

## *Bacillus cereus*에 의한 Pullulanase의 생산 및 특성

정만재\* · 임계숙 · 우정숙 · 조대선  
충북대학교 식품공학과

### Production and Characteristics of Pullulanase from *Bacillus cereus*

Chung, Man-Jae\*, Gye-Suk Lim, Jeong-Suk Woo and Dae-Sun Cho

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* were 15°C and 72 hrs, respectively. The addition of casein, nutrient broth and egg albumin to the basal medium, respectively, increased greatly the enzyme production. The enzyme was purified by ammonium sulfate fractionation, CM-cellulose and DEAE-cellulose column chromatographies. The specific activity of the purified enzyme was 29.09 U/mg protein and the yield of enzyme activity was 17.1%. The purified enzyme showed a single band on polyacrylamide disc gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be 61,000 by SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis. The isoelectric point for the purified enzyme was pH 7.0. The optimum temperature and pH were 40°C and 6.5. The purified enzyme was stable below 35°C and in the pH range of 6.5~11.0. It was greatly inhibited by Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>, and its thermal stability was increased by the addition of Ca<sup>2+</sup>. Among various substrates, pullulan was favorably hydrolyzed by the purified enzyme and the hydrolysis product on pullulan was maltotriose.

Ueda 등(1-3)은 *Aerobacter aerogenes* intracellular pullulanase와 extracellular pullulanase를 정제하고 정제효소의 일반적 성질을 비교검토하였으며, pullulanase의 amino acid 조성과 분해양식에 관하여, Takasaki(4)는 *Bacillus cereus* var. *mycoides pullulanase*를 정제하고 정제효소의 특성과 작용 pattern에 관하여 보고하였다. Walker(5)는 *Streptococcus mitis* pullulanase와 *Aerobacter aerogenes* pullulanase의 각종 기질에 대한 분해율을 비교하였고, Dessein 등(6)은 *Escherichia coli* pullulanase의 생성에 관하여, Norman(7)은 *Bacillus* sp. pullulanase의 활성에 미치는 온도 및 pH의 영향, pullulanase의 아미노산 조성 및 당화율에 미치는 pH의 영향에 관하여, Mori 등(8)은 *Bacillus sectorramus* pullulanase를 정제하고 정제효소의 일반적 성질과 분해산물에 관하여 보고하였다. 미생물이 생산하는 pullulanase의 특성에 관한 연구는

아직까지 광범위하게 연구되어 있지 않은 실정이다.

본 연구는 pullulanase의 생산능이 우수한 *Bacillus cereus*를 공시균주로 하여 pullulanase의 생산조건을 검토하였으며, 또한 pullulanase를 정제하여 정제효소의 특성 및 각종 기질에 대한 분해율을 검토하고 그 결과를 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 공시균주

*Bacillus cereus*(충북대학교 식품공학과 보관균주)를 사용하였다.

##### 기본배지

기본배지조성은 Table 1과 같다.

##### 배양방법

전 배양은 기본배지 50 ml를 200 ml 삼각 flask에 넣고 120°C 에서 20분간 가압살균 한 다음 공시균주를

**Key words:** *Bacillus cereus*, pullulanase, pullulan, purification

\*Corresponding author

**Table 1. Basal medium for the enzyme production**

Component	Content(%)
Polypeptone	2.0
Soluble starch	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
MnCl <sub>2</sub>	20 mg

3백rpm에 접종하여 30°C에서 16시간 진탕배양(Oscill. 120/stroke 5 cm/min)하였다.

본 배양은 기본배지 50 ml를 200 ml 삼각 flask에 넣고 120°C에서 20분간 가압살균 한 다음 전 배양액 1 ml를 접종하고 15°C에서 진탕배양(Oscill. 120/stroke 5 cm/min)하였다.

#### 조효소액의 조제

본 배양액을 12,000 rpm으로 30분간 원심분리 한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

#### 효소활성의 측정

기질의 조제는 pullulan 을 McIlvaine buffer(pH 6.5)에 녹여 1% 용액이 되도록 하였다. 효소활성의 측정은 1% pullulan 0.1 ml에 효소액 0.1 ml를 넣고 10분간 반응시킨 후 생성된 maltotriose를 DNS법에 의하여 정량하였다.

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

#### Protein의 정량

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry 등(9)의 방법에 따라 정량하였다.

#### Polyacrylamide disc gel electrophoresis

Davis의 방법(10)에 따라 실시하였으며 7.5% gel을 사용하였고 gel당 3 mA의 전류로 전기영동을 실시한 다음 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 7% acetic acid로 탈색하였다.

#### SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis

Weber와 Osborn(11)의 방법에 따라 실시하였다. 10% gel을 사용하였으며 gel당 8 mA의 전류로 실온에서 4시간 전기영동하였다. 전기영동 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 7% acetic acid로

탈색하였다. 분자량 측정의 경우에는 lysozyme(M.W. 14,300), β-lactoglobulin(M.W. 18,400), trypsinogen(M.W. 24,000), pepsin(M.W. 34,700), egg albumin(M.W. 45,000), bovine albumin(M.W. 66,000)을 표준단백질로 사용하였다.

#### Gel electrofocusing

Wrigley의 방법(12)에 따라 실시하였으며 pH 3.5~10.0의 ampholine을 사용하고 350 V에서 4시간 통전하였다. 이때 두개의 gel을 병행하여 실시하였고 그중 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(13)에 의하여 발색시켰다.

#### 효소의 정제

Ammonium sulfate fractionation : 조효소액 500 ml에 ammonium sulfate를 0.9포화도가 되도록 서서히 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 12,000 rpm으로 30분간 원심분리 하였다. 이때 생긴 침전물을 소량의 50 mM acetate buffer(pH 6.0)에 용해시킨 다음 동일 완충액으로 투석하였다.

CM-cellulose column chromatography : 투석액을 50 mM acetate buffer(pH 6.0)로 평형화시킨 column(2.0×40.0 cm)에 주입하고 동일 완충액 200 ml로 세척한 다음 reservoir에는 0.7 M NaCl을 함유하는 50 mM acetate buffer(pH 6.0) 350 ml와 mixing chamber에는 50 mM acetate buffer(pH 6.0) 350 ml를 넣고 용출시켰다. 이때 용출속도는 시간당 30 ml였고 10 ml씩 분획하였다.

DEAE-cellulose column chromatography : CM-cellulose column chromatography의 활성 peak부분을 모아 50 mM Tris buffer(pH 8.5)로 투석하였다. 이것을 50 mM Tris buffer(pH 8.5)로 평형화시킨 column에 주입하고 column chromatography를 실시하

였다. Reservoir에는 50 mM Tris buffer(pH 8.5, 0.5 M NaCl 함유) 300 ml와 mixing chamber에는 50 mM Tris buffer(pH 8.5) 300 ml를 넣고 용출시켰다. 이때 용출속도는 시간당 30 ml였고 10 ml씩 분획하였다.

**분해율의 측정**

1%의 pullulan 및 각종 호화전분용액 1 ml에 각각 효소액 0.2 ml(0.6 U)와 McIlvaine buffer(pH 6.5) 0.8 ml를 넣고 40°C 에서 소정시간 반응시켰다. 반응액을 경시적으로 0.2 ml씩 취하여 100°C 에서 5분간 자비하여 반응을 정지시킨 후 Somogyi-Nelson법(14, 15)으로 환원당을 정량하였으며, 전당은 phenol sulfuric acid법(16)으로 정량하고, 분해율은 전당에 대한 환원당의 백분율로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**효소의 생산조건**

**배양온도 및 시간 :** 기본배지에 공시균주를 접종하고 10~35°C 에서 72시간 배양한 결과는 Fig. 1과 같이 최적 배양온도는 15°C 이었으며, 15°C 에서 24~120시간 배양 하였을때 최적 배양시간은 72시간이었다.

