

Bacillus cereus subsp. *mycoides*가 생산하는 Pullulanase의 정제와 특성

정만재* · 우정숙 · 조대선 · 이명열 · 박남규
충북대학교 식품공학과

Purification and Characteristics of Pullulanase from *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*

Chung, Man-Jae*, Jeong-Suk Woo, Dae-Sun Cho,
Myong-Yur Lee and Nam-Kyu Park

Department of Food Science and Technology, Chungbuk University,
Cheongju 360-763, Korea

Abstract — The optimum cultural temperature and time for the pullulanase production by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* were 35°C and 48 hrs, respectively. The addition of egg albumin and casein to the basal medium increased the enzyme production. The enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation and DEAE-cellulose column chromatography. Specific activity of the purified enzyme was 82.37 U/mg protein and yield of the enzyme activity was 62.1%. The purified enzyme showed a single band on polyacrylamide disc gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 66,000 by SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis. The isoelectric point for the purified enzyme was pH 5.0. The optimum temperature and pH were 50°C and pH 6.5, respectively. The purified enzyme was stable below 40°C and in the pH range of 6.5~10.0. The pullulanase activity was greatly inhibited by Ag⁺, Hg²⁺ and EDTA, and its heat stability was increased by the addition of Ca²⁺. The hydrolysis product with the enzyme on pullulan was maltotriose.

Walker(1)는 *Streptococcus mitis* pullulanase와 *Aerobacter aerogenes* pullulanase의 pullulan과 각종 소당류에 대한 분해율을 조사하였고, Eisele등(2)은 *Aerobacter aerogenes* pullulanase의 특성에 관하여, Norman 등(3)은 *Bacillus* sp. pullulanase의 성질에 관하여, Dessein 등(4)은 *Escherichia coli* pullulanase의 생성에 관하여, Mori 등(5)은 *Bacillus sectorramus* pullulanase를 정제하고 일반적 성질에 관하여 보고하였다. Taniguchi 등(6)은 *Bacillus circulans* F-2가 생산하는 amylase-pullulanase enzyme에 관하여, Ueda 등(7-9)은 *Aerobacter aerogenes* intracellular pullulanase와 extracellular pullulanase의 일반적 성질과 분해양식에 관하여 보고하였다. Kuriki 등(10)은 *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 내열성 pullulanase의 정제와 특성에 관하여, Ara 등(11)은 *Bacillus*

sp. KSM-1876 alkaline pullulanase의 특성에 관하여, Chung 등(12)은 *Bacillus cereus*에 의한 pullulanase의 생산 및 특성에 관하여 보고하였다. 미생물이 생산하는 pullulanase에 관한 연구는 현재까지 광범위하게 연구되어 있지 않은 실정이다.

필자 등은 토양으로부터 pullulanase의 생산능이 강한 *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*를 이미 분리, 동정하였으며, 본 연구는 이 균주가 생산하는 pullulanase를 정제하여 정제효소의 특성과 pullulan에 대한 분해율을 검토하고 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시균주

본 연구실에서 분리, 보관중인 *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*를 사용하였다.

기본배지

기본배지조성은 Table 1과 같다.

Key words: *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*, pullulanase, pullulan, purification, fractionation
*Corresponding author

Table 1. Basal medium for the enzyme production

Component	Content
Polypeptone	2.0%
Soluble starch	0.5%
K ₂ HPO ₄	0.3%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%
MnCl ₂	20 mg%

배양방법

전배양: 기본배지 50 ml를 200 ml 삼각 flask에 넣고 120°C에서 20분간 가압살균한 다음 공시균주를 2백금니 접종하여 35°C에서 24시간 진탕배양(Oscill. 120/stroke 5 cm/min)하였다.

본배양: 기본배지 50 ml를 200 ml 삼각 flask에 넣고 120°C에서 20분간 가압살균한 다음 전배양액 1 ml를 접종하고 35°C에서 진탕배양(Oscill. 120/stroke 5 cm/min)하였다.

조효소액의 조제

본배양액을 12,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성의 측정

기질: pullulan을 McIlvaine buffer(pH 6.5)에 녹여 1% 용액이 되도록 하였다.

측정방법: 1% pullulan 0.1 ml에 효소액 0.1 ml를 넣고 30분간 반응시킨 후 생성된 maltotriose를 DNS법에 의하여 정량하였다.

효소단위는 30분간에 1 μmole의 maltotriose를 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

Protein의 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등(13)의 방법에 따라 정량하였다.

Polyacrylamide disc gel electrophoresis

Davis의 방법(14)에 따랐으며 7.5% gel을 사용하였고 gel당 3 mA의 전류로 영동을 실시한 다음 CBBR-250으로 염색하고 7% acetic acid로 탈색하였다.

SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis

Weber와 Osborn의 방법(15)에 따랐다. 10% gel을 사용하였으며 gel당 8 mA의 전류로 실온에서 4시간 영동하였다. 영동 후 CBBR-250으로 염색한 후 7%

acetic acid로 탈색하였다. 분자량 측정의 경우에는 lysozyme(MW 14,300), β-lactoglobulin(MW 18,400), trypsinogen(MW 24,000), pepsin(MW 34,700), egg albumin(MW 45,000), bovine albumin(MW 66,000), rabbit muscle phosphorylase C(MW 97,000)를 표준 단백질로 사용하였다.

Gel electrofocusing

Wrigley의 방법(16)에 따랐으며 pH 3.5~10.0의 ampholine을 사용하고 350 V에서 4시간 통전하였다. 이 때 두개의 gel을 병행하여 실시하였고 그 중 한개는 5% TCA로 세척하여 ampholine을 완전히 제거하고 Amido Black 10B로 염색한 후 탈색하였다. 나머지 한개는 5 mm 간격으로 절단하고 각 slice를 2 ml의 증류수에 넣어 하룻밤 침출하여 pH를 측정하였다.

Paper chromatography

Whatman No.1 filter paper에 반응액을 10 μl씩 spot하고 60°C에서 상승법에 의하여 2회 전개시켰다. 전개제로는 65% n-propyl alcohol을 사용하였으며 전개 후 glucoamylase를 처리하고 40°C에서 1시간 반응시켜 alkaline silver nitrate dip method(17)에 의하여 발색시켰다.

효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation: 조효소액 900 ml에 ammonium sulfate를 0.9 포화도가 되도록 서서히 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 이 때 생긴 침전물을 소량의 50 mM Tris buffer(pH 8.5)에 용해시킨 다음 동일 완충액으로 투석하였다.

First DEAE-cellulose column chromatography: 투석액을 50 mM Tris buffer(pH 8.5)로 평형화시킨 column(2.0×40.0 cm)에 주입하고 동일 완충액 200 ml로 세척한 다음 reservoir에는 0.5 M NaCl을 함유하는 50 mM Tris buffer(pH 8.5) 200 ml와 mixing chamber에는 50 mM Tris buffer(pH 8.5) 200 ml를 넣고 용출시켰다. 이때 용출속도는 시간당 30 ml였고 10 ml씩 분획하였다.

Second DEAE-cellulose column chromatography: First DEAE-cellulose column chromatography의 활성 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 chromatography하였다. Reservoir에는 50 mM Tris buffer (pH 8.0, 0.5 M NaCl 함유) 200 ml와 mixing cham-

ber에는 50 mM Tris buffer(pH 8.0) 200 ml를 넣고 용출시켰다. 이때 용출속도는 시간당 30 ml였고 10 ml씩 분획하였다.

