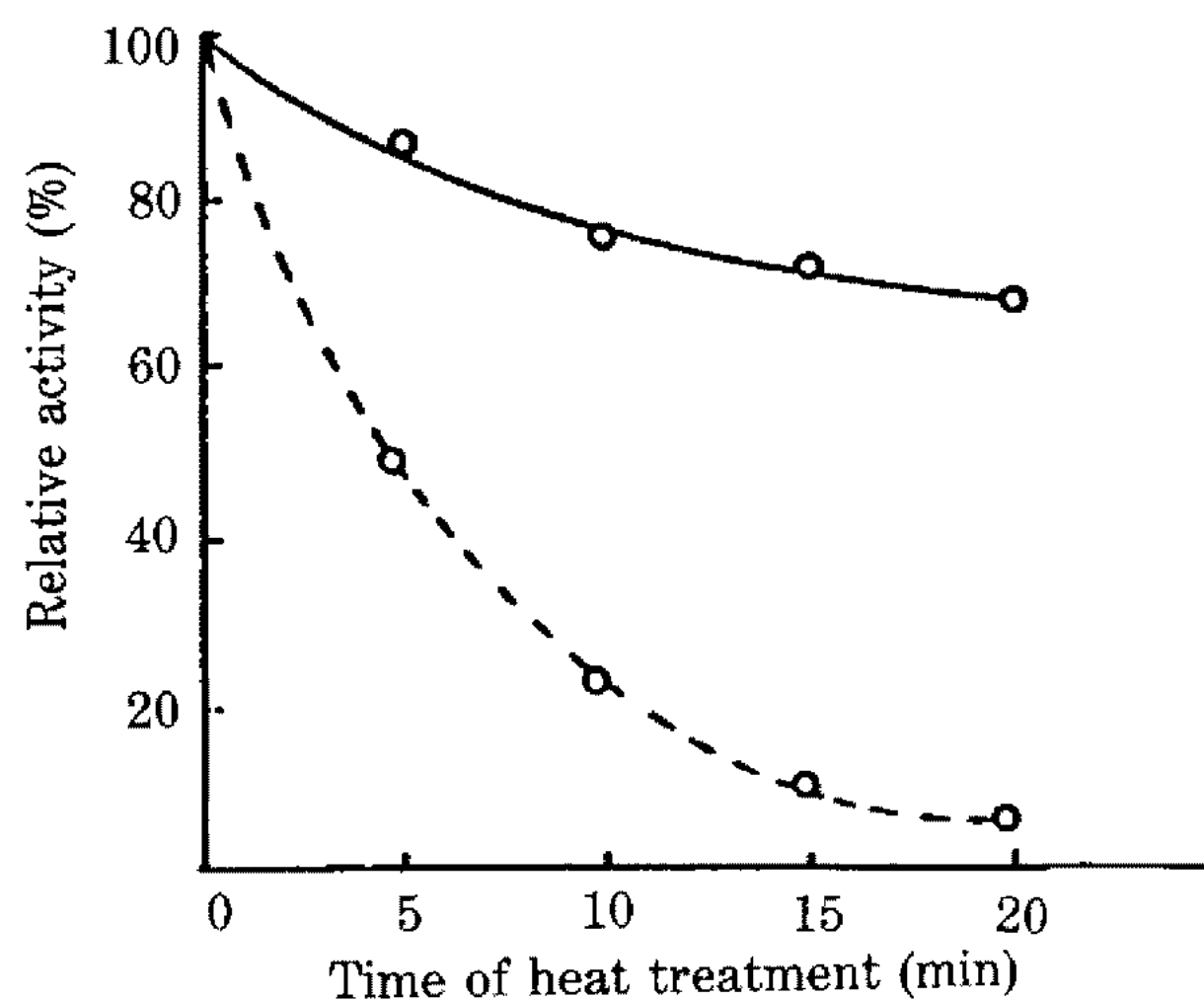


Fig. 11. Effect of Ca²⁺ on thermal stability of the purified enzyme (60°C).

