

Bacillus circulans F-2가 生産하는
 α -amylase에 關한 研究
(第II報) 精製 α -amylase의 酵素的特性

鄭萬在, 谷口肇,* 丸山芳治,* 李美子
忠北大学校農科大学農化学科, *東京大学農学部農芸化学科.
(1982年 5月 4日 受理)

Studies on α -amylase of *Bacillus circulans* F-2
(Part II) Enzymatic characteristics of the purified α -amylase

Man Jae Chung, Hajime Taniguchi,* Yoshiharu Maruyama* and Mi Ja Lee

Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chung-Buk University

Dept. of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University*

(Received May 4, 1982)

Abstract

These experiments were conducted to investigate the enzymatic characteristics of the purified α -amylase (F-2A) of *Bacillus circulans* F-2 and the digestion rate of various starches.

1. The molecular weight was estimated to be 93000 by SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis. The isoelectric point was about pH 5.0. The optimum pH for the enzyme action was 6.0-6.5 and the stable pH ranged pH 5.5-12.0. The optimum temperature was 60°C, and the purified α -amylase was stable below 40°C.
2. The purified α -amylase was activated by Mn^{++} and Co^{++} , whereas it was inhibited by Ag^+ , Hg^{++} , Cu^{++} and Pb^{++} .
3. The purified α -amylase is considered to have no sulfhydryl residue essential for its catalytic activity.
4. Michaelis constant (Km) was 1.704 mg/ml. Activation energy between 25-40°C was 12.297 Kcal/mole, and between 40-60°C, it was 7.831 Kcal/mole.
5. The hydrolysis product from soluble starch, amylose and amylopectin in the early stage of hydrolysis was G_6 , and as hydrolysis proceeds, G_4 and G_2 appeared.
6. Products from each oligosaccharides are as follows:
 $G_4 \rightarrow G_2 + G_2$, $G_3 + G_1$, $G_5 \rightarrow G_4 + G_1$, $G_6 \rightarrow G_4 + G_2$, $G_7 \rightarrow G_4$, $G_8 \rightarrow G_4 + G_4$.
7. On raw potato starch, raw sago starch and raw yam starch, the purified enzyme exhibited a remarkably high digestion rate than Porcine pancreatic amylase and *Streptococcus bovis* amylase.

緒 論

하여 용이하게 酵素의 작용을 받는다. 각종 生澱粉의 amylase에 의한 分解의 차이는 生澱粉 일반적으로 穀類 生澱粉은 다른 生澱粉에 比 의 구조와 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다.

Gallant 등¹⁾, Rasper 등²⁾은 각종 酵素에 의한 生澱粉의 분해는 生澱粉의 起源에 따라 다르며, 또한 同一 生澱粉의 分解樣式은 작용하는 酵素의 종류에 따라 다르다고 하였다.

生澱粉에 대한 amylase의 作用機作에 대한 연구는 많지 않으며 아직까지 不明한 점이 많다. 上田³⁾는 *awamori var. kawachii*가 生産하는 glucoamylase의 生澱粉에 대한 吸着性 등에 관하여 보고하였고, 北原 등⁴⁾은 *Asp. cinnamomeus*의 變異株로부터 生澱粉의 分解力이 큰 glucoamylase를 分離, 精製하였다. 生澱粉의 酵素的分解에 관한 연구를 보면 杉本 등⁵⁾, 高尾 등⁶⁾, 前田 등⁷⁾, Sandstedt 등⁸⁾, Schoch 등⁹⁾, Walker 등¹⁰⁾, Mizokami 등¹¹⁾, Fuwa 등¹²⁾의 연구가 있음은 아직까지 광범위하게 연구되어 있지 않는 실정이다.

筆者는 自家 生澱粉의 分解力이 강한 α -amylase를 生産하는 *Bacillus circulans* F-2를 選拔하고 이 菌株가 생산하는 α -amylase를 starch absorption, ammonium sulfate fractionation, Bio-Gel P-100에 의한 Gel filtration 및 DE-32 column chromatography에 의하여 精製하고 精製酵素의 polyacrylamide disc gel electrophoresis의 結果를 보고하였다.¹³⁾

本報에서는 精製 α -amylase (F-2A)의 酵素的特性和 각종 生澱粉에 대한 分解生成物 및 분해율에 대하여 各別로 검토하고 그 結果를 보고하는 바이다.