*Bacillus cereus* var. *mycoides*(4)의 pullulanase 생산에 가장 적합한 온도와 배양시간은 각각 30°C , 25시간, *Bacillus sectorramus*(8)는 각각 37°C , 40시간, *Aerobacter aerogenes*(1-3)는 각각 30°C , 120시간인데 비하여 본 균주에 의한 pullulanase 생산의 최적 배

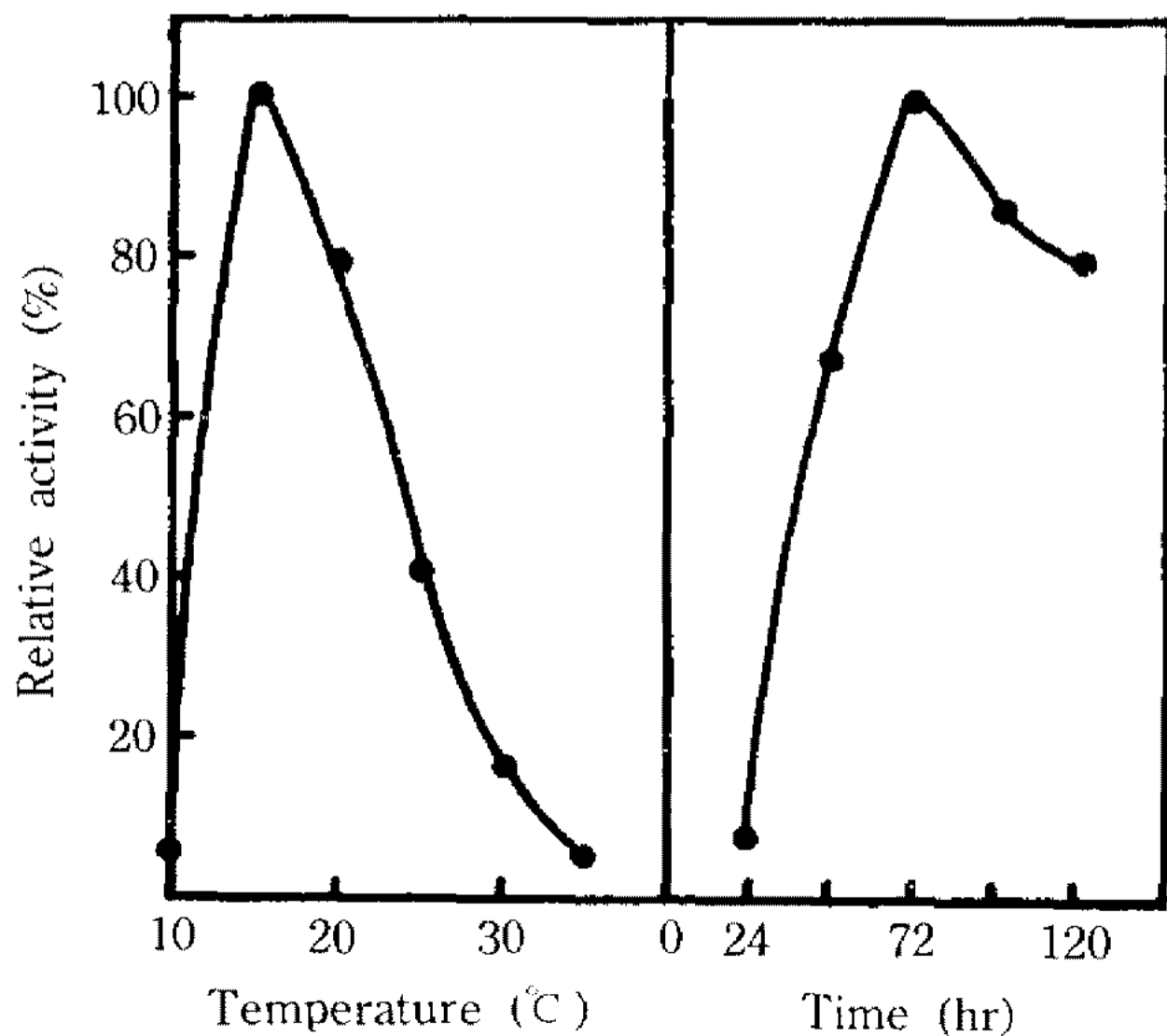


Fig. 1. Effect of cultural temperature and time on the enzyme production.

양온도는 15°C 로서 이들에 비하여 상당히 낮았다.

**질소원 및 탄소원의 첨가시험 :** 질소원 및 탄소원을 기본배지에 각각 1%씩 첨가하고 배양한 결과는 Table 2, 3과 같으며 질소원중 casein, nutrient broth, egg albumin의 첨가는 각각 107.1, 34.9, 25.8%의 효소생산을 증가시켰다.

*Bacillus cereus* var. *mycoides*(4)의 pullulanase 생산에 casein, meat extract가 효과적이었는데 본 균주에 의한 pullulanase의 생산에도 casein의 첨가가 효과적이었다.

**효소의 정제**

Ammonium sulfate fractionation에서 투석액 42 ml를 얻었으며, 이 액에 대하여 CM-cellulose column chromatography를 실시한 결과 fraction No. 63~85에서 pullulanase의 활성 peak가 나타났다. 활성 peak부분을 모아 DEAE-cellulose column chromatography를 실시한 결과는 Fig. 2와 같이 fraction No. 56~70에서 활성 peak가 나타났으며, 이 부분을 모아 McIlvaine buffer(pH 6.5)로 투석하여 정제효소로 사용하였다.

Table 2. Effect of nitrogen source on the enzyme production

Nitrogen source	Relative activity(%)
Yeast extract	91.2
Egg albumin	125.8
Casein	207.1
Nutrient broth	134.9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	79.4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100.1
Urea	91.9
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	73.4
Control	100.0

Table 3. Effect of carbon source on the enzyme production

Carbon source	Relative activity (%)
Glucose	37.8
Fructose	26.7
Sucrose	33.3
Maltose	77.8
Corn starch	88.9
Control	100.0

정제효소의 polyacrylamide disc gel electrophoresis 결과는 Fig. 3과 같이 relative mobility가 0.17인 single band를 나타내었다.