분해율의 측정

1%의 pullulan 1 ml에 각각 효소액 0.5 ml(0.25U)와 McIlvaine buffer(pH 6.5) 0.5 ml를 넣고 40°C에서 소정시간 반응시켰다. 반응액을 경시적으로 0.2 ml씩 취하여 100°C에서 5분간 자비하여 반응을 정지시킨 다음 Somogyi-Nelson법(18, 19)으로 환원당을 정량하였으며, 전당은 phenol sulfuric acid법(20)으로 정량하고, 분해율은 전당에 대한 환원당의 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

효소의 생산조건

배양온도 : 기본배지에 공시균주를 접종하고 20~40°C에서 48시간 배양한 결과는 Fig. 1과 같이 최적 배양온도는 35°C이었다.

배양시간 : 기본배지에 공시균을 접종하고 35°C에서 12~96시간 배양한 결과는 Fig. 1과 같이 최적 배양시간은 48시간이었다.

질소원의 첨가시험 : 질소원을 기본배지에 각각 1%씩 첨가하고 배양한 결과는 Table 2와 같이 질소원중 egg albumin, casein의 첨가는 각각 51.1%, 32.6%의 효소생산을 증가시켰다.

효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation에서 투석액 62

ml를 얻었으며, 이 액에 대하여 first DEAE-cellulose column chromatography를 한 결과 fraction No.41~55에서 pullulanase 활성 peak가 나타났다. 활성 peak부분을 모아 second DEAE-cellulose column chromatography를 한 결과는 Fig. 2와 같이 fraction No. 46~55에서 활성 peak가 나타났으며, 이부분을 모아 McIlvaine buffer(pH 6.5)로 투석하여 정제효소로 사용하였다.

정제효소의 polyacrylamide disc gel electrophoresis 결과는 Fig. 3과 같이 single band를 보였다.

이상의 정제과정을 요약하면 Table 3과 같이 본 정제효소의 specific activity는 82.37 U/mg.protein이고 yield는 62.1%이었다.

정제효소의 특성

분자량과 등전점 : SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 분자량을 측정된 결과는 Fig. 4와 같이 66,000으로 추정되었으며, 등전점은 Fig. 5와 같이 pH 5.0이었다.

Table 2. Effect of nitrogen sources on the enzyme production

Nitrogen sources	Relative activity(%)
Egg albumin	151.1
Casein	132.6
Urea	104.2
NH ₄ NO ₃	53.6
(NH ₄) ₂ HPO ₄	46.7
Yeast extract	32.1
Control	100.0

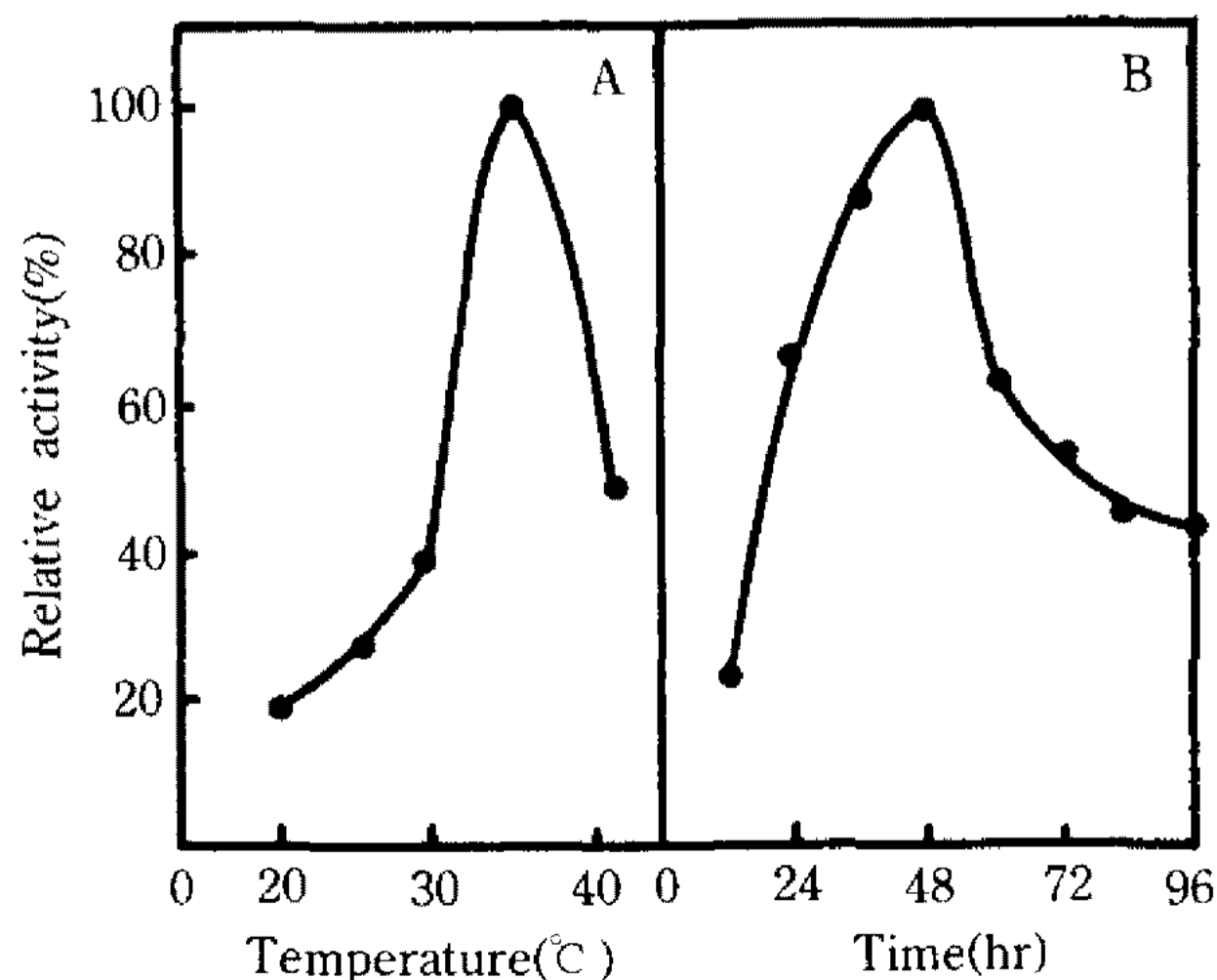


Fig. 1. Effect of cultural temperature and time on the enzyme production.