— : with CaCl₂
 - - - : without CaCl₂

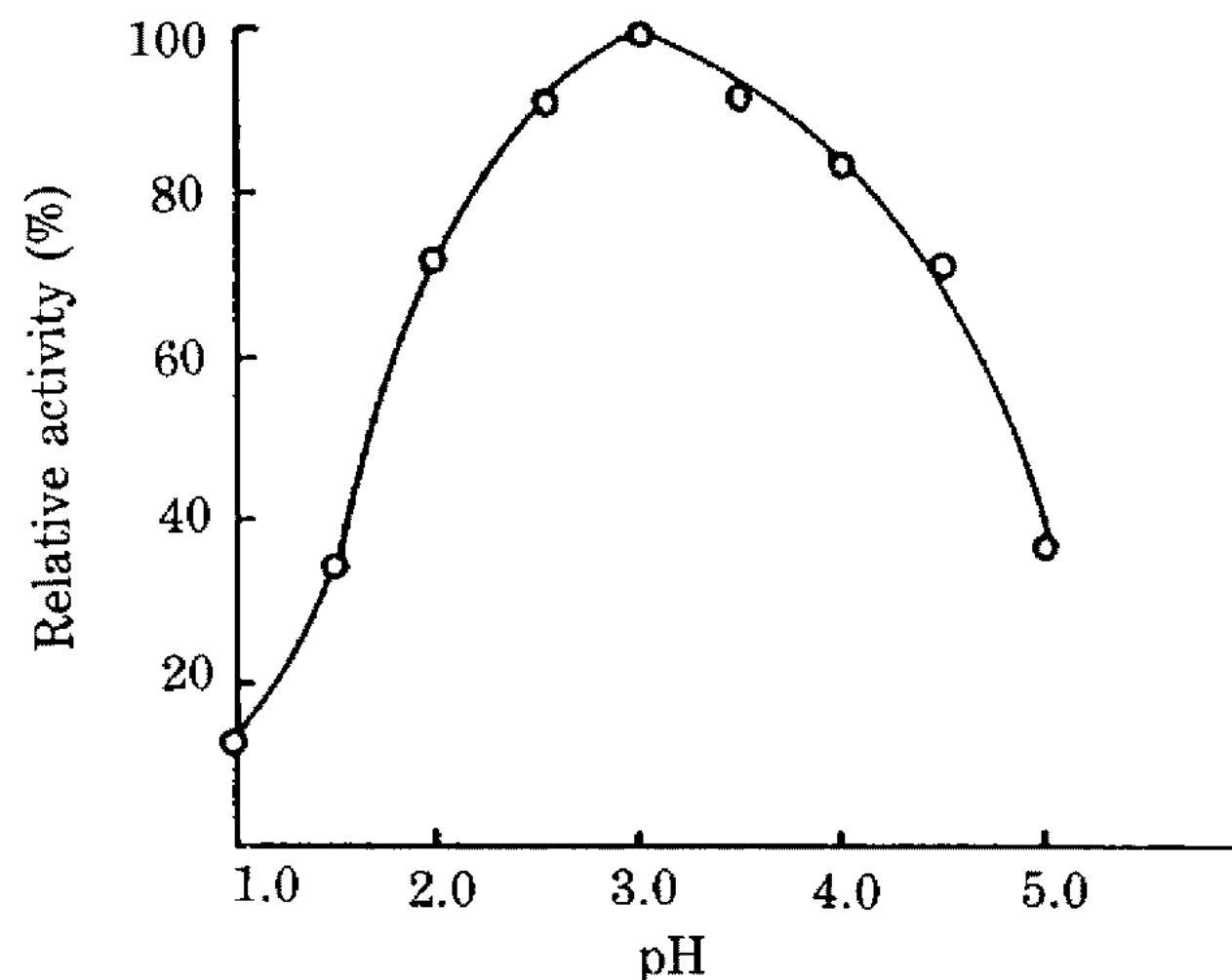


Fig. 12. Effect of pH on the purified enzyme

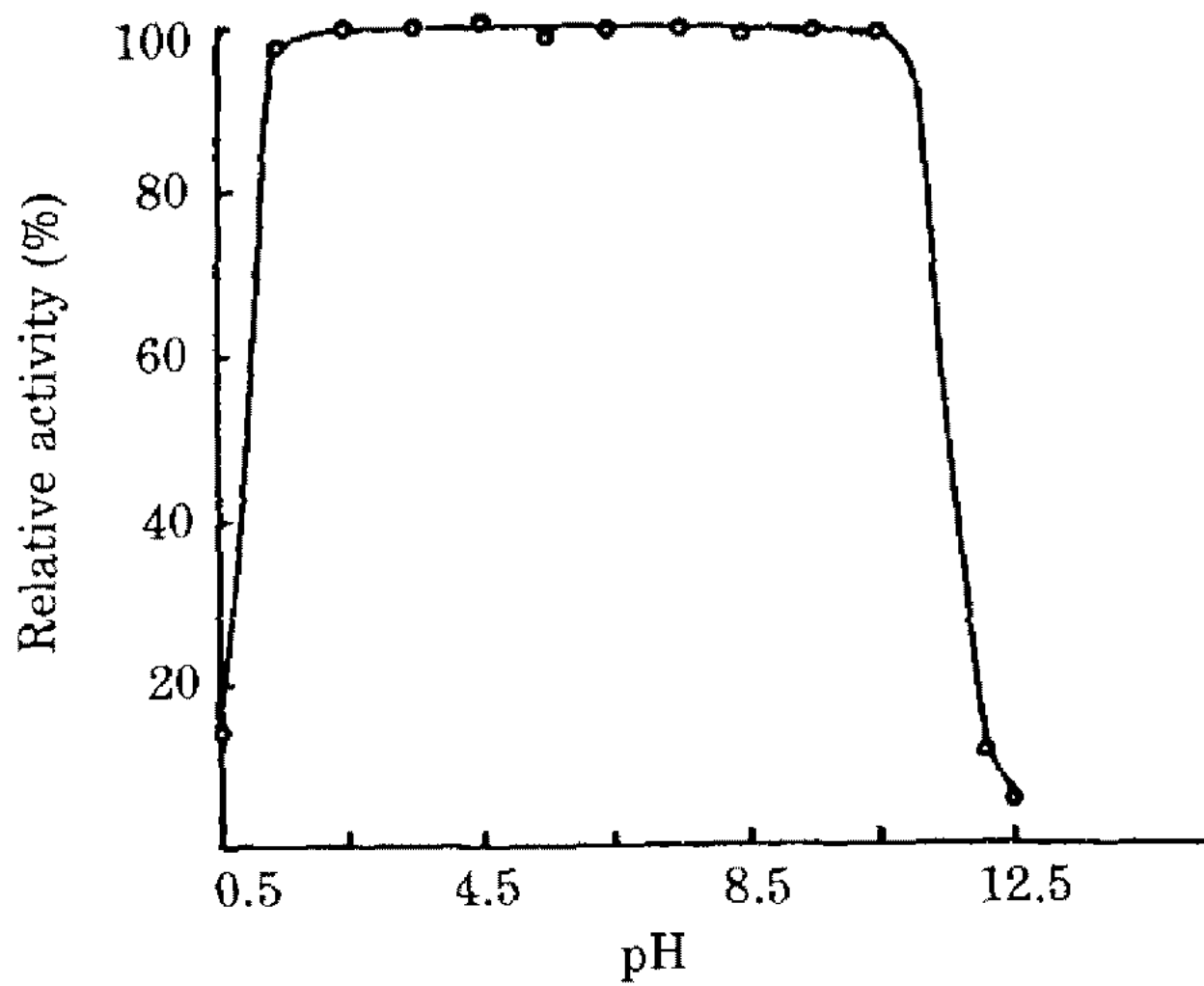


Fig. 13. pH stability of the purified enzyme.

Table 6. Effect of metal ions on the purified enzyme activity

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
SnCl ₂	1	100.3
CoCl ₂	1	103.8
HgCl ₂	1	94.2
CaCl ₂	1	111.0
FeCl ₂	1	100.5
PbCl ₂	1	94.7
BaCl ₂	1	100.9
MnCl ₂	1	105.4
Li ₂ SO ₄	1	93.0
CuSO ₄	1	92.7
ZnSO ₄	1	96.7
MgSO ₄	1	94.9
AlCl ₃	1	102.3
AgNO ₃	1	98.6
CdCl ₂	1	94.9
Control	0	100.0

금속 ion의 영향 : 효소액에 각종 금속 ion의 용액을 넣어 그 농도를 1 mM로 조절하고 30°C에서 30분간 처리한 후 잔존활성을 측정하여 결과는 Table 6과 같이 Ca²⁺은 본 효소의 활성을 11% 증가시켰으나 다른 금속 ion은 별 영향이 없었다.