이상의 정제과정을 요약하면 Table 4와 같이 본 정제효소의 specific activity는 29.09 U/mg protein이

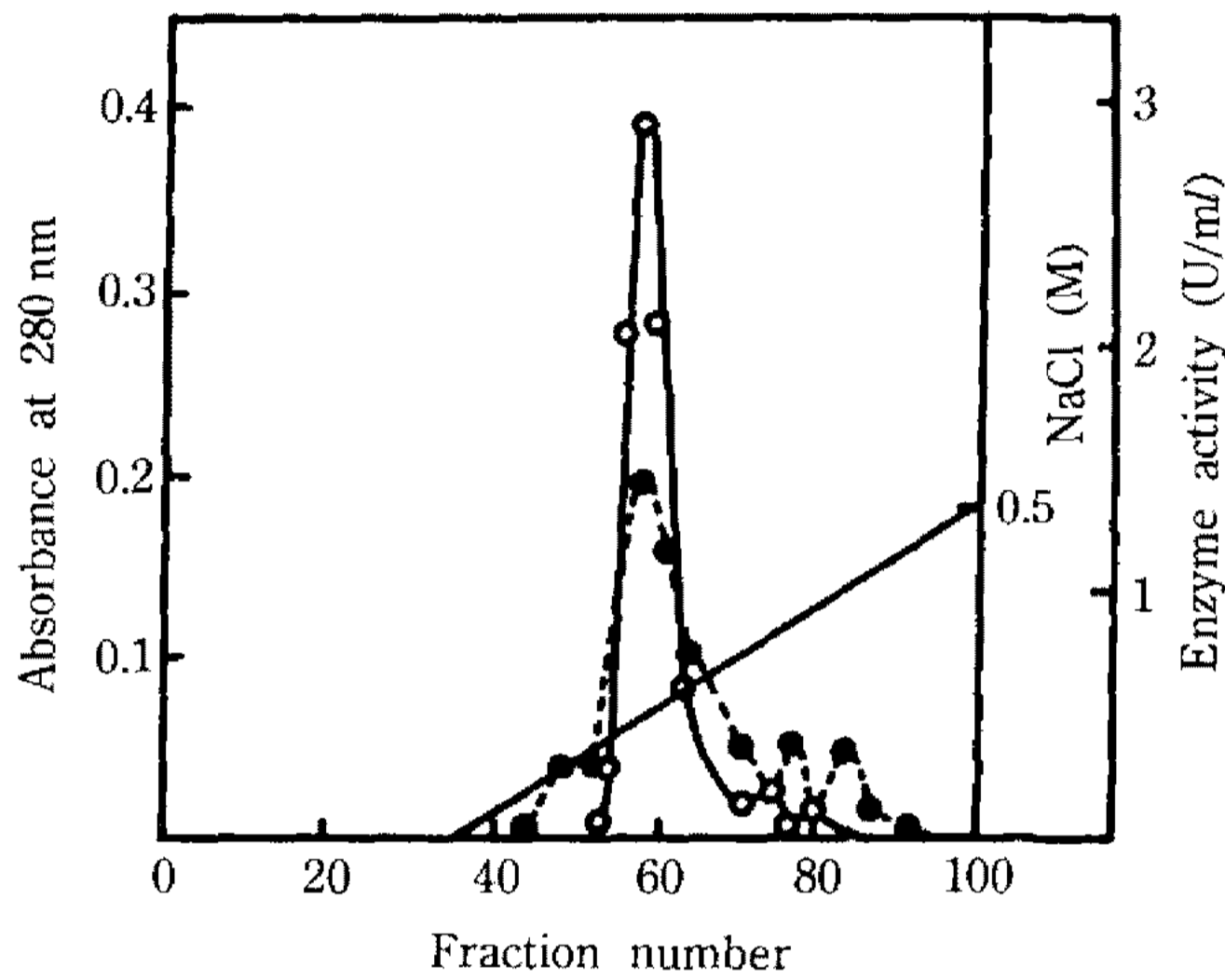


Fig. 2. Column chromatography on DEAE-cellulose. ○—○: activity, ●---●: protein

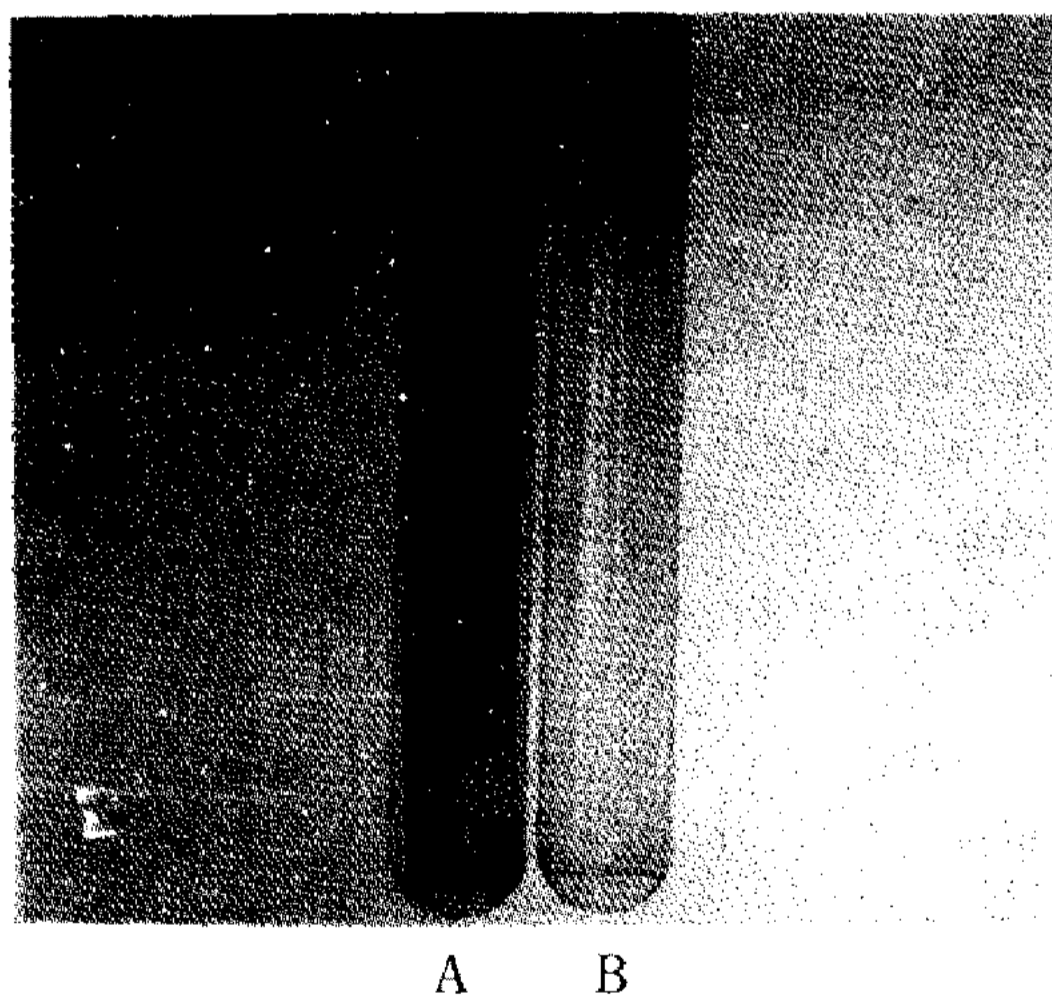


Fig. 3. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the crude enzyme (A) and the purified enzyme (B).

고 yield는 17.1%이었다.

정제효소의 특성

분자량과 등전점 : SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 분자량을 측정된 결과는 Fig. 4와 같이 61,000으로 추정되었으며, 등전점은 Fig. 5와 같이 pH 7.0이었다.

