プルランを分解する酵素

坂野好幸*・小林恒夫*

Pullulan-hydrolyzing Enzymes

Yoshiyuki SAKANO and Tsuneo KOBAYASHI

Laboratory of Biochemistry, Department of Agricultural
Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo Noko University
(3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183, Japan)

Many pullulan-hydrolyzing enzymes have been purified from several microorganisms and higher plants since 1961 when Bender and Wallenfels found pullulanase (EC 3.2.1.41 pullulan 6-glucanohydrolase) in culture filtrate of *Aerobacter aerogenes*. They are classified into four groups according to their substrate specificities, that is, the types of glucoamylase (EC 3.2.1.3 1,4- α -glucan glucanohydrolase), pullulanase, isopullulanase (EC 3.2.1.54 pullulan 4-glucanohydrolase) and the *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase that produces panose from pullulan. Three kinds of enzymes described above, except glucoamylase, are considered to be the specific enzymes acting on α -1,6-glucosidic linkages or α -1,4-glucosidic linkages adjacent to α -1,6-glucosidic linkages of starch, glycogen and oligosaccharides.

In this paper, the progress of researches concerning pullulanase, isopullulanase and the *Thermoactinomyces* α -amylase is summarily described and, in particular, rough estimation of subsites of two pullulanases and isopullulanase was performed on the basis of data that have hitherto been reported. It is suggested that *Streptococcus mitis* pullulanase, *A. aerogenes* pullulanase and *Aspergillus niger* isopullulanase have at least seven, six and four subsites, respectively.

プルランは、黒酵母といわれている不完全菌 *Aureobasidium pullulans*^{1,2)} (旧名称 *Pullularia pullulans*) をショ糖、マルトースあるいは澱粉部分分解物を炭素源として培養すると、菌体外に生産される粘性多糖である³⁻⁵⁾。この多糖は、マルトトリオースが α -1,6-グルコシド結合で多数重合した規則的な構造をしている (Fig. 1 参照)。

この多糖プルランの酵素による分解は、少なくとも Fig. 1 に示すごとく 4 通りの型式に分類される⁶⁾。1) 代表的な澱粉糖化酵素グルコアミラーゼ (EC 3.2.1.3 1,4- α -D-glucan glucanohydrolase) によりプルランの非還元末端からグルコース単位に切断する型式^{4,7,8)}、2) *Aerobacter aerogenes* のプルラナーゼ⁹⁾ (EC 3.2.1.41 pullulan 6-glucanohydrolase) などにより、プルラン中

の α -1,6-グルコシド結合を特異的に切断し、マルトトリオースを生成する型式、3) *Aspergillus niger* のイソプルラナーゼ^{10,11)} (EC 3.2.1.57 pullulan 4-glucanohydrolase) により、プルラン中の α -1,6-結合糖に隣接する還元末端側の α -1,4-グルコシド結合に特異的に作用し、イソパノースを生成する型式、4) 最近、*Thermoactinomyces vulgaris* から得られた α -アミラーゼ¹²⁾ により、プルラン中の α -1,6-結合糖に隣接する非還元末端側の α -1,4-結合に作用し、パノースを生成する型式がある。

上記酵素のうちグルコアミラーゼ型の酵素を除く 3 種類は、多糖あるいはオリゴ糖の α -1,6-結合およびその近傍に特異的に作用する酵素と考えられる。これら 3 種の酵素に関する多数の研究について概説し、作用機作などについて考察してみたい。

プルラナーゼとイソプルラナーゼに関する詳細な研究

* 東京農工大学農学部 (183 東京都府中市幸町3-5-8)

Fig.1. Patterns of enzymatic hydrolysis of pullulan.

○, glucose; ⊙, reducing end; —, α -1,4-glucosidic linkage; ↓, α -1,6-glucosidic linkage.