각종 생전분에 대한 분해율 : raw corn starch, raw potato starch, raw rice starch, raw yam starch, raw green banana starch, raw arrow root starch, raw sweet potato starch, raw glutinous rice starch에 대하

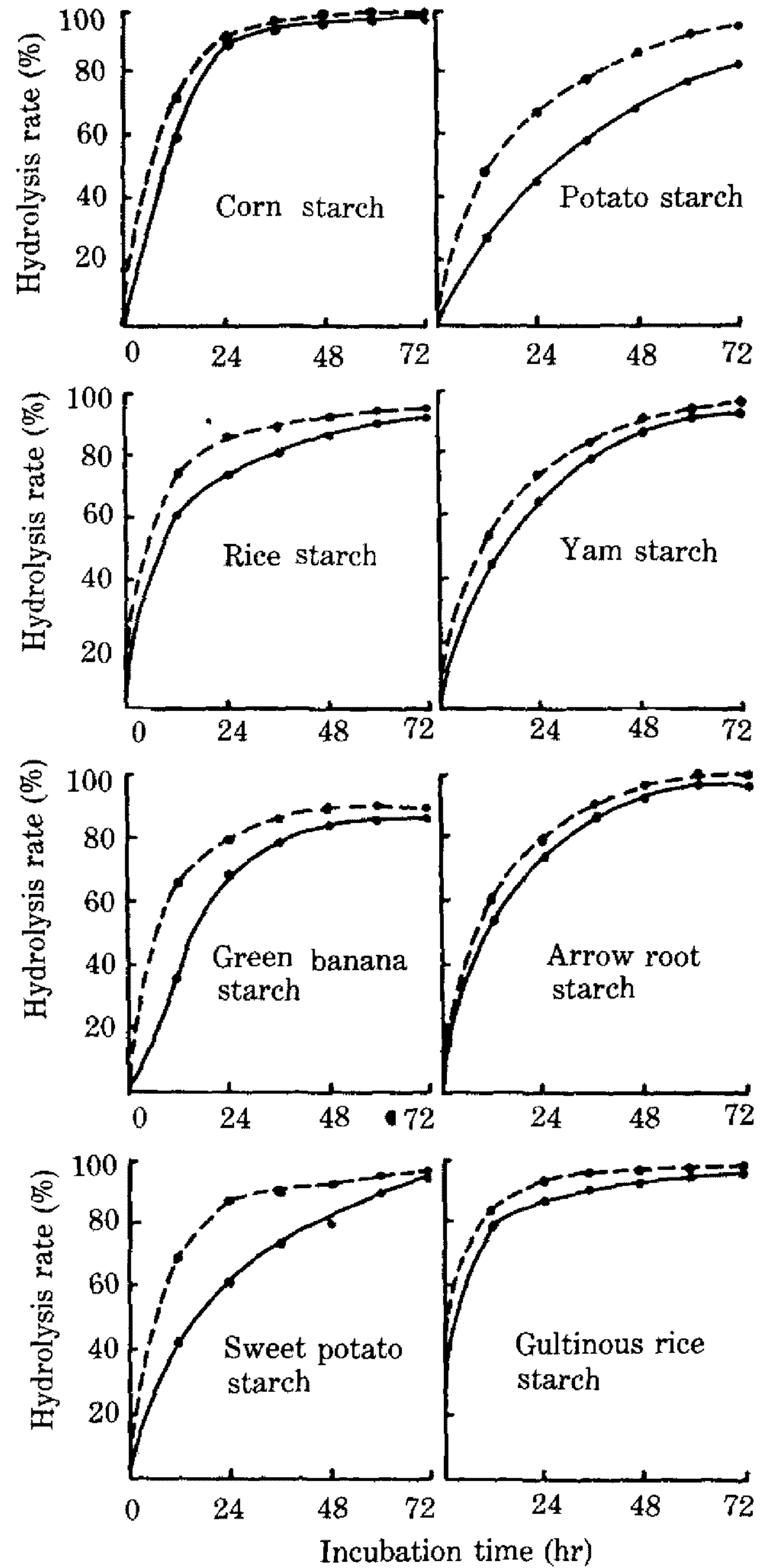


Fig. 14. Hydrolysis rate of various raw starches.

— : Purified enzyme (20u)
 - - - : Purified enzyme (18u) + *Bacillus licheniformis* α-amylase (2u)

여 분해율을 조사한 결과는 Fig. 14와 같다.