*Bacillus cereus* var. *mycoides* pullulanase(4)는 110,000±20,000, *Aerobacter aerogenes*의 extracellular와 intracellular pullulanase(1-3)는 각각 58,000~66,000, 80,000~100,000이었고, *Aerobacter aerogenes*의 extracellular pullulanase(1-3)의 등전점은 각각 pH 3.72, 4.35, 7.7, intracellular pullulanase의 등전점은 각각 pH 3.88, 4.46, 7.6으로서 균주에 따라 차

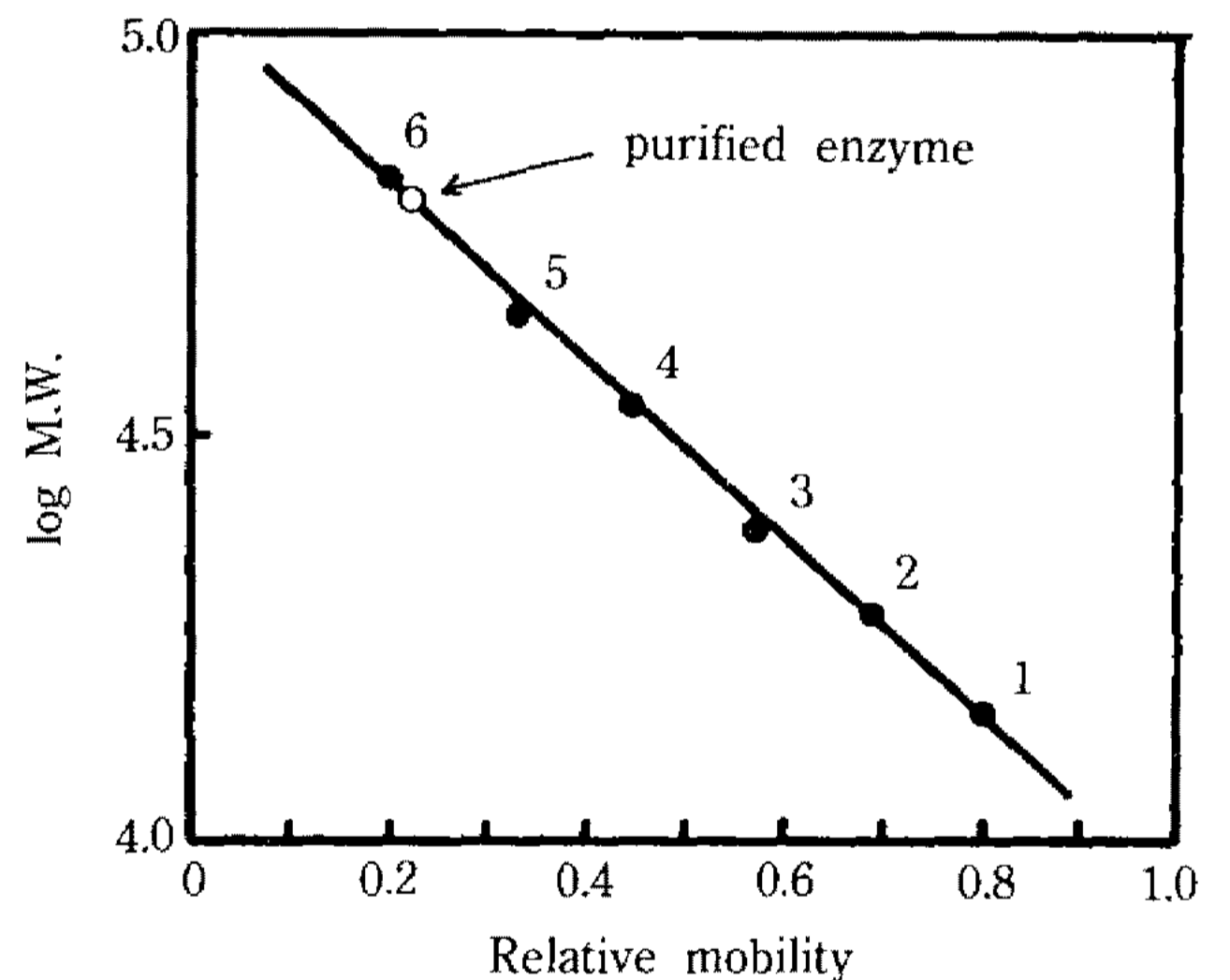


Fig. 4. Determination of molecular weight by SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified enzyme.

- 1. Lysozyme (M.W. 14,300)
- 2. β-lactoglobulin (M.W. 18,400)
- 3. Trypsinogen (M.W. 24,000)
- 4. Pepsin (M.W. 34,700)
- 5. Egg albumin (M.W. 45,000)
- 6. Bovine albumin (M.W. 66,000)

Table 4. Purification procedure

Procedure	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)
Crude enzyme	798.5	5,666.0	0.14	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	395.8	135.2	2.93	49.6
CM-cellulose column chromatography	341.6	19.5	17.52	42.8
DEAE-cellulose column chromatography	136.7	4.7	29.09	17.1

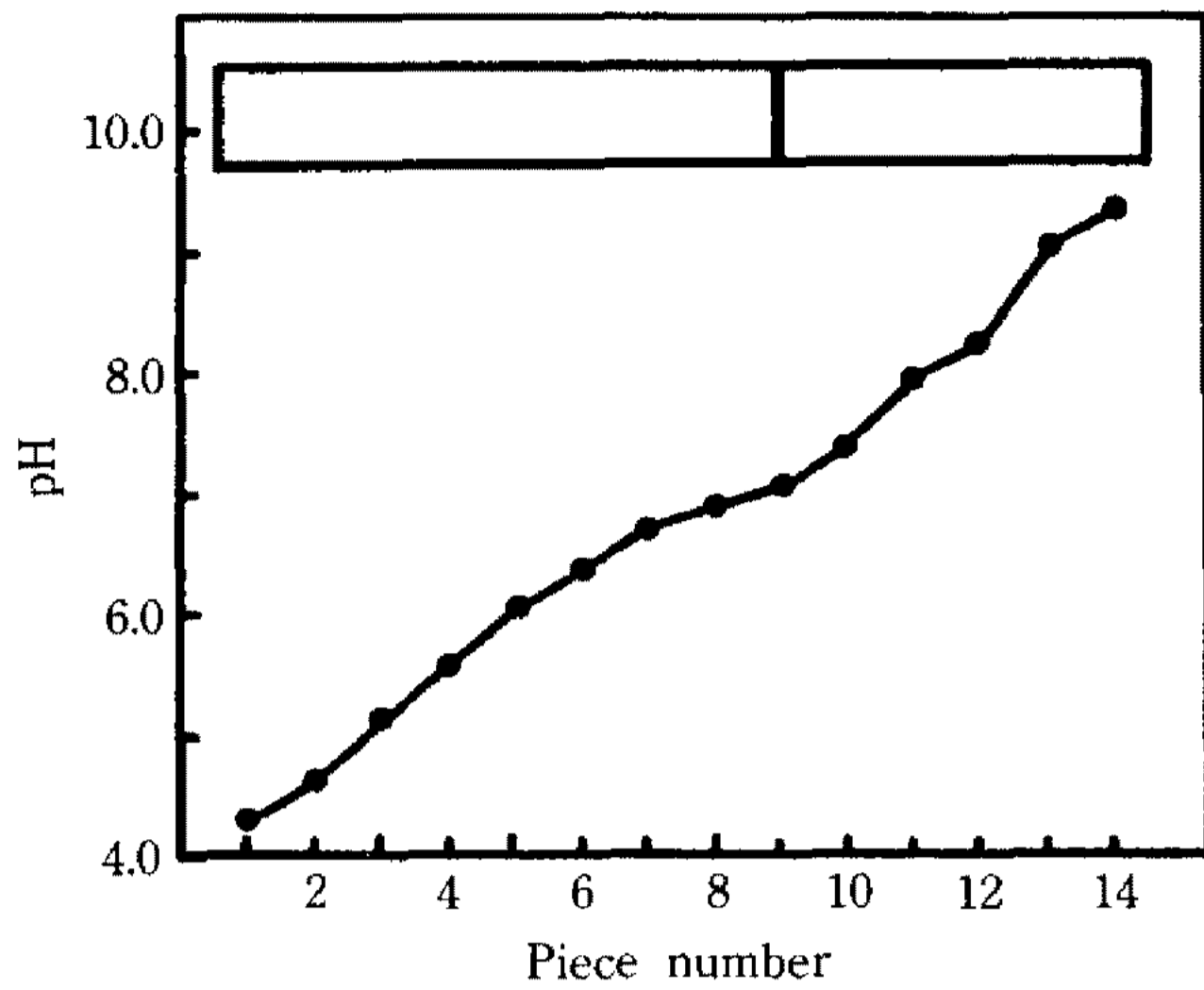


Fig. 5. Gel electrofocusing of the purified enzyme.