経過,ならびに解説等はすでに発表されている総説^{6,13,14)}などを参照されたい。

1. プルラーゼ

1961年に Bender と Wallenfels⁹⁾ が *A. aerogenes* の培養液中にプルラーゼを発見したことがプルラン分解酵素に関する研究の発端である。その後、多数の研究者により他の微生物や高等植物で検索され、今までに、*Escherichia intermedia*¹⁵⁾, *Streptococcus mitis*¹⁶⁾, *Streptomyces flavochromogenes*¹⁷⁾, スイートコーン^{18,19)} などからプルラーゼが見出されている。微生物酵素は、高等植物酵素よりプルラーゼ力価が高く、調製・精製に有利で、とくに、*A. aerogenes* のプルラーゼは結晶標品で市販されている。

A. aerogenes のプルラーゼは培養条件により、細胞に付着して生産される菌体内 (intracellular) あるいは cell-bound) 酵素と培養液中に分泌される菌体外 (extracellular) 酵素の2種類が報告されている^{20,21)}。菌体内プルラーゼは界面活性剤で菌体から抽出されたのち、硫酸塩析や DEAE-セルロース、DEAE-セファデックス A-50、セファデックス G-200 のクロマトグラフィーの

操作を経て、結晶化されている²²⁻²⁵⁾。Ueda と Ohba²⁵⁾ は比活性^{注1)} 7,000 (U/mg) の菌体内酵素の結晶標品を17%収率で得た。Wallenfels^{22,24)} と Whelan²³⁾ の研究グループでは、比活性^{注2)} 30~90 (U/mg) の結晶酵素を20~50%収率で得た。菌体内精製標品はポリアクリルアミドゲル電気泳動法、あるいは SDS (ラウリル硫酸ナトリウム) の存在下で行うポリアクリルアミドゲル電気泳動法で単一バンドを示すもの²²⁻²⁴⁾ と、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で2本の活性バンドを示すもの²⁵⁾ とが報告されている。

Ohba と Ueda²⁶⁾ は *A. aerogenes* の培養液から硫酸塩析、DEAE-セルロース、セファデックスのクロマトグラフィーの操作を経て、はじめて、菌体外プルラーゼの結晶化に成功した。彼らが得た標品の比活性^{注2)} は菌体内標品のものとはほぼ同じで、7,200 (U/mg) であった。この標品の均一性はポリアクリルアミドゲル電気泳動法と超遠心分析法で確認された。

Table 1 に *A. aerogenes* の菌体内・外のプルラーゼの一般酵素化学的性質^{9,22-28)} をまとめてある。両プルラーゼの分子量の値は測定条件、酵素の調製・精製条件等の違いで大部異なって測定されている。これは、プルラーゼが微生物細胞あるいは培養物から単離・精製される過程で、プルラーゼ分子に作用すると考えられる酵素、たとえば、プロテアーゼのような酵素の活性をできるだけ早く阻害もしくは除去する工夫がなされる必要があることを示唆している。両プルラーゼの温度安定性が少し異なる点を除いて、他の諸性質は両者ではほぼ同じである。*N*-bromosuccinimide による阻害実験^{28,29)} と差スペクトルによる酵素と基質の相互作用²⁹⁾ の実験により、あるトリプトファン残基がプルラーゼの作用に重要な役割をはたしていることが明らかにされた。

A. aerogenes のプルラーゼはアミロペクチンやグリコーゲンの α -1,6-グルコシド結合にも作用することがわかった⁹⁾ ので、多糖類、オリゴ糖の構造解析に、あるいは澱粉糖化工業などに使用されている。オリゴ糖に対する *A. aerogenes* のプルラーゼの作用は、Abdullah ら³⁰⁾ ならびに Abdullah と French³¹⁾ の研究などにより明らかにされた。この酵素はイソマルトース、パノース、イソパノースなどの α -1,6-結合を切断できないが、62- α -マルトシルマルトースより大きい基質、すなわち、他の鎖 (B鎖) に還元末端で α -1,6-結合している A鎖と A鎖から α -1,6-結合で結合されている B鎖、いずれもマルトース以上のマルトオリゴ糖鎖から構成されているオリゴ糖を切断することができる。

注 1) モチゴメ澱粉に酵素を作用させ、ヨウ素-澱粉反応の青色の増加を測定する小林の方法で、酵素活性が測定されている。

注 2) 1%プルランに酵素を作用させ、生成する還元糖を Nelson-Somogyi 法で測定する方法で、酵素活性が測定されている。

Table 1. Properties of pullulanase from *Aerobacter aerogenes*.