實驗材料 및 方法

菌株

Bacillus circulans F-2 (東京大学農学部農芸化学科 保管菌株)

酵素單位¹³⁾

酵素單位는 1 분간에 1 μ mde의 glucose에 相當하는 還元糖을 遊離하는 酵素量을 1unit로 하였다.

SDS Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis

Weber & Osborn의 方法¹⁴⁾에 의하여 실시하였으며 이때 酵素蛋白質은 1% SDS와 5% 2-mercaptoethanol 中에서 5分間 煮沸하였다. 酵素蛋白質은 Gel當 10 μ g로 조절하였으며 Gel을 8mA의 電流로 室温에서 3시간 泳動을 실시하였다. 染色은 Coomassie brilliant blue R-250으로 1시간 染色시킨 후 7% acetic acid (methanol 10% 含有)로 脱色시켰다.

Gel Electrofocusing

pH4~6의 ampholine을 사용하여 Wrigley 方法¹⁵⁾으로 실시하였다.

染色: Electrofocusing gel을 5% TCA로 洗滌한 후 Amido black로 染色하였다.

pH測定: Electrofocusing gel을 14piece로 절단하고 각 piece를 2ml의 H₂O로 24시간 추출한 후 pH를 측정하였다.

Oligosaccharide의 檢出

Paper chromatography에 의하여 檢出하였다. 反應液의 一定量을 Toyo filter paper No. 50에 spot하고 65% n-propyl alcohol을 展開劑로 하여 70°C에서 上昇法에 의하여 2회 展開시킨 후 glucoamylase를 처리하여 40°C에서 30분간 反應시켜 alkaline silver nitrate-dip method¹⁶⁾에 의하여 發色시켰다.

生澱粉의 分解率 測定

各種 生澱粉 25mg에 buffer 2.5ml, penicillin G 1mg, toluene 25 μ l를 넣고 Porcine pancreatic amylase (PPA), *Streptococcus bovis* amylase (SBA), *Bacillus circulans* F-2 amylase (F-2A)를 各各 10u씩 첨가하고 밀봉하여 37°C에서 振盪反應시켰다. 단 이때 사용한 Buffer는 PPA에 對하여는 5mM phosphate buffer (pH7.0) containing 2mM CaCl₂, SBA에 對하여는 20mM acetate buffer (pH5.6) containing 10mM CaCl₂, F-2A에 對하여는 50mM phosphate buffer (pH

6.5)이다. 反應液을 經時的으로 0.2ml씩 취하고 遠心分離하여 沈澱部分(生澱粉)과 上澄液으로 분리하고 沈澱部分에는 1N-H₂SO₄ 5 ml를 넣어 沸騰水浴中에서 5분간 煮沸하여 가수분해시켰다. 全糖은 phenolsulfuric acid法¹⁷⁾에 의하여 定量하고 각종 生澱粉의 분해율을 구하였다.

實驗結果 및 考察

分子量

SDS polyacrylamide disc gel electrophoresis에 의하여 측정된 분자량은 Fig. 1과 같이 93,000을 나타내었다.

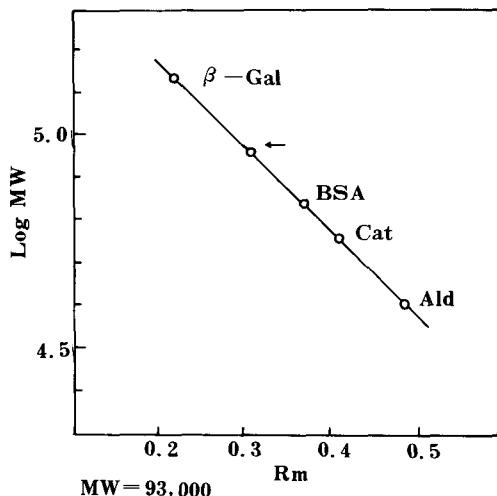


Fig. 1. Determination of MW by SDS-Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis β -Gal; β -Galactosidase. BSA; Bovine Serum Albumin. Cat; Catalase. Ald; Aldolase.

이때 표준 蛋白質로는 aldolase (M. W 40,000), catalase (M. W 57,500), bovine serum albumin (M. W 68,000), β -Galactosidase (M. W 135,000)를 사용하였다.

等電點

等電點은 Wrigley의 방법에 의하여 측정하였으며 이때 사용한 Gel mixture의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Gel Mixture

Composition	Volume (ml)
catalyst solution	0.8
acrylamide solution	3.0
ampholine solution	0.3

Fig 2와 같이 本酵素의 等電點은 pH5.0附近이었다.