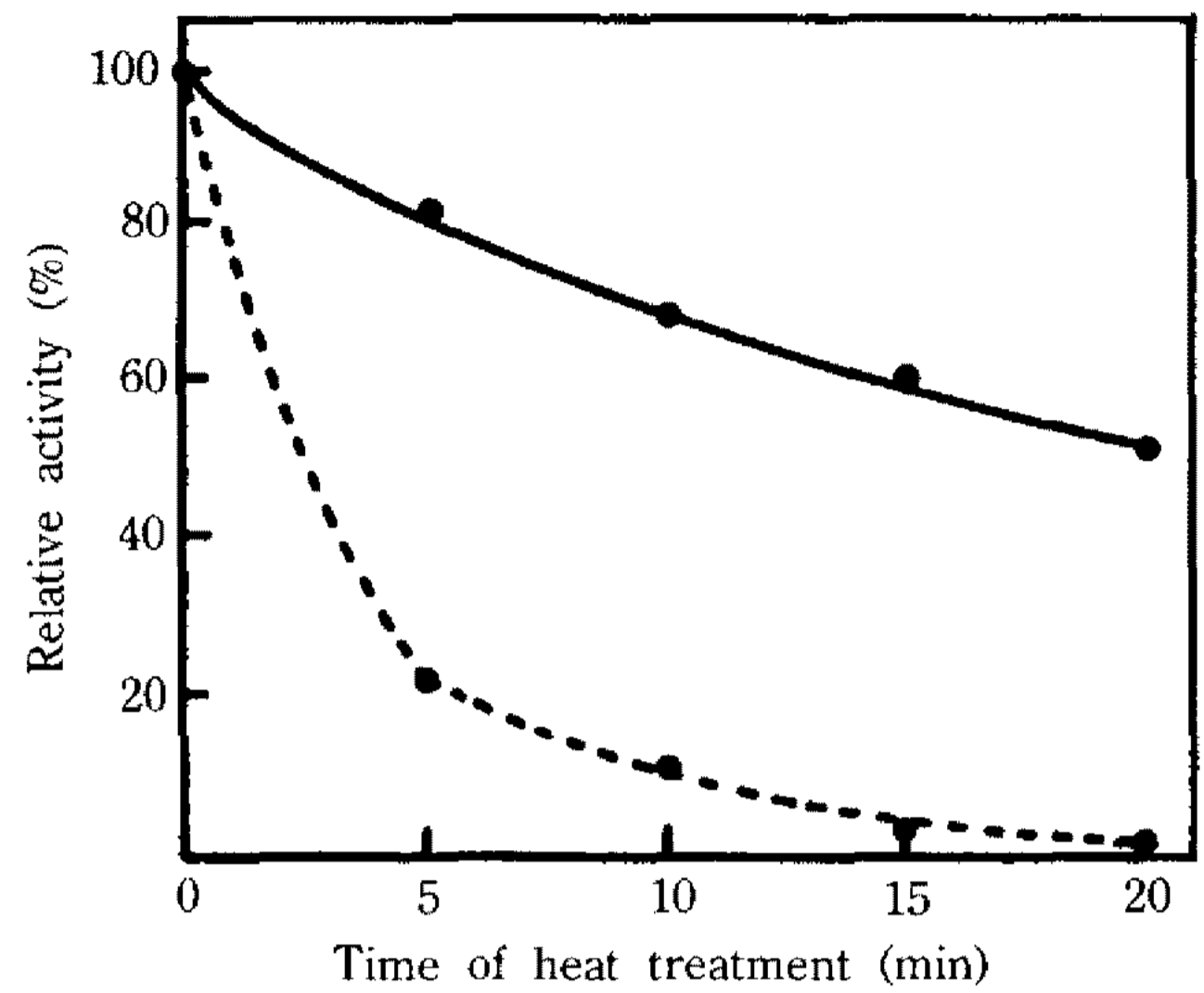


Fig. 7. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the thermal stability of the purified enzyme.

●—●: with CaCl<sub>2</sub>, ●---●: without CaCl<sub>2</sub>

구는 거의 잔존활성이 없었다.

*Aerobacter aerogenes*(1-3)와 *Bacillus cereus* var. *mycooides* pullulanase(4)는 최적온도가 50°C, *Bacillus* sp. pullulanase(7)는 60°C 인데 비하여 본효소는 약간 낮은 편이며, 열안정성을 보면 *Bacillus cereus* var. *mycooides* pullulanase(4)는 45°C 이하에서, *Aerobacter aerogenes* pullulanase(1-3)는 50°C 이하에서, *Streptococcus mitis* pullulanase(5)는 40°C 이하에서 안정하였는데 본효소는 이들 효소에 비해 내열성이 약한 것으로 나타났다.

열안정성에 미치는 Ca<sup>2+</sup>의 영향을 보면 *Bacillus cereus* var. *mycooides* pullulanase(4)는 50°C 에서 20분간 처리하였을 때 약 20%의 잔존활성을 나타내었으나 Ca<sup>2+</sup>의 존재하에서는 전혀 불활성화되지 않았다. 본 효소는 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 내열성이 증가 되었다.

최적 pH와 pH안정성 : pH 5.0~6.0은 acetate buffer, pH 6.5~8.0은 McIlvaine buffer, pH 8.5~10.5는 Atkins & Pantin buffer(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KCl buffer), pH 11.0~12.0은 Ringer buffer(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaOH buffer)를 사용하여 효소의 최적 pH를 측정된 결과는 Fig. 8과 같이 6.5이었다. pH안정성은 효소액의 pH를 소정 pH로 조절하고 4°C 에서 24시간 방치한 후 pH를 6.5로 조절하여 잔존활성을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 8과 같이 pH 6.5~11.0의 범위에서 안정하였다.