	Intracellular	Extracellular
Molecular weight	108,000-145,000 ²³⁾ , a 110,000-120,000 ²⁴⁾ , b 143,000 ²⁴⁾ , c (8±1) × 10,000 ²⁶⁾ , d (9±1) × 10,000 ²⁶⁾ , a	58,000 ²⁵⁾ , a 66,000 ²⁵⁾ , c (7-8) × 10,000 ²⁵⁾ , d 50,000, 150,000 ²⁷⁾ , d
Optimum pH	6.0 ²⁶⁾	5.0 ⁹⁾ , 6.5 ²⁵⁾
Optimum temperature	50°C ²⁶⁾	47.5°C ⁹⁾ , 50°C ²⁵⁾
pH Stability	5.5-12.0 ²⁶⁾	5.0-11.5 ²⁵⁾
Thermal stability	40°C ²⁶⁾	50°C ²⁵⁾
pI	3.88, 4.46, 7.6 ²⁸⁾	3.72, 4.35, 7.7 ²⁸⁾

a, b, c, and d represent the methods of determination of molecular weight of enzyme. a, ultracentrifugation; b, amino acid analysis; c, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; d, gel-filtration.

Table 2. Relative rates of hydrolyses of oligosaccharides and pullulan by various pullulanases^{16, 32)}.

Substrate	Relative rates of hydrolyses by pullulanases		
	<i>S. mitis</i>	<i>A. aerogenes</i>	Oats
6 ² -α-Maltosylmaltose	3	26	—
6 ³ -α-Maltosylmaltotriose	6	61	55
6 ³ -α-Maltosylmaltotetraose	18	188	135
6 ² -α-Maltotriosylmaltose	44	—	—
6 ² -α-Maltotetraosylmaltose	79	—	—
6 ² -α-Maltopentaosylmaltose	73	—	—
6 ² -α-Maltohexaosylmaltose	71	—	—
6 ² -α-Maltoheptaosylmaltose	61	—	—
Pullulan	78	—	—
6 ³ -α-Maltotriosylmaltotriose	100	100	100
6 ³ -α-Maltotetraosylmaltotriose	162	63	—
6 ³ -α-Maltotriosylmaltotetraose	220	123	173

Table 2 に, Walker¹⁶⁾ がまとめた細菌プルラーゼのオリゴ糖加水分解相対初速度表に, Manners³²⁾ が測定した高等植物のプルラーゼのオリゴ糖加水分解相対初速度を書き加えて示す. これらプルラーゼのオリゴ糖に対する分解速度は重合度とともに大きくなっている. この事実をもとにプルラーゼのオリゴ糖に対する作用様式について後で討論する.

2. イソプルラーゼ

イソプルラーゼは1971年に演者¹⁰⁾らと辻阪ら¹¹⁾の研究室でほとんど同時に, 糸状菌 *A. niger* から初めて発

見された. 最近, 演者らと沢井らの研究室との協同研究³³⁾で, 先に, G₂-デキストラナーゼ生産菌として土壌中より単離された細菌 *Arthrobacter globiformis* T6 が G₂-デキストラナーゼの他にイソプルラーゼを生産することを認めた.

A. niger ATCC-9642 のイソプルラーゼ³⁴⁾は, その穀類を水で抽出したのち, アセトン沈澱と Phospho-セルロース, DEAE-セルロース, セファデックス G-150 のクロマトグラフィーの操作で精製された. 精製イソプルラーゼ標品にはマルターゼ, α-アミラーゼ, グルコアミラーゼ, トランスフェラーゼ作用は認められず,

Table 3. Action of isopullulanase of *Aspergillus niger* on panose, 6³- α -glucosylmaltotriose and isopanose.

Substrate	Relative rates of hydrolysis(%)	Product
Pullulan	100	isopanose
Panose	71	isomaltose and glucose
6 ² - α -Maltosyl-maltose	25	isopanose and glucose
6 ³ - α -Glucosyl-maltotriose	110	isomaltose and maltose
6 ² - α -Maltosyl-maltotriose	0	none
Isopanose	0	none
Isomaltotriose	0	none
Isomaltose	0	none
Maltotriose	0	none
Maltose	0	none

 Fig.2. Enzymatic analysis of unknown oligosaccharides³⁶⁾.

I, isopullulanase; P, pullulanase; G, glucoamylase; No. 3, 6³- α -(6²- α -glucosylmaltosyl)-maltotriose; No. 4-1, 6³- α -(6⁵- α -diglucosylmaltopentaose; No. 4-2, 6³- α -(6³- α -glucosylmaltotriosyl)-maltotriose.