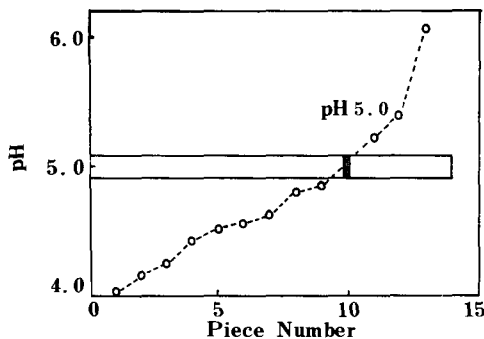


Fig. 2. Gel Electrofocusing of the F-2A

最適pH와 pH安定性

pH3.0~8.0은 McIlvaine buffer, pH8.2~11.0은 Atkins-Pantin buffer, pH11.2~12.0은 Ringer buffer를 사용하여 측정하였으며 Fig. 3. A와 같이 最適pH는 6.0~6.5이었다.

所定 pH의 緩衝液에 酵素液을 넣어 하나는 6°C에서 24시간, 다른 하나는 30°C에서 1시간 각각 放置한 후 pH를 6.5로 調節하고 活性을 測定한 結果는 Fig. 3. B와 같이 pH5.5以上에서는

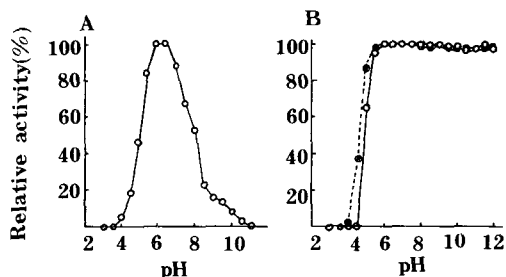


Fig. 3. A; Effect of pH on the F-2A Activity B; Effect of pH on the F-2A Stability

○—○; 1 hr preincubation at 30°C
●...●; 24 hrs preincubation at 6°C

安定하였으나 그 이하에서는 不安定하였다. 따라서 本 酵素는 耐酸性이 극히 약한 것으로 생각된다.

最適溫度와 熱安定性

基質의 pH를 50mM acetate buffer를 사용하여 6.2로 調節하고 所定 溫度에서 活性을 측정한 결과는 Fig. 4. A와 같이 最適溫度는 60°C이며 65°C 이상에서는 급격하게 不活性化되었다.

酵素의 熱安定性을 보기 위하여 酵素液을 所定溫度에서 30분간 維持하고 殘存活性을 측정한 결과는 Fig. 4. B와 같이 45°C에서는 69.2%, 50°C에서는 22.7%이었고 55°C 이상에서는 완전히 失活되었다.

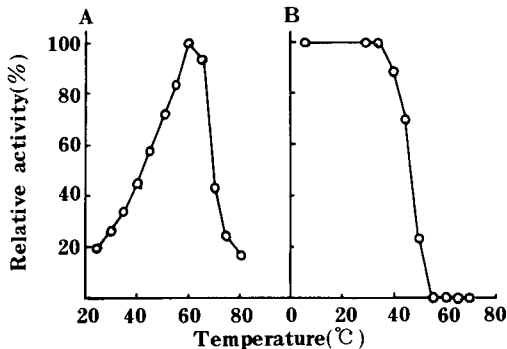


Fig. 4. A; Effect of Temperature on the F-2A Activity
B; Effect of Temperature on the F-2A Stability

Activation energy

Fig. 4. A의 data로부터 Arrhenius plot(Fig. 5)에 의하여 구한 activation energy는 25~40°C에서 12.297kcal/mole, 40~60°C에서 7.831kcal/mole이었다.

이와같이 本 酵素는 2개의 activation energy를 나타내었는데 이와같은 현상은 *B. subtilis var amyloliquefaciens amylase*¹⁸, *Ps. saccharophila amylase*¹⁹, Barley malt amylase²⁰ 및 wheat β -amylase²⁰에서도 볼 수 있다. 그러나 human salivary α -amylase와 porcine pancreatic

α -amylase는 single activation energy를 나타내고 있다.⁽²¹⁾

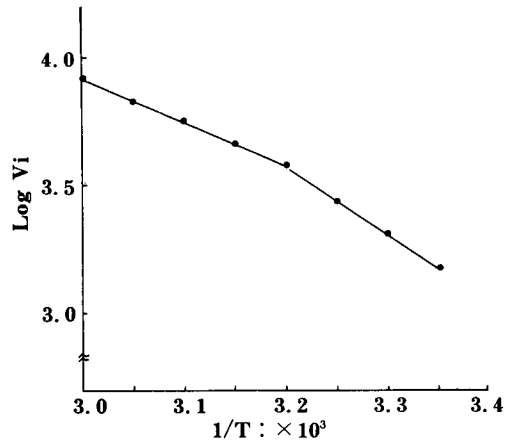


Fig. 5. Arrhenius Plot

Initial velocity (v_i) of the reaction was expressed as μg of glucose/ml/min. T is the absolute temperature