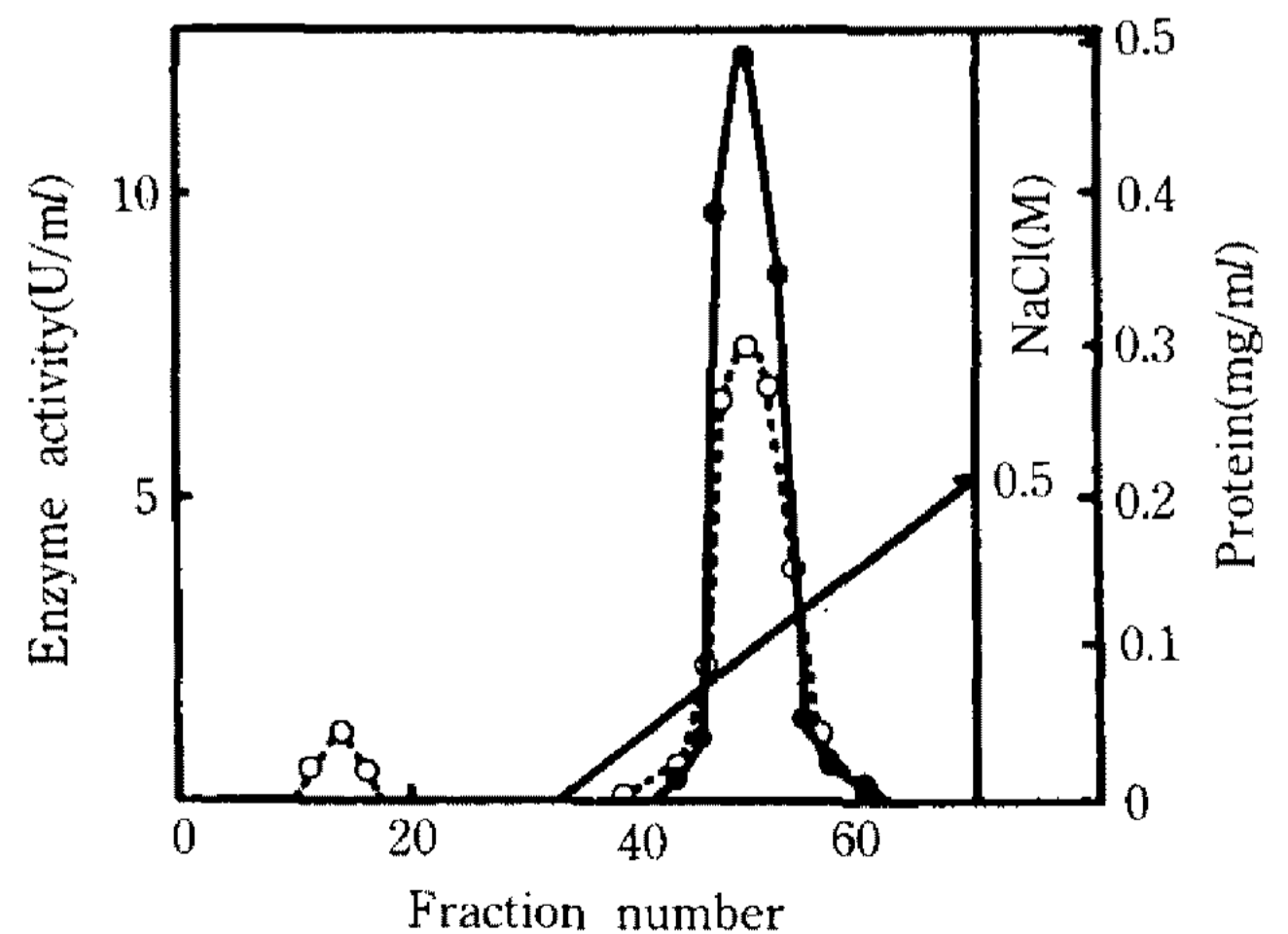


Fig. 2. Second column chromatography on DEAE-cellulose.

●-●: activity, ○-○: protein.

*Aerobacter aerogenes*의 extracellular와 intracellular pullulanase(7-9)의 분자량은 각각 58,000~66,000, 80,000~100,000, *Bacillus stearothermophilus* pullulanase(10)는 83,000, *Bacillus circulans* F-2 pullulanase(6)는 220,000이었고, *Bacillus cereus* pullulanase(12)의 등전점은 pH 7.0, *Bacillus* sp. KSM-1876 pullulanase(11)는 pH 4.13으로 균주에 따라 차이를 나타내었다.

최적온도, 열안정성 및 열안정성에 미치는 Ca^{2+} 의 영향: 20~70°C에서 효소의 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이 최적온도는 50°C이며, 55°C 이상에서는 효소활성이 낮았다.

효소액을 소정온도로 5분간 처리한 다음 효소의 잔존활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이 40°C에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나 그 이상의 온도에서는 활성이 급격히 감소하였다.

효소액에 동량의 10 mM $CaCl_2$ 를 혼합하고 50°C에서 5~20분간 처리한 후 잔존활성을 측정한 결과는 Fig. 7과 같이 Ca^{2+} 의 첨가는 효소의 내열성을 증가시켰다. 즉 50°C에서 20분간 열처리하였을 때 Ca^{2+} 첨가구는 약 60%의 잔존활성을 나타내었으나 무첨

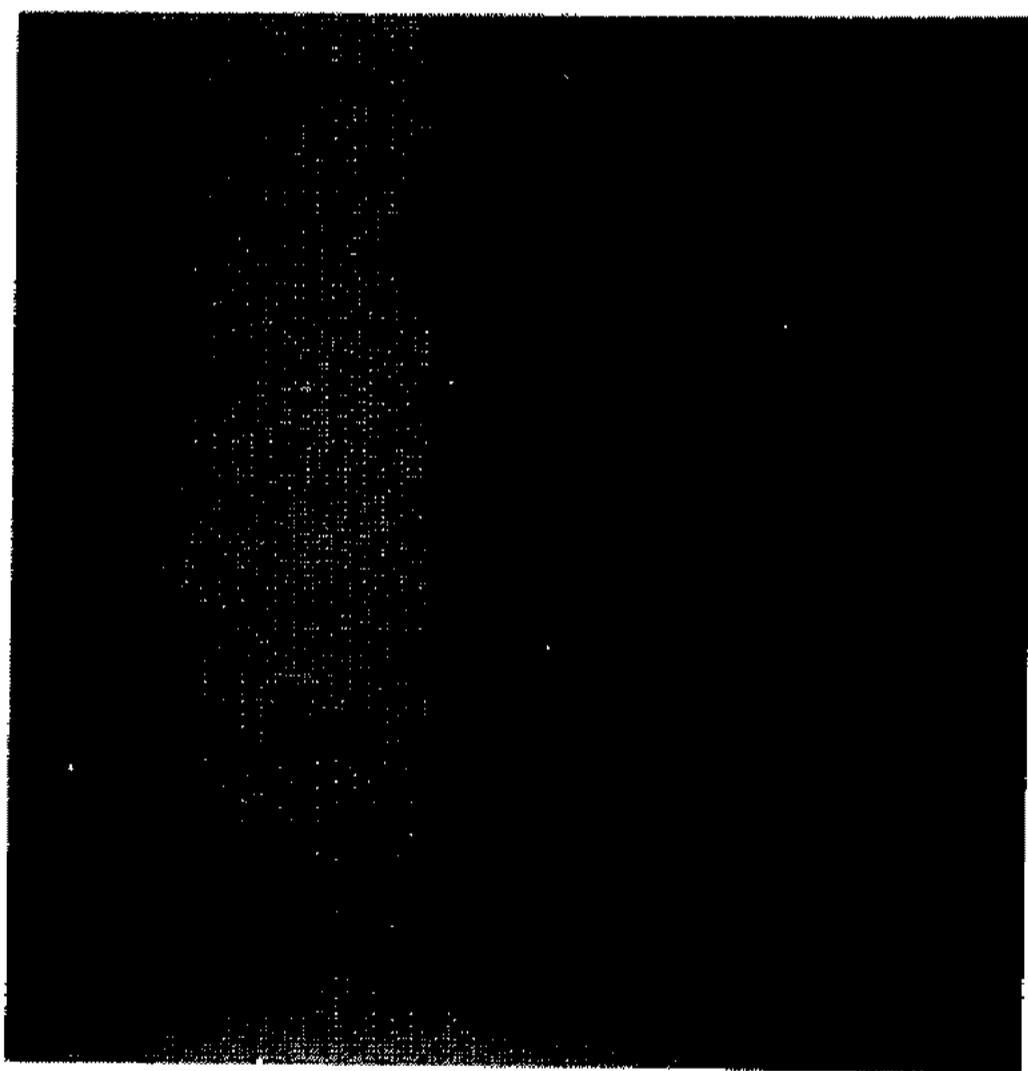


Fig. 3. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified enzyme.