*Aerobacter aerogenes*(1-3)와 *Bacillus cereus* var. *mycooides* pullulanase(4)의 최적 pH는 6.0~6.5, *Streptococcus mitis* pullulanase(5)는 5.4~5.8이고, *Aerobacter aerogenes* pullulanase(1-3)의 pH안정범위는

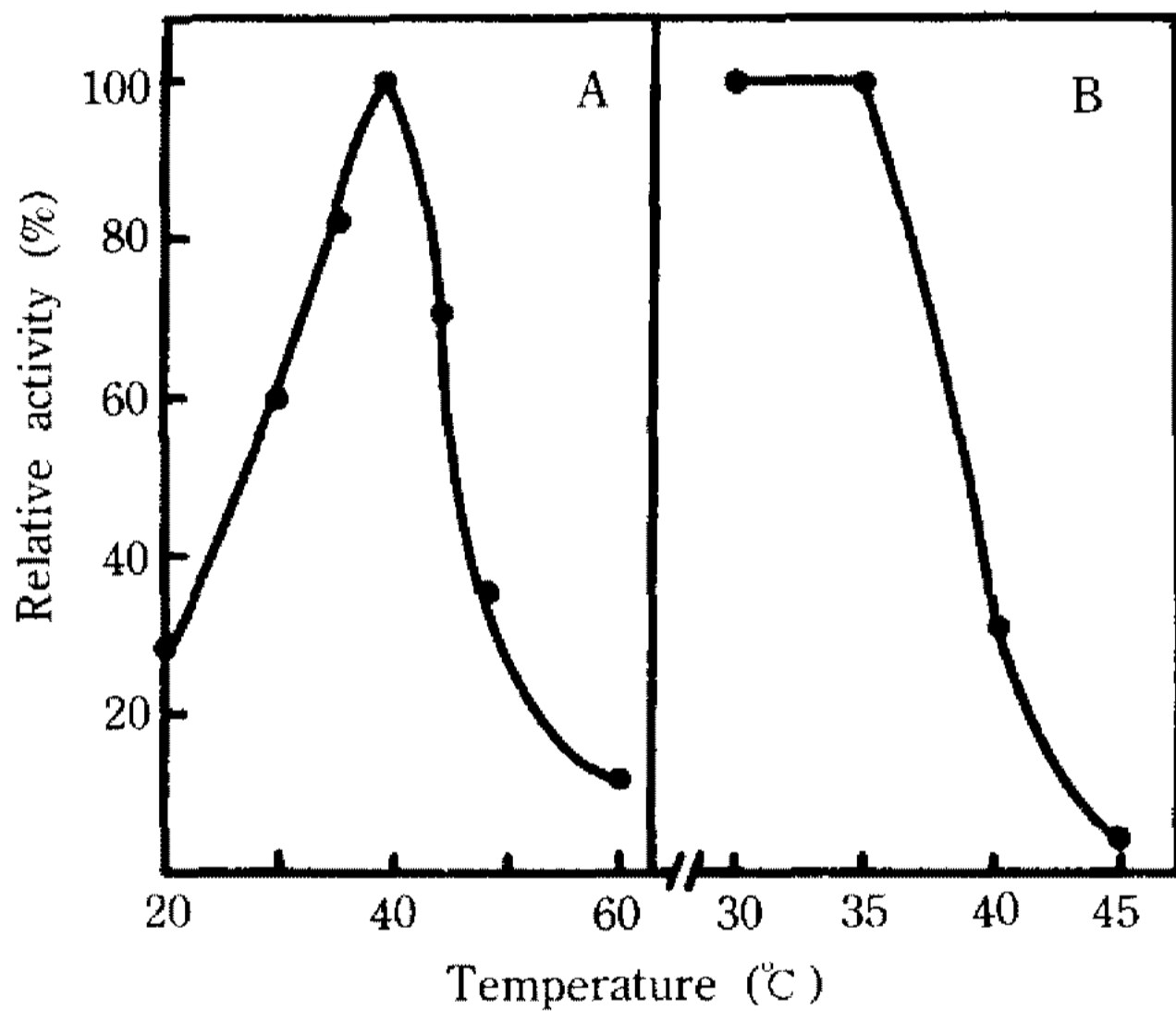


Fig. 6. Effect of temperature on the activity (A) and the thermal stability (B) of the purified enzyme.

이를 나타내고 있다.

최적온도, 열안정성 및 열안정성에 미치는 Ca<sup>2+</sup>의 영향 : 20~60°C 에서 효소의 활성을 측정한 결과는 Fig. 6과 같이 최적온도는 40°C 이며, 45°C 이상에서는 급격하게 효소활성이 감소되었다.

효소액을 소정온도로 15분간 처리한 후 잔존활성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같이 35°C 에서는 100%의 잔존활성을 나타내었으나 그 이상의 온도에서는 활성이 급격하게 감소되었다.

효소액에 동량의 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 혼합하고 45°C 에서 5~20분간 처리한 후 잔존활성을 측정된 결과는 Fig. 7과 같이 Ca<sup>2+</sup>의 첨가는 효소의 내열성을 증가시켰다. 즉 45°C 에서 20분간 처리하였을 때 Ca<sup>2+</sup> 첨가구는 약 50%의 잔존활성을 나타내었으나 무첨가

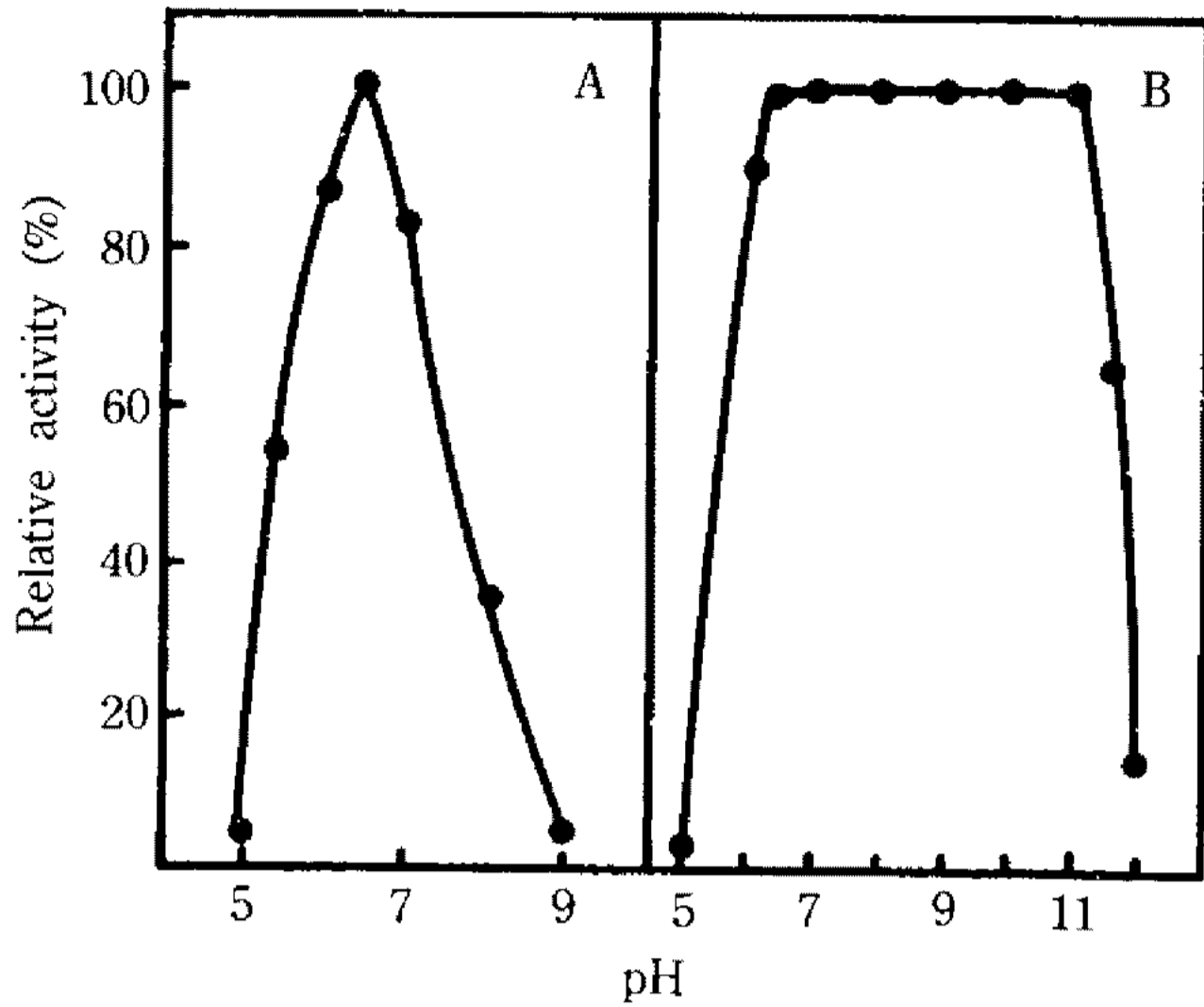


Fig. 8. Optimal pH (A) and pH stability (B) of the purified enzyme.