金屬이온 및 -SH基試藥의 影響

酵素液을 각종 金屬이온의 溶液(final antin-tration을 1mM로 調節)에 넣어 30°C에서 30분간 維持한 후 殘存活性을 측정한 결과는 Table 2와 같이 Hg^{++} 은 本 酵素의 활성을 완전히 阻害시켰으며 Ag^+ , Cu^{++} , Pb^{++} 은 活性을 크게 阻害시켰고 Co^{++} 과 Mn^{++} 은 賦活劑로서 작용하였다.

한편 SH基試藥의 影響을 보기 위하여 酵素液에 Iodoacetamide의 終濃度를 0.5mM, 5mM, P-chloromercuribenzoate의 終濃度를 0.05mM로 維持하고 30°C에서 30분간 放置한 후 殘存活性을 측정한 결과는 Table 2와 같이 각각 99.6%, 93.2%, 및 100.0%이었다. 따라서 本 酵素는 활성의 發現에 SH基는 필수적이 아닌 것으로 생각된다.

Ca⁺⁺의 影響

Ca⁺⁺의 影響을 상세하게 알기 위하여 하나는 50mM acetate buffer (pH6.2)로, 다른 하나는 50mM acetate buffer (pH6.2) contg. 20mM ED

Table 2. Effect of Metal Ions and Inhibitors on F-2A

Material	Final concentration (mM)	Relative activity (%)
None	0	100
LiCl	1	99.1
AgNO ₃	1	23.6
MgCl ₂	1	98.4
CaCl ₂	1	97.6
MnCl ₂	1	120.7
FeCl ₂	1	87.2
CoCl ₂	1	124.7
NiCl ₂	1	99.8
CuCl ₂	1	39.1
ZnCl ₂	1	97.4
CdCl ₂	1	92.4
SnCl ₂	1	98.3
BaCl ₂	1	97.6
HgCl ₂	1	0
PbCl ₂	1	52.2
Iodoacetamide	0.5	99.6
	5	93.2
p-CMB*	0.05	100.0

*Sodium p-chloromercuribenzoate.

TA로 酵素液을 24시간 透析시킨 후 2% soluble starch soln.에 Buffer로서 各各 50mM acetate-buffer (pH 6.2), 50mM acetate buffer (pH 6.2) contg. 20mM Ca(CH₃COO)₂를 가하여 Ca(CH₃COO)₂의 終濃度를 10mM로 조절하고 透析酵素液의 活性을 측정한 결과는 Table 3와 같다.

50mM acetate butfer (pH 6.2)로 透析한 酵素液은 Ca⁺⁺의 存在與否에 관계없이 동일한 활성을 나타내었다. 20mM의 EDTA를 함유한 50mM acetate buffer (pH 6.2)로 透析한 酵素液은 原活性의 50% 정도의 활성을 나타내었으나 Ca⁺⁺을 첨가함으로써 활성이 회복되었다. 따라서 本酵素가 活性을 나타내는 데는 Ca⁺⁺이 필요하며 本酵素와 결합하여 있음을 가리킨다.

HgCl₂濃度の 影響

酵素液을 所定濃度の HgCl₂溶液에 넣어 30℃에서 30分間 維持한 후 殘存活性을 측정한 결과는 Table 4와 같이 HgCl₂의 濃도가 10⁻⁴M까지는 영향이 없으나 그 以上の 濃도에서는 급격하게 不活性化되어 10⁻⁴M에서는 거의 활성을 나타내지 않았다.