정제효소 20U를 각종 생전분에 작용시켰을 때 공시생전분 중 corn starch의 분해율이 24시간에 약 90%를 나타내었고, 전분의 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 72시간 반응시켰을 때 공시생전분 중 potato starch와 green banana starch를 제외하고는 90% 이상의 높은 분해율을 나타내었으며 가장 분해되기 어려운 것으로 알려진 potato starch도 약 80%의 높은 분해율은 나타내

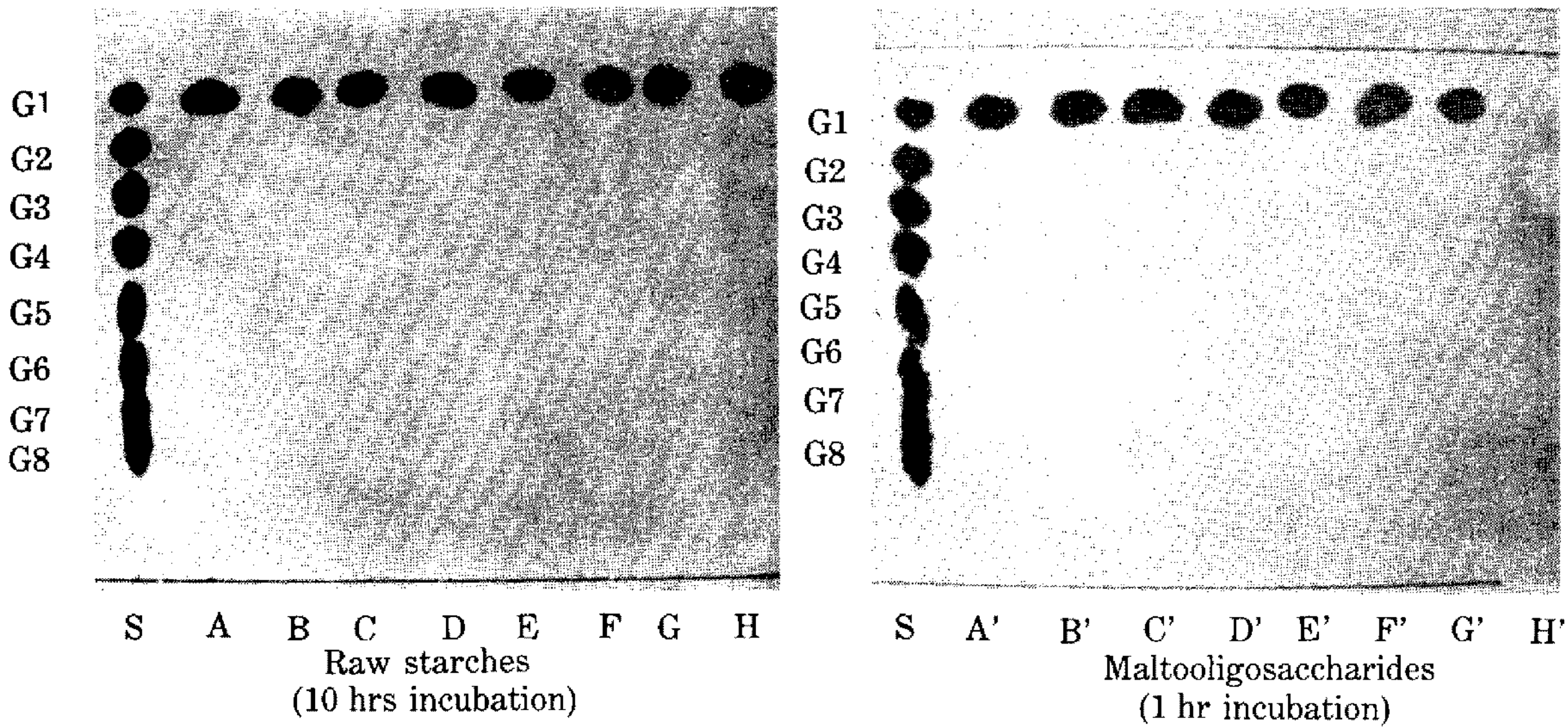


Fig. 15. Paper chromatogram of hydrolysis products on the various raw starches and maltooligosaccharides

S: Standard maltooligosaccharide
 A: Rice starch
 B: Corn starch
 C: Potato starch
 D: Arrow root starch
 E: Green Banana starch
 F: Yam starch
 G: Sweet potato starch
 H: Glutinous rice starch

A': Maltose
 B': Maltotriose
 C': Maltotetraose
 D': Maltopentaose
 E': Maltohexaose
 F': Maltoheptaose
 G': Maltooctaose

었다.