가구는 거의 잔존활성이 없었다.

Bacillus cereus pullulanase(12)는 최적온도가 40°C, *Aerobacter aerogenes*(7-9), *Bacillus* sp. KSM-1876(11),

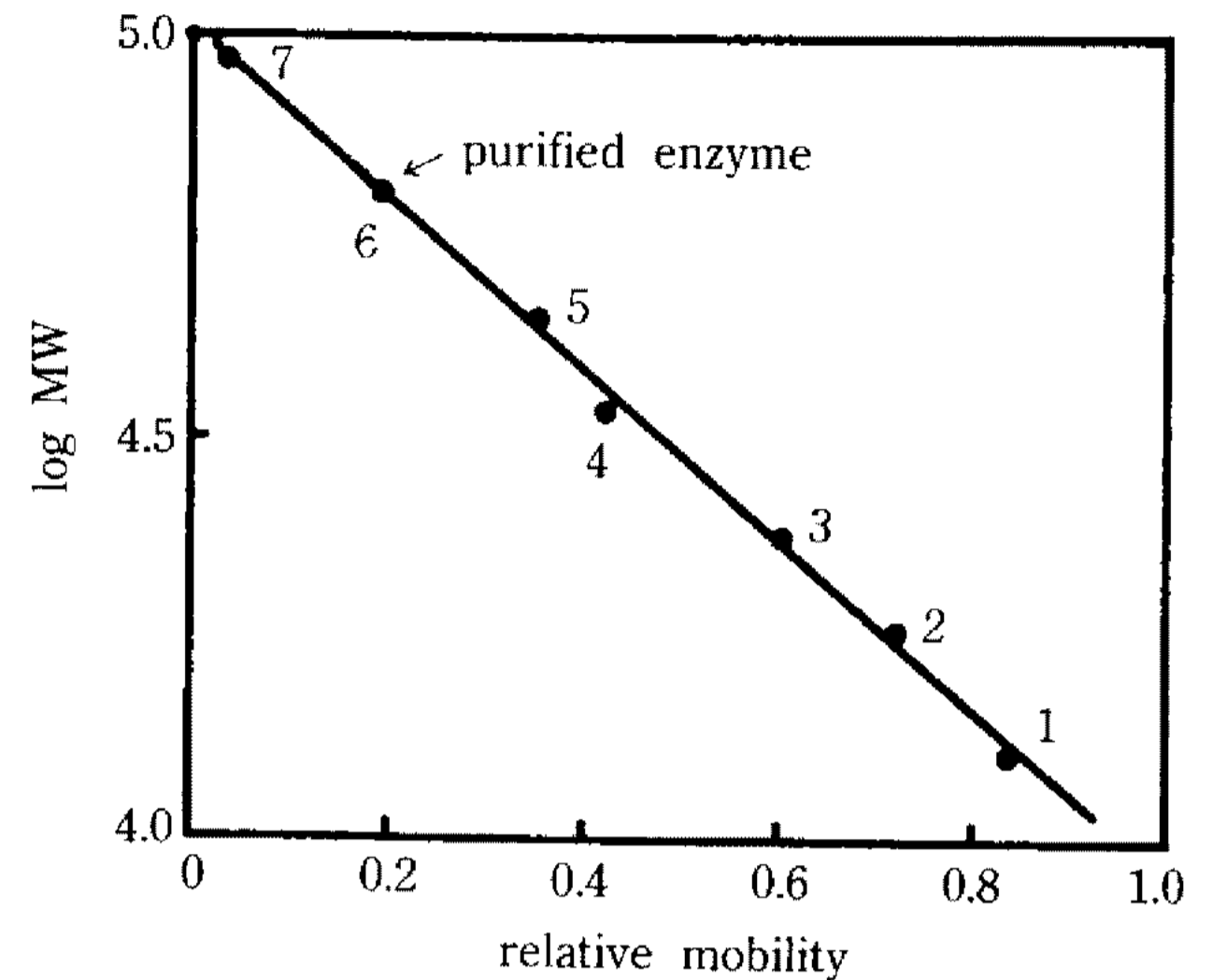


Fig. 4. Determination of molecular weight by SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified enzyme.

1. Lysozyme (MW 14,300), 2. α -lactoglobuline (MW 18,400), 3. Trypsinogen (MW 24,000), 4. Pepsin (MW 34,700), 5. Egg albumin (MW 45,000), 6. Bovine albumin (MW 66,000), 7. Rabbit muscle phosphorylase C (MW 97,000).

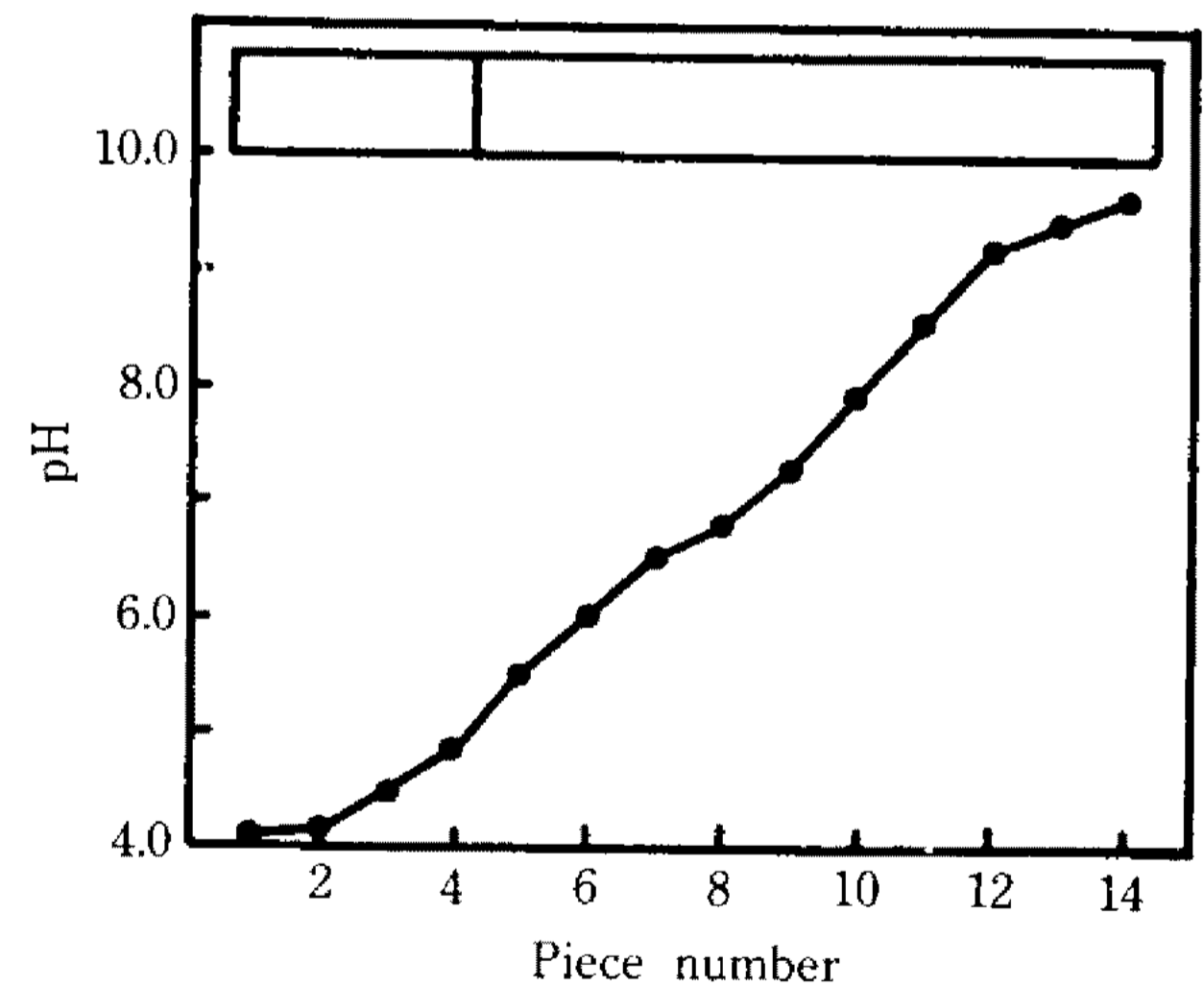


Fig. 5. Gel electrofocusing of the purified enzyme.