Michaelis constaot

Soluble starch soln.의 濃도를 mℓ當 1.0~10.0 mg로 變化시켜 初期分解速度를 측정하고 soluble

Table 3. Effect of Dialysis against EDTA and addition of Ca⁺⁺

Buffer during dialysis	Buffer in reaction mixture	Relative activity (%)
50 mM acetate buffer (pH 6.2)	50 mM acetate buffer (pH 6.2)	100.0
	50 mM acetate buffer (pH 6.2) contg. 10 mM Ca (CH ₃ COO) ₂	100.0
50 mM acetate buffer (pH 6.2) contg. 20 mM EDTA	50 mM acetate buffer (pH 6.2)	49.4
	50 mM acetate buffer (pH 6.2) contg. 10 mM Ca(CH ₃ COO) ₂	100.0

Table 4. Effect of HgCl₂ concentration

Final concentration	Relative activity
0 M	100.0(%)
10 ⁻⁶	100.0
10 ⁻⁵	21.0
10 ⁻⁴	0.2
10 ⁻³	0.2

starch농도와와의 관계를 Lineweaver-Burk의 방법에 따라 圖示한 결과는 Fig. 6와 같으며 그래프로부터 구한 酵素의 soluble starch에 對한 km은 1.704 mg / ml이고, Vmax는 111.111μg/min이었다.

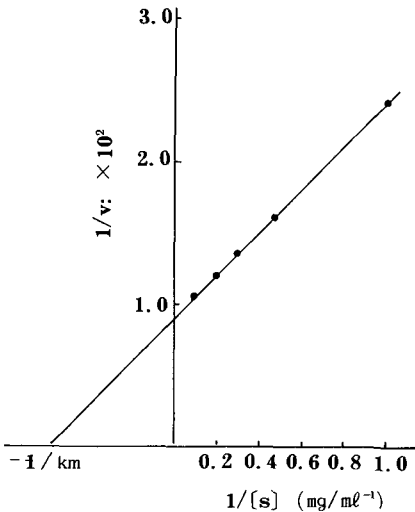


Fig. 6. Effect of Concentration of Soluble Starch(Lineweaver Burk's plot)

Velocity (v) was expressed as increased glucose amount (μg) per min. of the reaction mixture, and substrate concentration (s) as mg per ml of the reaction mixture.

Oligosaccharide와 Polysaccharide의 相對的 初速度

基質로써 soluble starch, amylose, amylopectin, oyster glycogen, pullulan, dextran 및 各種 Oligosaccharide에 對하여 조사하였다.

1% 各種 基質 1.0ml에 50mM Phosphate buffer (pH 6.5) 1.0ml, Enzyme soln. 0.1ml, Tol-

uene 20μl를 가하고 30℃에서 30분간 반응시켜 생성된 還元糖을 Somogyi-Nelson法으로 定量하였다. Soluble starch의 relative initial velocity를 100으로 하였을 때의 各種 基質에 대한 relative initial velocity는 Table 5와 같이 本酵素는 G₂, G₃, Pullulan, Dextran에는 작용하지 못하였으며 G₄와 G₇에 대하여는 微弱하였다. 그러나 G₅, Amylose, Amylopectin은 각각 91.9, 90.3, 90.3으로써 높은 相對的初速度를 나타내었다.

Table 5. Relative Initial Velocity of F-2A on Oligosaccharides and Polysaccharides

Substrates	Relative initial velocity (%)
Soluble starch	100
G ₂	0
G ₃	0
G ₄	18.7
G ₅	91.9
G ₆	56.1
G ₇	27.0
G ₈	46.9
Amylose	90.3
Amylopectin	90.3
Oyster glycogen	72.2
Pullulan	0
Dextran	0

各種 基質에 대한 反應生成物

1% 各種 基質 1 ml에 50mM phosphate buffer (pH 6.5) 0.9ml와 酵素液 0.1ml를 넣고 30℃에서 一定時間 반응시켜 生成物을 paper chromatography에 의하여 檢出하였다. 그 결과는 Table 6와 같이 Soluble starch, Amylose, Amylopectin으로부터 生成되는 初期 分解產物은 G₆이며 분해가 진행됨에 따라 G₄와 G₂가 생성되었다. Soluble starch 및 各種 oligosaccharide로부터의 生成物은 Fig. 7, 8과 같다.

α, β-cyclodextrin, Dextran, Pullulan, G₂, G₃는 分解시키지 못하였으며, G₇을 基質로 하였을 때 分解產物로써 G₄만 나타나고 G₃가 나

Table 6. Reaction Products on the Various Substrates

Substrates	Reaction products
G ₂	————
G ₃	————
G ₄	G ₂ +G ₂ , G ₃ +G ₁
G ₅	G ₄ +G ₁
G ₆	G ₄ +G ₂
G ₇	G ₄
G ₈	G ₄ +G ₄
Soluble starch	G ₆ →G ₄ +G ₂
Amylose (DP=19)	G ₆ →G ₄ +G ₂
Amylopectin	G ₆ →G ₄ +G ₂
α-cyclodextrin	————
β-cyclodextrin	————
γ-cyclodextrin	G ₄ +G ₄
Dextran	————
Pullulan	————