Table 5. Effect of metal ions on the purified enzyme

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
AlCl <sub>3</sub>	1	72.9
AgNO <sub>3</sub>	1	0.0
BaCl <sub>2</sub>	1	90.0
CaCl <sub>2</sub>	1	105.7
CdCl <sub>2</sub>	1	110.7
CoCl <sub>2</sub>	1	101.4
CuSO <sub>4</sub>	1	97.9
FeCl <sub>2</sub>	1	72.1
HgCl <sub>2</sub>	1	7.4
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	91.4
MgSO <sub>4</sub>	1	95.7
MnCl <sub>2</sub>	1	117.1
PbCl <sub>2</sub>	1	72.9
SnCl <sub>2</sub>	1	92.1
ZnSO <sub>4</sub>	1	27.1
Control	0	100.0

5.0~11.0, *Bacillus cereus* var. *mycoides* pullulanase (4)는 6.0~9.0으로 균주에 따라 약간의 차이를 나타내었다.

**금속이온의 영향**: 효소액에 각종 금속이온의 용액을 넣어 그 농도를 1 mM로 조절하고 30°C에서 30분간 처리한 후 잔존활성을 측정된 결과는 Table 5와 같이 본 효소는 Ag<sup>+</sup>에 의하여 완전히 실활되었고 Hg<sup>2+</sup>과 Zn<sup>2+</sup>에 의하여 각각 93, 73% 실활되었다. Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>은 효소의 활성을 각각 약 17, 11, 6%

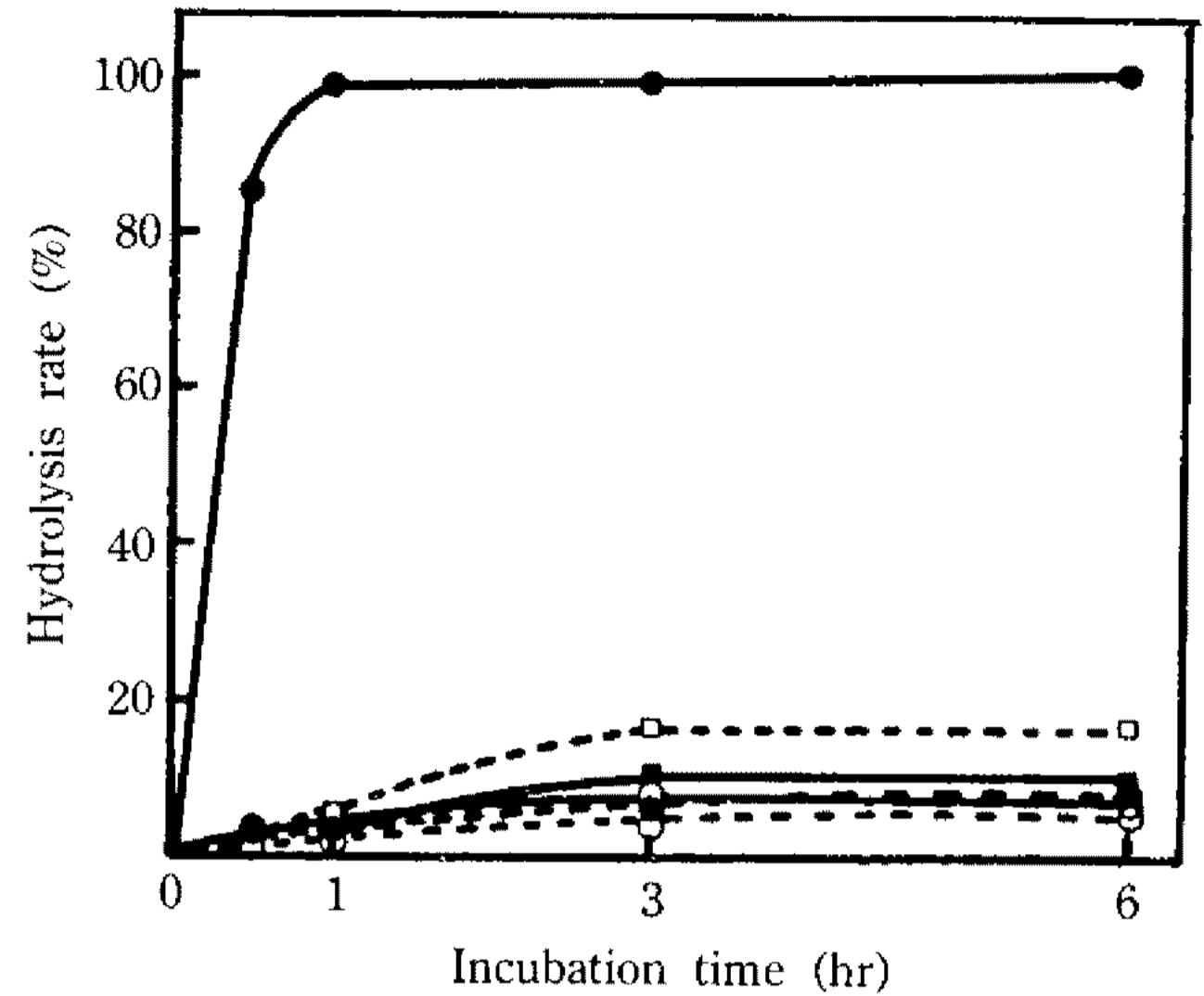


Fig. 9. Hydrolysis rate of various substrates.