Table 3. Purification procedure

Procedure	Total activity (μ)	Total protein (mg)	Specific activity (μ /mg protein)	Yield (%)
Crude enzyme	1512.0	3951.0	0.38	100.0
$(NH_4)_2SO_4$ fractionation	1146.0	466.2	2.46	75.8
1st DEAE-cellulose column chromatography	1005.0	71.5	14.06	66.5
2nd DEAE-cellulose column chromatography	939.0	11.4	82.37	62.1

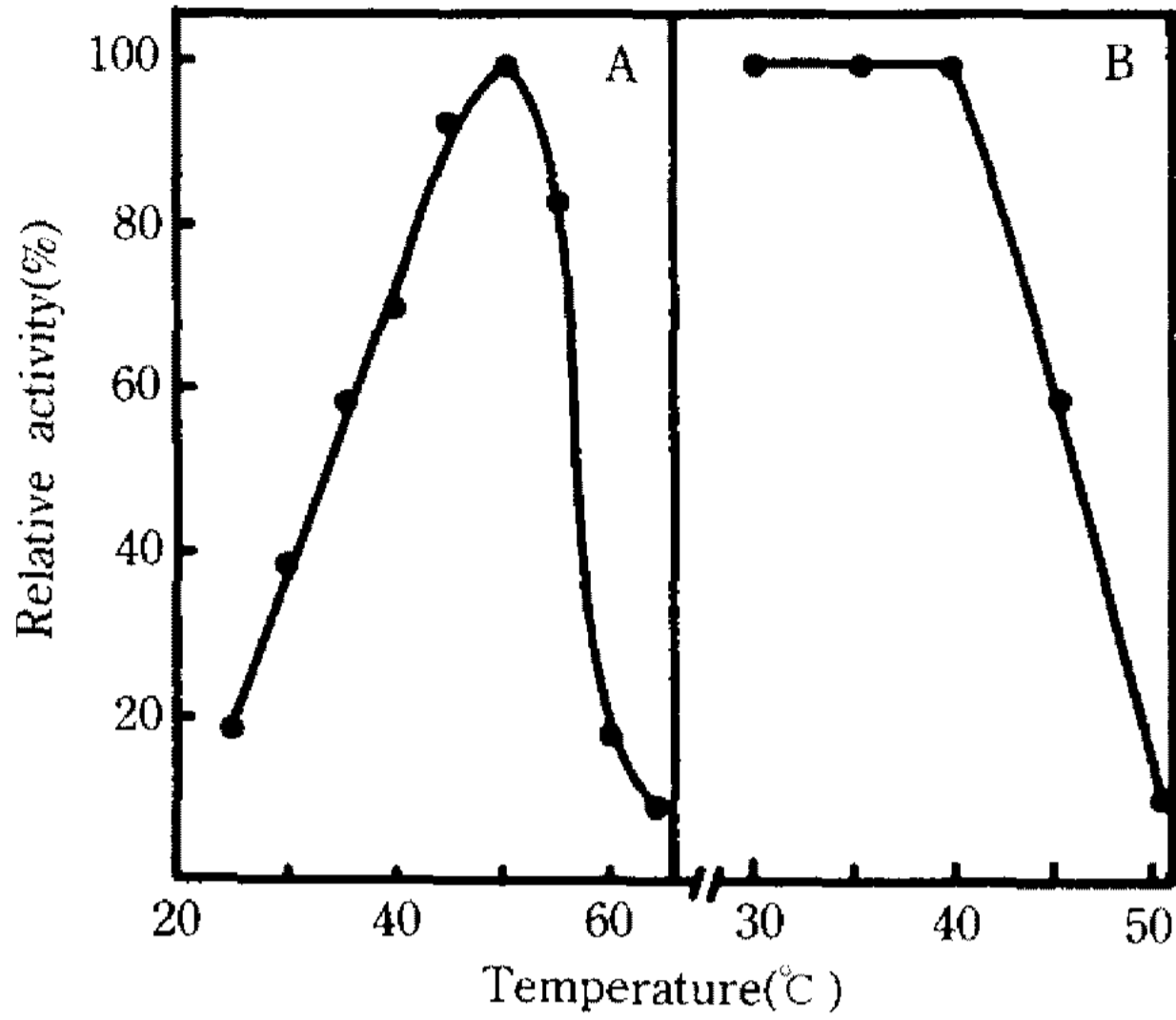


Fig. 6. Effect of temperature on the activity (A) and thermal stability (B) of the purified enzyme.