타나지 않았는데 이에 대하여는 앞으로 더 추구해야 할 것으로 생각된다.

maltohexaose 生成 酵素로써는 *Aerobacter aerogenes*⁽²²⁾의 maltohexaose 生成 amylase에 이어 本酵素는 두번째의 maltohexaose 生成 amylase이며 이 두가지 효소는 다 같이 pullulan, α, β-cyclodextrin에 대하여 작용하지 못하는 것은 같지만 그 밖의 여러가지 면에서 많은 差異點을 나타내고 있다.

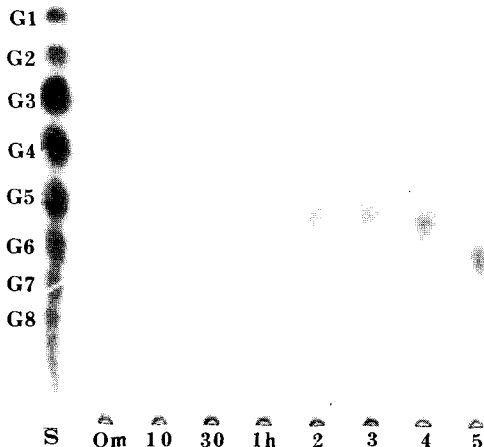
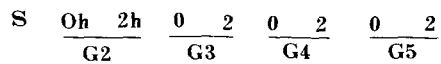
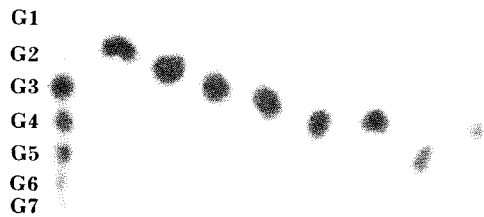


Fig. 7. Paper Chromatogram of the Reaction Products on the Soluble Starch



G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8

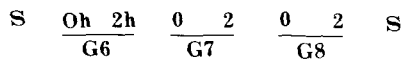


Fig. 8. Paper Chromatogram of the Reaction Products on the Oligosaccharides (G₂, G₃, G₄, G₅, G₆, G₇, G₈)

各種 生澱粉의 分解

穀類 生澱粉의 分解력이 강한 酵素로 알려진 PPA, SBA와 筆者가 選拔한 *Bacillus circulans* F-2가 生産하는 효소인 F-2A를 각종 生澱粉에 작용시켜 分解率을 측정된 결과는 Fig. 9에서 보는 바와 같이 Corn starch, Rice starch, Barley starch에 24시간 반응시켰을때 3種의 酵素間에 약간의 차이는 있으나 다같이 비교적 높은 分解率을 나타내었다.