For other keys see Fig.1.

イソプルランナーゼの比活性(48U/mg)は麩水抽出液の430倍以上に上昇した。

A. niger のイソプルランナーゼ³⁴⁾ の至適 pH は 3.0～3.5, 至適温度は 40℃ 付近と求められた。酵素は酸性領域で安定性が高く, pH 3.7～4.5 で30分間の熱処理でも 50℃ まで安定であった。ゲル濾過法でイソプルランナーゼ

の分子量は 74,000, 焦点電気泳動法でその等電点は 4.65¹¹⁾あるいは 4.70³⁵⁾付近と測定された。

A. niger のイソプルランナーゼのオリゴ糖に対する作用³⁴⁾を Table 3 に示す。この酵素は、枝分れしていないイソマルトシル基の還元末端側の α -1,4-結合を切断できるが、6²- α -マルトシルマルトトリオースのような枝分れ構造になると、もはや同じ α -1,4-結合を切断できなくなる。このように高い基質特異性を示すので、イソプルランナーゼは新しいオリゴ糖構造解析用酵素として注目された。Umeki と Yamamoto³⁶⁾は、モチゴメ澱粉の β -限界デキストリンを細菌糖化型 α -アミラーゼでさらに分解して得たデキストリン No.3(重合度 6), No.4-1(重合度 7), No.4-2(重合度 7)の構造決定に、イソプルランナーゼを効果的に用いた(Fig.2)。

グリコーゲンの β -限界デキストリン、あるいはモチトウモロコシ澱粉の細菌液化型 α -アミラーゼ限界デキストリン(平均重合度20)に対するグルコアミラーゼ作用は、イソプルランナーゼ添加で促進された³⁴⁾。これは次のように考えられる。グルコアミラーゼが非還元末端から順次、グルコース単位に α -1,4-結合を切断し、パノース構造が非還元末端に現われると、グルコアミラーゼの作用より早くイソプルランナーゼがそのパノース構造に作用し、イソマルトースを切り離すので、グルコアミラーゼは枝の中側へさらに働くようになると。このことは、イソプルランナーゼが澱粉糖化工業や発酵工業などで利用される可能性を示唆している。

3. *T. vulgaris* の α -アミラーゼ

田村¹²⁾は、土壌中より分離した一放線菌 *T. vulgaris* R-47 の生産する新しい α -アミラーゼがプルランを加水分解してパノースを生成することを報告した。この新しい α -アミラーゼは R-47 株の培養液から、硫酸塩析、DEAE-セルロース、CM-セルロースなどのクロマトグラフィーの操作で精製された。精製標品はポリアクリルアミド、ならびに SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で単一バンドを示した。この標品はアミラーゼ活性の他にプルランを分解しパノースを生成する活性を持つので、この酵素は、4 番目のプルラン分解型式 (Fig.1 参照)に属する最初の酵素となった。

この酵素の至適 pH と至適温度は、澱粉およびプルランを基質にして測定されたいずれの場合も、5.0 付近と 70℃ 付近、さらに、焦点電気泳動法で測定された等電点は 5.20 と求られている¹²⁾。

この α -アミラーゼに関する研究は、まだ、その端緒

についたばかりで、今後ますます盛んに行われ、貴重なデータの集積が期待される。

4. プルラナーゼとイソプルラナーゼの作用様式

細菌と、高等植物のプルラナーゼの各種オリゴ糖加水分解初速度^{16,30,32)}を比較し、Table 2にまとめてみた。いずれの酵素も重合度が大きくなると反応速度も大きくなっている。一方、アミラーゼがマルトオリゴ糖を加水分解するとき、その反応初速度が基質の重合度とともに増加するという実験事実から出発し、今では、アミラーゼのマルトオリゴ糖に対する作用様式は各酵素に特異なサブサイト構造と関連づけ説明されている^{37,38)}。そこで、まだ十分なデータの蓄積がなされていないが、*S.mitis* と *A.aerogenes* のプルラナーゼのサブサイトの評価を試みた。Table 2 のデータを書き換えて、基質の分解相対速度を酵素と基質の productive な結合様式と関連づけて、*S.mitis* のプルラナーゼの場合 (Fig.3) と、*A.aerogenes* のプルラナーゼの場合 (Fig.4) と別々に図示した。

枝分れがなく α -1,6-結合を1個持つオリゴ糖と、*S.mitis* のプルラナーゼの productive な結合様式は、各オリゴ糖にただひとつの結合様式しかない (Fig.3-b)。

Fig.3. Productive binding modes of branched and unbranched oligosaccharides carrying one α -1,6-glucosidic linkage with pullulanase from *S.mitis*.