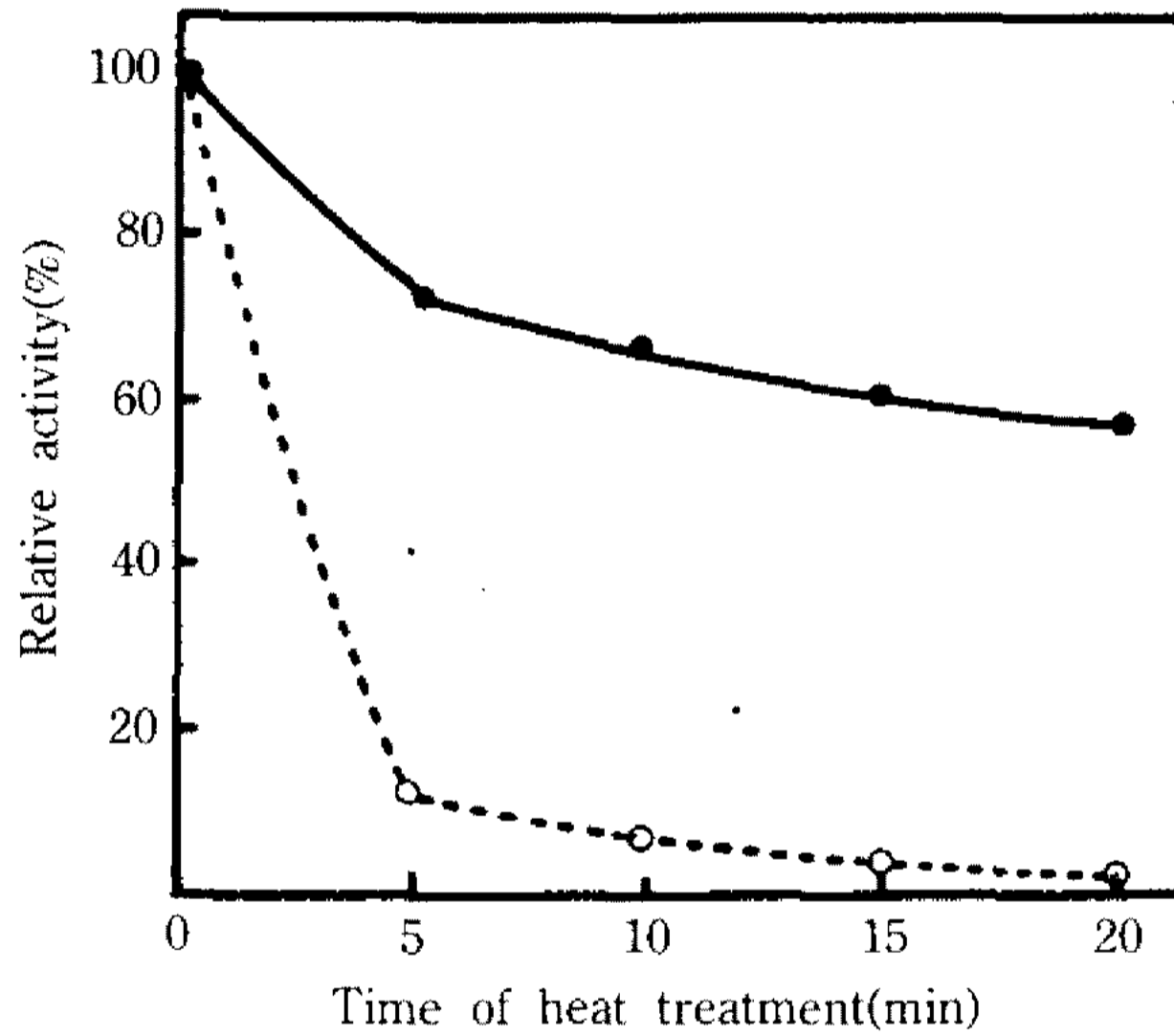


Fig. 7. Effect of Ca²⁺ on the thermal stability of the purified enzyme.
●-●: with CaCl₂, ○-○: without CaCl₂.

Bacillus circulans F-2(6)의 pullulanase는 50°C, *Bacillus stearothermophilus*의 pullulanase(10)는 65°C로 균주에 따라 효소의 최적온도가 다르다.

열안정성을 보면 *Bacillus cereus* pullulanase(12)는 35°C 이하에서, *Aerobacter aerogenes* pullulanase(7-9)는 50°C 이하에서, *Streptococcus mitis* pullulanase(1)는 40°C 이하에서 안정하였다. 이와 같이 열안정성은 균주에 따라 차이를 나타내고 있다.

열안정성에 미치는 Ca²⁺의 영향은 *Bacillus cereus* pullulanase(12)는 45°C에서 20분간 처리하였을 때 거의 잔존활성을 나타지 않았으나, Ca²⁺의 존재하에서는 약 50%의 잔존활성을 나타내었는데 본 효소도

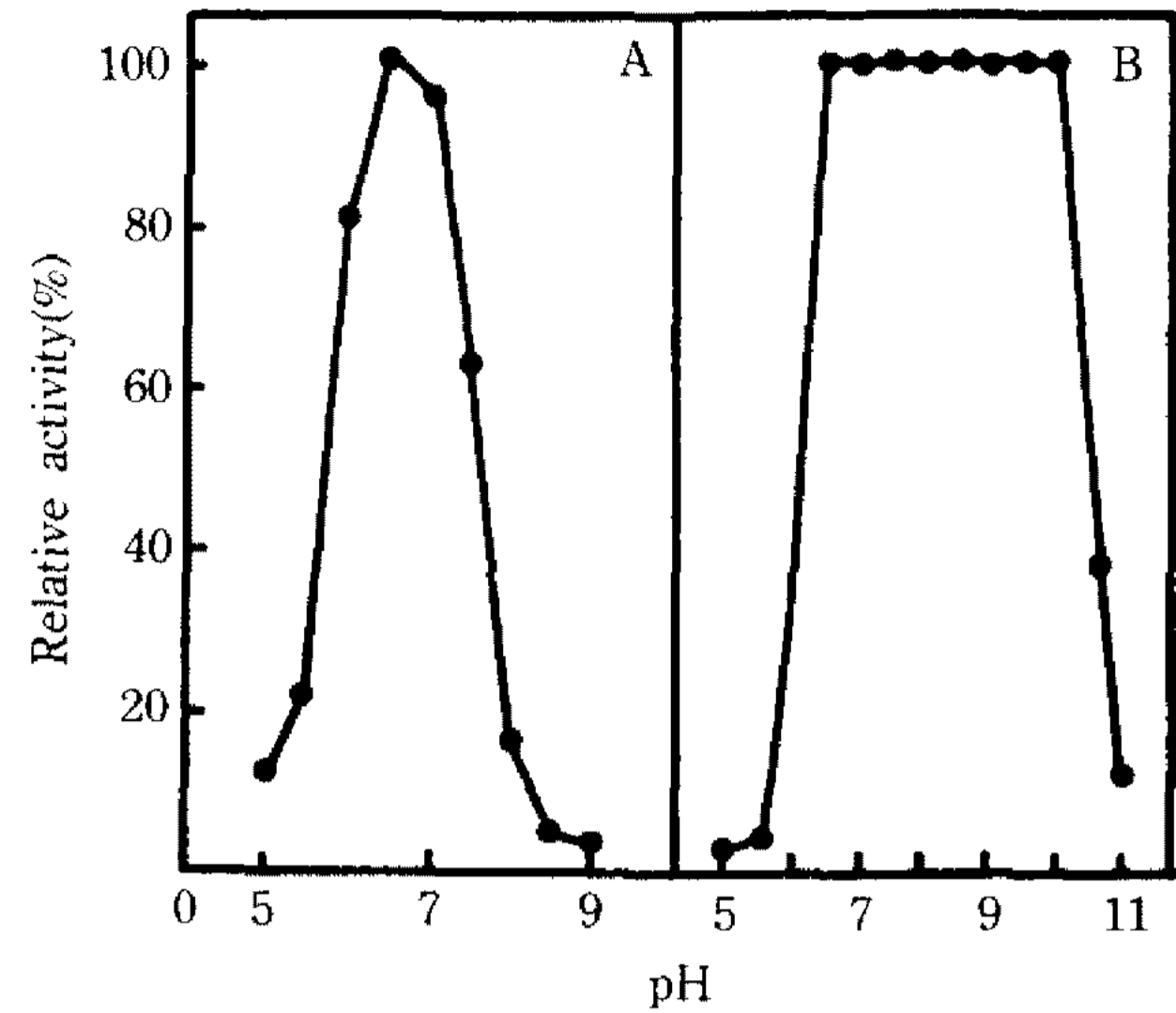


Fig. 8. Optimal pH (A) and pH stability (B) of the purified enzyme.

Table 4. Effect of metal ions on the purified enzyme

Metal salts	Concentration (mM)	Relative activity (%)
AgNO ₃	1	18.4
Li ₂ SO ₄	1	106.9
BaCl ₂	1	109.8
CaCl ₂	1	120.4
CdCl ₂	1	104.9
CoCl ₂	1	120.4
CuSO ₄	1	100.0
FeCl ₂	1	104.1
HgCl ₂	1	2.0
MgSO ₄	1	109.4
MnCl ₂	1	129.4
PbCl ₂	1	95.9
SnCl ₂	1	91.0
ZnSO ₄	1	113.1
AlCl ₃	1	112.2
Control	0	100.0

Ca²⁺에 의하여 내열성이 증가되었다.