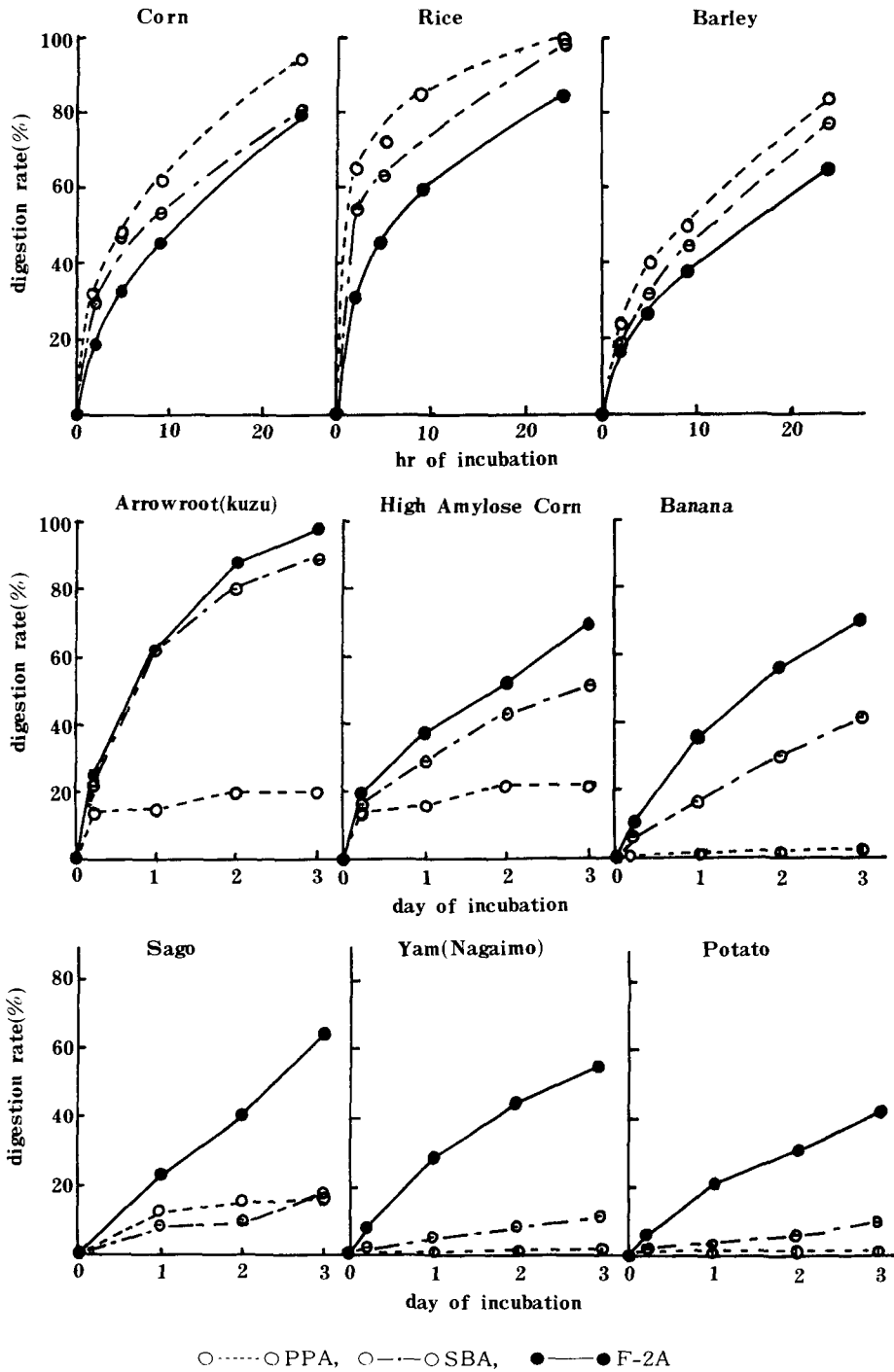


Fig. 9. Digestion rate(%) of various raw starches(Corn, Rice, Barley, Arrowroot, High amylose corn, Banana, Sago, Yam and Potato) by PPA, SBA and F-2A. (Added enzyme amount; 10U)

要 約

corn starch, rice starch, barley starch에 대하여는 PPA가 分解率이 가장 컸으나 Arrow-root starch, high amylose corn starch, banana starch, sago starch, yam starch, potato starch에 대하여는 澱粉의 種類에 따라 分解率에 차이는 있으나 F-2A가 가장 높은 分解率을 나타내었다. 특히 sago starch, yam starch 및 potato starch에 대하여는 F-2A는 PPA와 SBA에 비하여 높은 分解率을 나타내었다.

현재까지 가장 分解되기 어려운 澱粉으로 알려진 Raw potato starch의 分解率은 72시간 반응시켰을 때 F-2A가 41.6%, PPA가 2.1%, SBA가 10.1%로써 F-2A가 월등하게 높은 分解率을 나타내었다.

또한 酵素의 量을 60u 씩 반응시켰을 때 Fig. 10과 같이 F-2A는 65.3%, PPA는 7.1%, SBA는 17.3%의 分解率을 나타내었다.

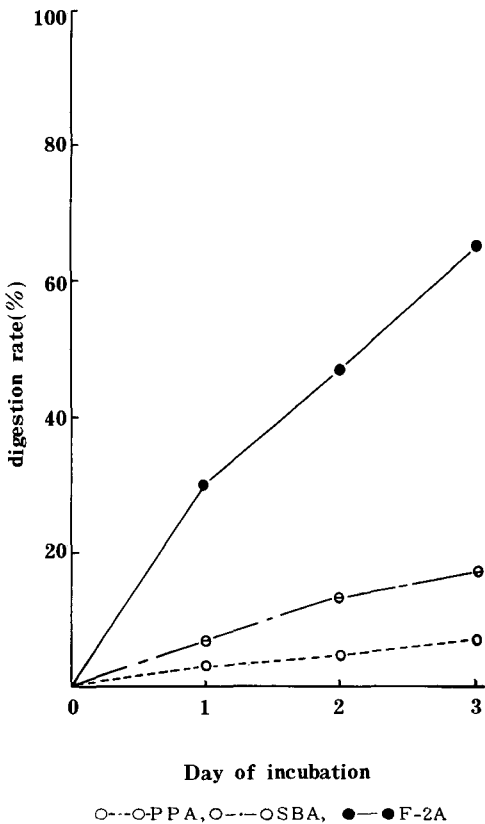


Fig. 10. Digestion rate(%) of Raw potato starches by PPA, SBA and F-2A (Added enzyme amount: 60 U)