—, subunit of enzyme; $\blacktriangle$, catalytic site; $\bigcirc$, glucose; $\bigcirc$, reducing end; 1,2,3,...,6 and 7, The number of subsites; —, α -1,4-glucosidic linkage; $\Rightarrow$, α -1,6-glucosidic linkage.

Fig.4. Productive binding modes of branched and unbranched oligosaccharides carrying one α -1,6-glucosidic linkages with pullulanase from *A.aerogenes*.

For key see Fig.3.

マルトース、あるいはマルトリオースの非還元末端側に α -1,6-結合しているマルトオリゴ糖が、二糖から四糖に大きくなると分解速度は速くなる。しかし、マルトースに α -1,6-結合する糖鎖が五糖以上になると増加しなくなる。したがって、*S.mitis* のプルラナーゼの触媒部位の非還元末端側のサブサイトは4個と推察される。触媒部位の還元末端側のサブサイト数は少なくとも3個と判断できるから、このプルラナーゼのサブサイトの数は少なくとも7個と推察できる。 α -1,6-結合糖の外側 (非還元末端側) に α -1,4-結合でグルコシル残基が1個B鎖に増えた構造を持つと、すなわち枝分れ構造になると、*S.mitis* のプルラナーゼの反応速度が大きくなる (Fig.3-a)。

A.aerogenes のプルラナーゼの場合、枝分れのないオリゴ糖に対する結合様式 (Fig.4-b) から、サブサイトの大きさは *S.mitis* の場合より1個少ないと推察される。 6^3 - α -マルトテトラオシルマルトリオースの分解速度が異常に小さいのは、サブサイト1に結合するグルコシル基の4位のOHが遊離の状態のほうが酵素反応に好ましいのかもしれない。*S.mitis* のプルラナーゼの場合と同様に、*A.aerogenes* のプルラナーゼも、枝分れのないオリゴ糖がB鎖にグルコシル基を α -1,4-結合し、枝分れを持つようになると顕著に作用する (Fig.4-a)。この傾向は高等植物のプルラナーゼでも認められる。

Fig. 5. Productive binding modes of unbranched oligosaccharides with isopullulanase.
For key see Fig. 3.

イソプルラーゼの場合、前述のプルラーゼの場合よりデータが少ないが、Table 3 の基質特異性の結果³⁴⁾から、*A. niger* のイソプルラーゼとオリゴ糖の productive な結合様式は、Fig. 5 のように書ける。プルラーゼの場合と違って、 α -1,6-結合糖の還元末端側の α -1,4-結合部分が酵素の触媒部位と結合して productive な結合様式をとる。イソプルラーゼのサブサイトの数は最低 4 個と推察される。

プルラーゼおよびイソプルラーゼは、基質中の α -1,6-結合糖を認識する特異的な酵素である。プルラーゼは、酵素により認識された α -1,6-結合糖の間を切断することができ、枝分れを有する α -1,6-結合糖をより良く分解する酵素である。一方、イソプルラーゼは、認識した α -1,6-結合糖に隣接する還元末端側の α -1,4-結合を選択的に切断するが、枝分れ構造をとると、もはや作用しなくなる。

この小稿はプルラン分解酵素、とくに、プルラーゼ、イソプルラーゼ、および *T. vulgaris* の α -アミラーゼの発見、調製・精製、基質特異性、諸性質についてまとめたものである。さらに、不十分な実験結果から、あえて、プルラーゼとイソプルラーゼの作用様式を考察し、それらのサブサイト構造の評価を試みたものである。プルラン分解酵素は多糖類やオリゴ糖の分岐点あるいはその近傍に作用する酵素なので、学問的のみならずますます工業的応用への発展が期待される。