최적 pH와 pH 안정성 : pH 4.0~7.5는 McIlvaine buffer, pH 8.0~10.5는 Atkins & Pantin buffer(Na₂CO₃, H₃BO₃-KCl buffer), pH 11.0~12.0은 Ringer buffer(Na₂HPO₄, NaOH buffer)를 사용하여 효소의 최적 pH를 측정된 결과는 Fig. 8과 같이 약 6.5였다. pH 안정성은 효소액의 pH를 소정 pH로 조절하고 4°C에서 24시간 방치 후 pH를 6.5로 조절하여 잔존활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 8에서와 같이 pH 6.5~10.0의 범위에서 안정하였다.

Table 5. Effect of various reagents on the purified enzyme

Reagents	Concentration (mM)	Relative activity (%)
EDTA	1	35.9
PCMB	1	80.8
SDS	1	102.9
IAA	1	110.2
Control	0	100.0

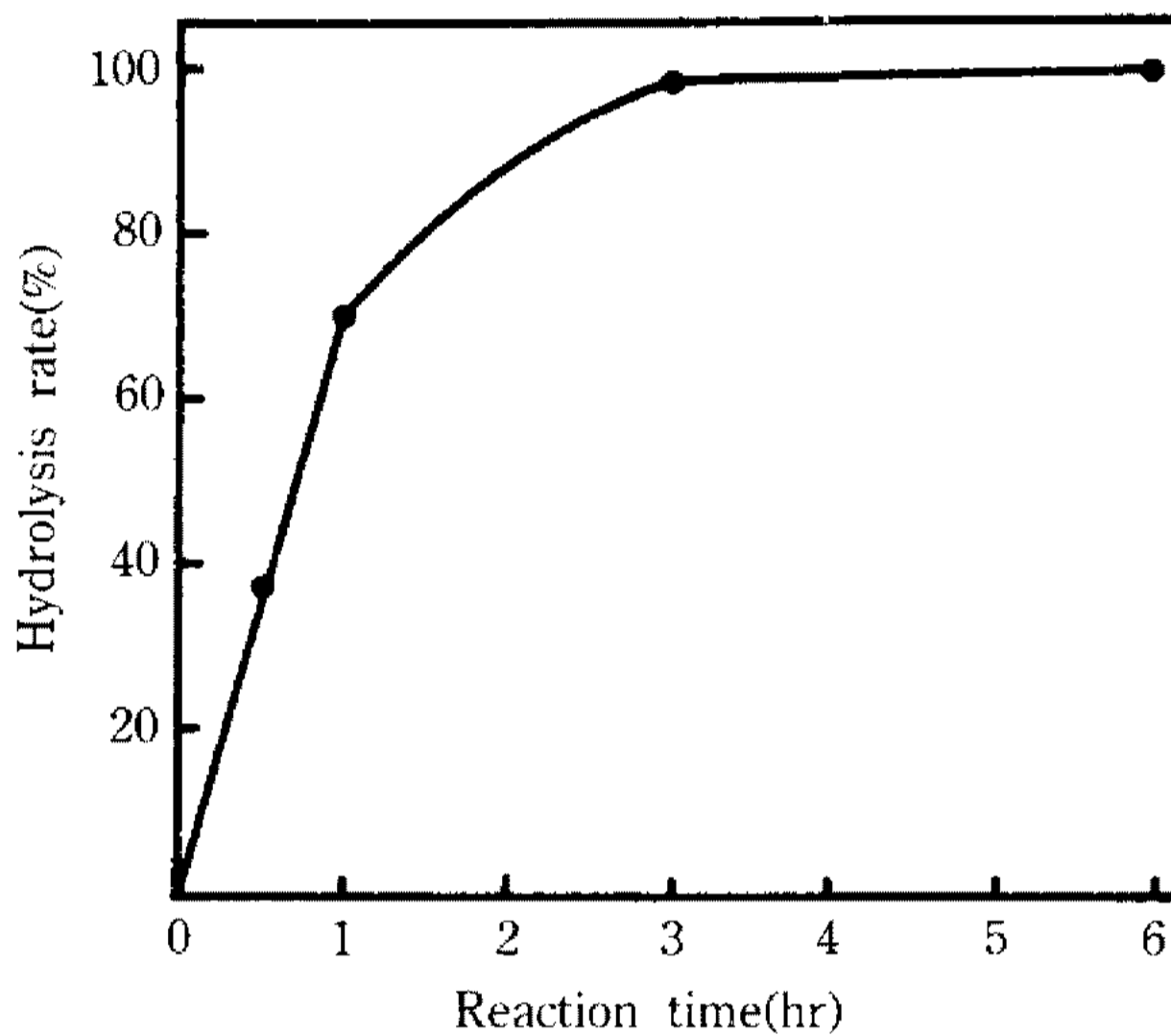


Fig. 9. Hydrolysis rate of pullulan.

Aerobacter aerogenes pullulanase(7-9)의 최적 pH는 6.0~6.5, *Streptococcus mitis* pullulanase(1)는 5.4~5.8이고, *Bacillus stearothermophilus*의 pullulanase(10)는 6.0, *Bacillus* sp. KSM-1876 pullulanase(11)는 10.0~10.5였다.

Aerobacter aerogenes pullulanase(7-9)의 pH 안정 범위는 5.0~11.0, *Bacillus cereus* pullulanase(12)는 6.5~11.0, *Bacillus stearothermophilus* pullulanase(10)는 6.0~8.5로 균주에 따라 차이를 나타내었다.

금속이온의 영향: 효소액에 각종 금속이온의 용액을 넣어 그 농도를 1 mM로 조절하고 30°C에서 30분간 처리한 후 잔존활성을 측정된 결과는 Table 4와 같이 본 효소는 Hg^{2+} 과 Ag^+ 에 의하여 각각 98%, 82% 실패되었다.

각종 시약의 영향: 효소액에 각종 시약을 첨가하여 그 농도를 1 mM로 조절하고 30°C에서 30분간 처리한 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과는 Table 5와 같이 본 효소의 활성은 EDTA에 의해 크게 저해되었다. 본 효소는 EDTA에 의해 크게 저해되는 것으로 보아 금속단백질에 속하는 효소로 생각된다.