Bacillus circulans F-2의 精製 α -amylase(F-2A)의 酵素의 特性和 각종 生澱粉의 分解率을 검토하고 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 分子量은 93,000, 等電點은 pH5.0附近, 最適pH는 6.0~6.5, 安定 pH범위는 5.5~12.0, 最適溫度는 60°C, 40°C 以下에서 安定하였다.

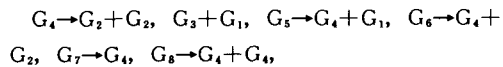
2. Mn^{++} , Co^{++} 은 賦活劑로써 작용하였으나 Ag^+ , Hg^{++} , Cu^{++} , Pb^{++} 은 阻害劑로써 작용하였다.

3. 本酵素의 活性에 SH基는 必須的이 아닌 것으로 생각된다.

4. Michaelis constant(km)는 1.704mg/ml이고 活性化에너지는 25~40°C에서 12.297kcal/mole, 40~60°C에서 7.831kcal/mole이었다.

5. Soluble starch, Amylose, Amylopectin으로부터 생성되는 初期分解產物은 G_6 이며 分解가 진행됨에 따라 G_4 와 G_2 가 생성되었다.

6. 각종 Oligosaccharide로부터 생성되는 分解產物은 다음과 같다.



7. 감자 生澱粉, Sago 生澱粉, Yam 生澱粉에 대하여 本酵素는 Porcine pancreatic amylase와 *Streptococcus bovis* amylase보다 월등하게 높은 分解率을 나타내었다.

參 考 文 獻

- Gallant, D., A. Derrien, A. Aumaitre and A. Guilbot: *Stärke*, **25**, 56 (1973)
- Rasper, V., G. Perry and C. L. Duitschaever: *Inst. Can. Sci. Technol. J.*, **7**, 166 (1974)
- 上田誠之助: *日農化*, **31**, 898 (1957)
- 北原賞雄, 久留島通俊, 佐藤淳司: *日農化*, **48**, 379 (1974)
- 杉本温美, 大西恵子, 高谷友久, 不波英次: *日本澱粉科學*, **26**, 182 (1979)
- 高尾文子, 杉本温美, 不波英次: *日本澱粉科學*, **25**, 12 (1978)
- 前田巖, 自見信子, 谷口肇, 中村道徳: *日本澱粉科學*, **26**, 117 (1979)

- 8) Sandstedt, R. M.: *J. Biol. Chem.*, **156**, 203 (1973) (1937)
- 9) Schoch, T. J. and H. W. Beach: *Cereal Chem.*, **38**, 34 (1961)
- 10) Walker, G. J. and P. M. Hope: *J. Biochem.*, **86**, 452 (1963)
- 11) Mizokami, K., M. Ozak: and K. Kitahara: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **51**, 299 (1977)
- 12) Fuwa, H. Y. Sugimoto and T. Takaya: *J. Japan Soc. Starch Sci.*, **26**, 105 (1979)
- 13) Chung, M. J., H. Taniguchi and Y. Maruyama: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **9**, 185 (1981)
- 14) Weber, K and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
- 15) Wrigley, C. W. : *Method in Enzymology*, **22**, 559 (1971)
- 16) Terevelyan, W. E., O. D. Procter and J. S. Harrison: *Nature*, **166**, 444 (1950)
- 17) Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- 18) Menzi, R., E. A. Stein and E. H. Fischer: *Helv. Chim. Acta*, **40**, 534 (1957)
- 19) Markowitz, A., H. P. Klein and E. H. Fischer: *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 267 (1956)
- 20) Meyer, K. H., P. F. Spahr and E. H. Fischer: *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1924 (1953)
- 21) Robyt, J. F., and W. J. Whelan: In "Starch and its Derivatives" (J. A. Radley, ed), 4ed, Chap, 14. Chapman & Hall, London (1968)
- 22) Kainuma, K., K. Wako, S. Kobayashi, A. Nagami and S. Suzuki: *Biochim. Biophys. Acta*, **410**, 333 (1975)