●—●: pullulan, ○—○: corn starch, ●---●: potato starch, ○---○: sweet potato starch, ■—■: rice starch, □---□: amylopectin

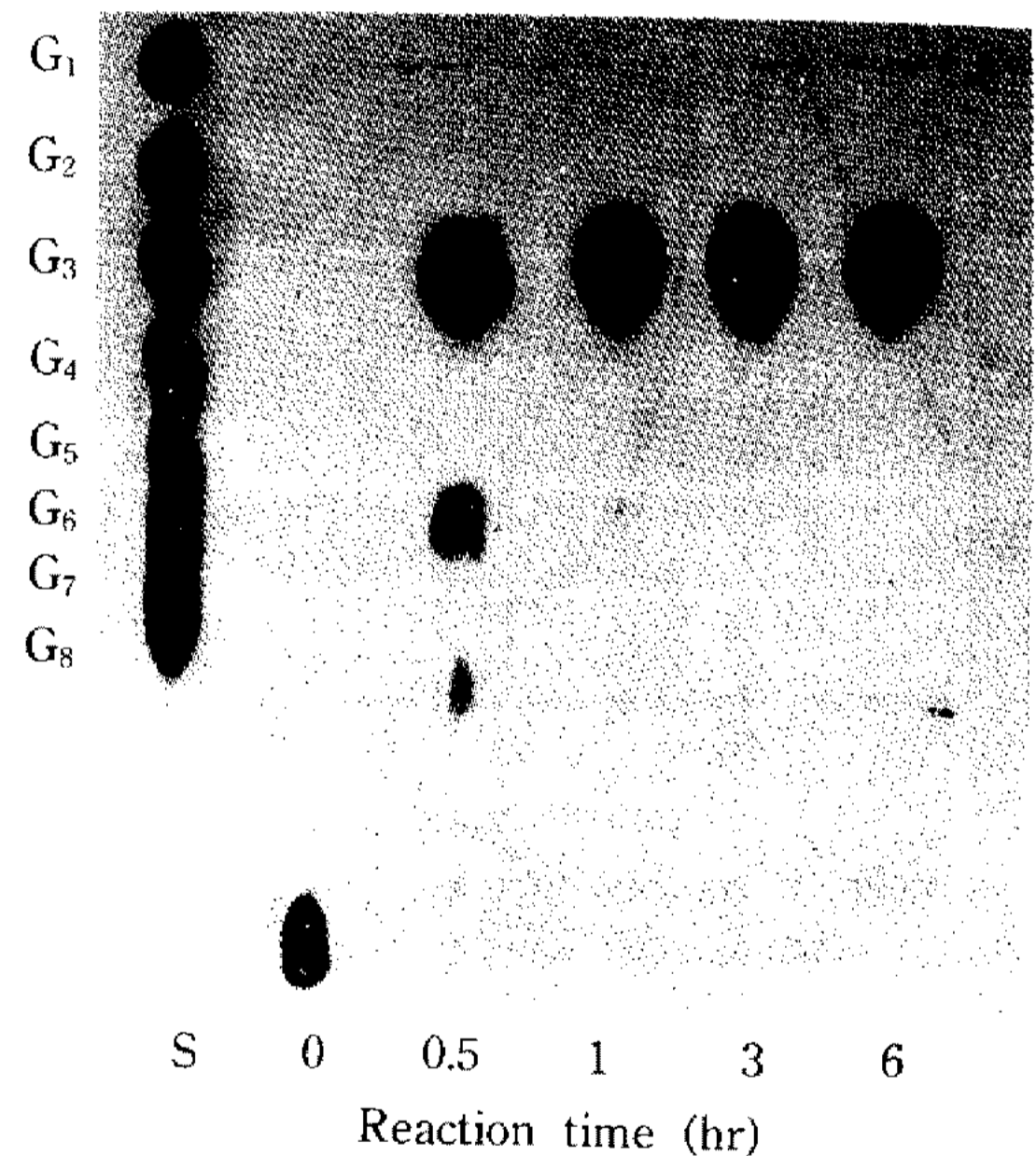


Fig. 10. Paper chromatograms of hydrolysis products on the pullulan.

G<sub>1</sub>: glucose  
G<sub>2</sub>: maltose  
G<sub>3</sub>: maltotriose  
G<sub>4</sub>: maltotetraose  
G<sub>5</sub>: maltopentaose  
G<sub>6</sub>: maltohexaose  
G<sub>7</sub>: maltoheptaose  
G<sub>8</sub>: maltooctaose  
S: standard oligosaccharide

증가시켰다.

**각종 기질에 대한 분해율**: 1% 각종 기질 1 ml에 효소액 0.2 ml(10.6 U)와 McIlvaine buffer(pH 6.5) 0.8 ml를 넣고 40°C에서 소정시간 반응시켜 분해율을 측정된 결과는 Fig. 9와 같이 본 효소에 의하여 pullulan은 반응초기부터 분해가 급격하게 일어나 1시간

반응시켰을 때 완전히 maltotriose로 분해되었으나 다른 기질의 분해는 미약하였다.

*Aerobacter aerogenes* pullulanase(1-3)의 분해율을 보면 5시간 반응시켰을 때 pullulan에 대한 분해율이 약 80%로서 본 효소의 분해율보다는 낮은 경향을 보였다.

Pullulan에 대한 분해산물 : 1% pullulan 1 ml에 효소액 0.2 ml(0.6 U)와 McIlvaine buffer(pH 6.5) 0.8 ml를 넣고 40°C 에서 소정시간 반응시켜 그 분해산물을 paper chromatography로 검출한 결과는 Fig. 10 과 같이 pullulan의  $\alpha$ -1,6-glucosidic bond를 분해하여 maltotriose를 생성하였다.

이와 같은 결과는 *Aerobacter aerogenes* pullulanase (1-3), *Bacillus cereus* var. *mycoides* pullulanase(4), potato pullulanase(17), *Bacillus sectorramus* pullulanase(8), *Bacillus* sp. pullulanase(7)와 일치하였다.

## 요 약

*Bacillus cereus*에 의한 pullulanase 생산의 최적 배양온도 및 배양시간은 각각 15°C, 72시간이고, 기 본배지에 casein, nutrient broth, egg albumin의 첨가는 효소의 생산을 크게 증가시켰다. 황산암모늄분획, CM-cellulose와 DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 효소를 정제하였고 정제효소의 specific activity는 29.09 U/mg protein, 수율은 17.1 %이었다. 정제효소는 polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 single band를 나타내었고, SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 추정된 분자량은 61,000, 등전점은 pH 7.0, 최적온도는 40°C, 최적 pH는 6.5, 35°C 이하에서 안정하였고, pH안정 범위는 6.5~11.0,  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 에 의하여 크게 저해되었고,  $Ca^{2+}$ 은 효소의 내열성을 증가시켰다. 정제효소는 공시기질중 pullulan을 잘 분해시켰으며 pullulan에 대한 분해산물은 maltotriose이었다.

## 감사의 글

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

## 참 고 문 헌

1. Ueda, S. and R. Ohba. 1972. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2381-2391.
2. Ueda, S. and R. Ohba. 1972. Purification, crystallization and some properties of extracellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Ibid.* **37**: 2821-2826.
3. Ueda, S. and R. Ohba. 1975. Some properties of crystalline extra- and intra-cellular pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Ibid.* **39**: 967-972.
4. Takasaki, Y. 1976. Purification and enzymatic properties of  $\beta$ -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 1523-1530.
5. Walker, G.J. 1968. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis* (Some properties of a pullulanase). *Biochem. J.* **108**: 33-40.
6. Dessein, A. and M. Schwarts. 1974. Is there a pullulanase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **45**: 363-366.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427.
11. 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.
12. Wrigley, C.W. 1971. Gel electrofocusing. *Method in Enzymology* **22**: 559-564.
13. Trevelyan, W.E., D.P. Procter and J.S. Harrison. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* **166**: 441-445.
14. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
15. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation for

- the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
16. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-358.
17. Ishizaki, Y., H. Taniguchi, Y. Maruyama and M. Nakamura. 1983. Debranching enzyme of potato tubers. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**: 19-29.
18. Christiane Mercier, B. May Frantz and William J. Whelan. 1972. An improved purification of cell-bound pullulanase from *Aerobacter aerogenes*. *Eur. J. Biochem.* **26**: 1-9.

(Received July 10, 1992)