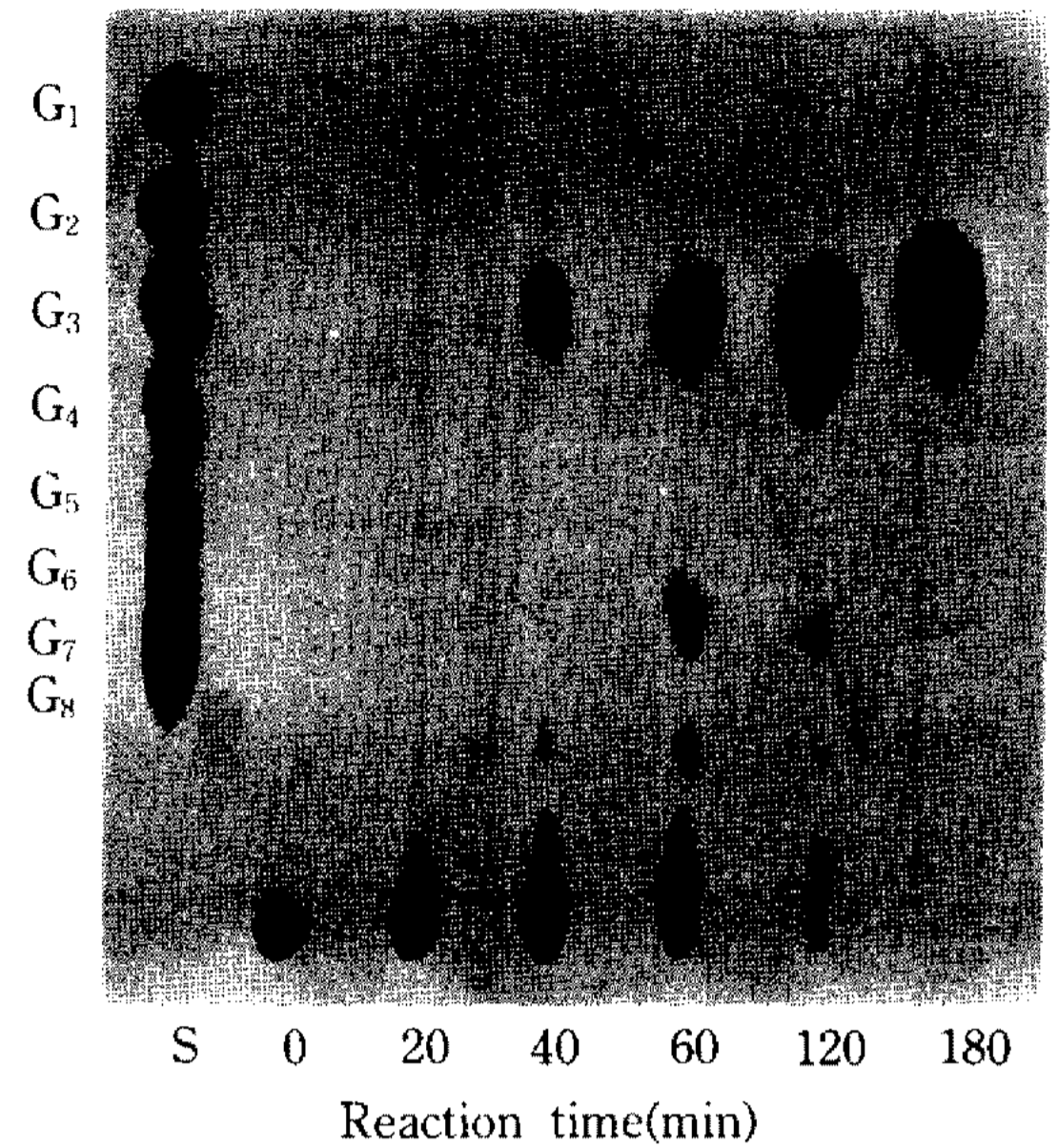


Fig. 10. Paper chromatograms of hydrolysis products on the pullulan.

G₁: glucose, G₂: maltose, G₃: maltotriose, G₄: maltotetraose, G₅: maltopentaose, G₆: maltohexaose, G₇: maltoheptaose, G₈: maltooctaose, S: Standard oligosaccharide.

Pullulan에 대한 분해율: 1% pullulan 1 ml에 효소액 0.5 ml(7.5U)와 McIlvaine buffer(pH 6.5) 0.5 ml를 넣어 40°C에서 소정시간 반응시켜 분해율을 측정된 결과는 Fig. 9와 같이 본 효소에 의하여 pullulan은 반응초기에서부터 분해가 급격하게 일어나 3시간 반응시켰을 때 완전히 분해되었다.

Pullulan에 대한 분해산물: 1% pullulan 1 ml에 효소액 0.5 ml(7.5U)와 McIlvaine buffer(pH 6.5) 0.5 ml를 넣고 40°C에서 소정시간 반응시켜 분해산물을 paper chromatography로 검출한 결과는 Fig. 10과 같이 본 효소는 pullulan의 α -1,6-glycosidic bond를 분해하여 maltotriose를 생성하였다.

이와같은 결과는 *Bacillus cereus* pullulanase(12), *Aerobacter aerogenes* pullulanase(7-9), potato pullulanase(21), *Bacillus sectorramus* pullulanase(5), *Bacillus* sp. KSM-1876 pullulanase(11), *Bacillus stearothermophilus* pullulanase(10), *Bacillus circulans* F-2 pullulanase(6)와 일치하였다.

요 약

Bacillus cereus subsp. *mycoides*에 의한 pullulanase 생산의 최적배양온도 및 배양시간은 각각 35°C, 48시간이고, 기본배지에 egg albumin, casein의 첨가는 효소의 생산을 증가시켰다. 황산암모늄분획, DEAE-

cellulose column chromatography에 의하여 효소를 정제하였고, 정제효소의 specific activity는 82.37 U/mg protein, yield는 62.1%이었다. 정제효소는 polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 single band를 나타내었고, SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 추정된 분자량은 66,000, 등전점은 pH 5.0, 최적온도는 50°C, 최적 pH는 6.5, 40°C 이하에서 안정하였고, pH 안정범위는 6.5~10.0, Ag⁺, Hg²⁺, EDTA에 의하여 크게 저해되었으며, Ca²⁺은 효소의 내열성을 증가시켰다. 본 효소의 pullulan에 대한 분해산물은 maltotriose이었다.

감사의 말씀

이 연구는 1993년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과입니다.

참고문헌

- Walker, G.J. 1968. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*(some properties of a pullulanase). *Biochem. J.* **108**: 33-40.
- Eisele, B., I.R. Rasched, and K. Wallenfels. 1972. Molecular characterization of pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Eur. J. Biochem.* **26**: 62-67.
- Norman, B.E. 1983. A novel *Bacillus* pullulanase-its properties and application in the glucose syrup industry. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 200-211.
- Dessein, A., and M. Schwartz. 1974. Is there a pullulanase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **45**: 363-366.
- Mori, S., S. Hirose, H. Tsuji, and T. Oya. 1991. Purification and some properties of a pullulanase from *Bacillus sectorramus*. *Denpun Kagaku* **38**: 9-16.
- Taniguchi, H., H. Sata, C.H. Kim, and Y. Maruyama. 1991. Amylase-pullulanase enzyme produced by *Bacillus circulans* F-2. *Denpun Kagaku* **38**: 165-171.
- Ueda, S., and R. Ohba. 1972. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2381-2391.
- Ueda, S., and R. Ohba. 1972. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Ibid.* **37**: 2821-2826.
- Ueda, S., and R. Ohba. 1975. Some properties of crystalline extra- and intra-cellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Ibid.* **39**: 967-972.
- Kuriki, T., J.H. Park, S. Okada, and T. Imanaki. 1988. Purification and characterization of thermostable pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and molecular cloning and expression of the gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2881-2883.
- Ara, K., K. Igarashi, K. saeki, S. Kawai, and S. Ito. 1992. Purification and some properties of an alkaline pullulanase from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1876. *Biosci, Biotech. Biochem.* **56**: 62-65.
- Chung, M.J., G.S. Lim, J.S. Woo, and D.S. Cho. 1992. Production and characteristics of pullulanase from *Bacillus cereus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 409-416.
- Lowry, O.H., N.J. Roserbrough, A.L. Farr, and R.S. Randall. 1951. Protein measurement with the folin, phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-295.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Weber, K., and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4006-4112.
- Wrigley, C.W. 1971. Gel electrofocusing. *Method in Enzymology.* **22**: 559-564.
- Trevelyan, W.E., D.P. Procter, and J.S. Harrison. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature.* **166**: 441-445.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation for the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Himilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-358.
- Ishizaki, Y., H. Taniguchi, Y. Maruyama, and M. Nakamura. 1983. Debranching enzyme of potato tubers. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 19-29.

(Received January 8, 1994)