또한 정제효소 18U와 *Bacillus licheniformis* α-amylase 2U를 각종 생전분에 작용시켰을 때 정제효소 단독으로 사용했을 때보다 분해율이 약간 증가되었다.

이와 같은 사실은 Ueda 등(17)이 α-amylase는 미량으로 glucoamylase의 생전분 분해작용을 촉진시킨다는 보고와 일치하고 있다.

다른 생전분 분해효소의 분해율을 보면 생전분의 종류에 따라 분해율이 다르며 raw corn starch에 대한 분해율이 *Asp. sp.* K-27 glucoamylase(6)는 24시간에 70%, *Rhiz. delemar* glucoamylase G III(6)는 40%, *Asp. niger* glucoamylase(6)는 21%, *Asp. awamori* var. *Kawachi* glucoamylase(4)는 50% 내외, *Asp. awamori* glucoamylase I(1)은 약 35%, *Chalara paradoxa* amylase(8)는 약 73%이며, 본 균주가 생산하는 glucoamylase는 약 90%로써 높은 분해율을 나타내었다.

각종 기질에 대한 분해산물: 1% 각종 기질 100 μl에 효소액 50 μl와 0.05 M acetate buffer(pH 3.0) 50 μl를 넣고 45°C에서 소정시간 반응시켜 분해산물을 paper chromatography로 검출한 결과는 Fig. 15와 같

이 분 효소는 각종 생전분과 maltooligosaccharide에 작용하여 glucose를 생성하였다.

요 약

생전분 분해력이 강력한 glucoamylase를 생산하는 균주로서 *Asp. usamii* IAM 2185를 선정하였다. 밀기울배지에서의 효소생산의 최적 initial pH는 6.0~8.0, 최적 배양온도는 25~30°C, 최적 배양시간은 72시간이고, 밀기울배지에 ammonium nitrate와 albumin의 첨가는 효소의 생산을 약간 증가시켰다. 황산암모늄분획, CM-cellulose와 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 효소를 정제하였고, 정제효소의 specific activity는 34.3 U/mg·protein, 수율은 10.3%이었다.

정제효소는 polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 single band를 나타내었고, SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 추정된 분자량은 67,000이었다. 정제효소의 등전점은 pH 3.7, 최적 온도는 60°C, 최적 pH는 3.0, pH 안정범위는 1.0~11.0, 50°C 이하에서 안정하였으며, Ca²⁺은 효소의 내열성을 크게 증가시켰다.

정제효소는 raw corn starch, raw rice starch, raw yam starch, raw arrow root starch, raw sweet potato starch, raw glutinous rice starch 에 대하여 높은 분해율을 나타내었다.

감사의 말

이 논문은 1989년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Hayashida, S., S. Kunisaki, M. Nakao and P.Q. Flor: *Agri. Biol. Chem.*, **46**(1), 83 (1982).
2. Ueda, S. and K. Kano: *Stärke*, **27**, 123 (1975).
3. Medda, S., B.C. Saha and S. Ueda: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **26**, 139 (1982).
4. Hayashida, S. and P.Q. Flor: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2675 (1981).
5. Sohn, C.B.: The graduate School of Chungnam National University. Thesis for the degree of Doctor (1983).
6. Abe, J., F.W. Bergmann, K. Obata and S. Hizukuri: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **32**(2), 128 (1985).
7. Yamamoto, M., S. Ushiro and N. Nakamura: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **35**(4), 235 (1988).
8. Kainuma, K., H. Ishigami and S. Kobayashi: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **32**(2), 136 (1985).
9. Kurushima, M., J. Sato and K. Kitahara: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **48**(6), 379 (1974).
10. Chung, M.J., H. Taniguchi and Y. Maruyama: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **9**(4), 185 (1981).
11. Chung, M.J., H. Taniguchi, Y. Maruyama and M.J. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**(2), 123 (1982).
12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.S. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
13. Davis, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
14. Weber, K. and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
15. Wrigley, C.W.: *Method in Enzymology*, **22**, 559 (1971).
16. Trevelyan, W.E., D.P. Procter and J.S. Harrison: *Nature*, **166**, 441 (1950).
17. Ueda, S. and K. Kano: *Stärke*, **27**, 123 (1975).

(Received April 23, 1990)