文 献

- 1) 山口和夫, 山口辰夫: “最新応用微生物学入門”, 技報堂, p. 128, 381 (1965).
- 2) “The Yeasts,” Vol. 1, ed. by A. H. ROSE and J. S. HARRISON, Academic Press, London, p. 183 (1969); *ibid.*, *idem*, Vol. 2, p. 128, 381 (1972);

- ibid.*, *idem*, Vol. 3, p. 73 (1970).
- 3) H. BENDER, J. LEHMANN and K. WALLENFELS: *Biochim. Biophys. Acta*, **36**, 309 (1959).
- 4) S. UEDA, K. FUJITA, K. KOMATSU and Z. NAKASHIMA: *Appl. Microbiol.*, **11**, 211 (1963).
- 5) W. SOWA, G. A. ADAMS and A. C. BLACKWOOD: *Can. J. Chem.*, **41**, 2314 (1963).
- 6) 坂野好幸, 小林恒夫: アミラーゼシンポジウム, **6**, 25 (1971), 坂野好幸: 酸協, **32**, 37 (1972).
- 7) K. WALLENFELS, G. KEILICH, G. BECHTLER and D. FREUDENBERGER: *Biochem. Z.*, **341**, 433 (1965).
- 8) J. J. MARSHALL: *Die Stärke*, **27**, 377 (1975).
- 9) H. BENDER and K. WALLENFELS: *Biochem. Z.*, **334**, 79 (1961).
- 10) Y. SAKANO, N. MASUDA and T. KOBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 971 (1971).
- 11) 辻阪好夫, 浜田信威: アミラーゼシンポジウム, **6**, 17 (1971).
- 12) 石井淑子, 菅野六男, 清水瑞穂, 田村正紀, 末兼幹夫: 日本農芸化学会講演要旨集, p. 311 (1977).
- 13) 小林恒夫: 酸協, **28**, 466 (1970), アミラーゼシンポジウム, **5**, 3 (1970).
- 14) 上田誠之助: 二國二郎 (監), 中村道徳, 鈴木繁男 (編), “澱粉科学ハンドブック”, 朝倉書店, p. 107, 272 (1977).
- 15) S. UEDA and N. NANRI: *Appl. Microbiol.*, **15**, 492 (1967).
- 16) G. J. WALKER: *Biochem. J.*, **108**, 33 (1968).
- 17) M. YAGISAWA, K. KATO, Y. KOBAYASHI and S. UEDA: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 572 (1972).
- 18) D. J. MANNERS and K. L. ROWE: *Carbohydr. Res.*, **9**, 107 (1969).
- 19) E. Y. C. LEE, J. J. MARSHALL and W. J. WHELAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 365 (1971).
- 20) K. WALLENFELS, H. BENDER and I. R. RACHED: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 254 (1966).
- 21) 藤尾雄策, 塩坂 誠, 上田誠之助: 酸工, **48**, 8 (1970).
- 22) K. WALLENFELS and I. R. RACHED: *Biochem. Z.*, **344**, 524 (1966).
- 23) C. MERCIER, B. M. FRANTZ and W. J. WHELAN: *Eur. J. Biochem.*, **26**, 1 (1972).
- 24) B. EISELE, I. R. RACHED and K. WALLENFELS: *Eur. J. Biochem.*, **26**, 62 (1972).
- 25) S. UEDA and R. OHBA: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2381 (1972).
- 26) R. OHBA and S. UEDA: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2821 (1973).
- 27) B. M. FRANTZ, E. Y. C. LEE and W. J. WHELAN: *Biochem. J.*, **100**, 7P (1966).
- 28) R. OHBA and S. UEDA: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 967 (1975).
- 29) A. AMEMURA, H. KITAGAWA and T. HARADA:

- J. Biochem.*, **77**, 575(1975).
- 30) M. ABDULLAH, B.J. CATLEY, E.Y.C. LEE, J. ROBYT, K. WALLENFELS and W. J. WHELAN: *Cereal Chem.*, **43**, 111(1966).
- 31) M. ABDULLAH and D. FRENCH: *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 483(1970).
- 32) D.J. MANNERS: *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 49 (1975).
- 33) M. TAGO, M. AOJI, Y. SAKANO, T. KOBAYASHI and T. SAWAI: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 909(1977).
- 34) Y. SAKANO, M. HIGUCHI and T. KOBAYASHI: *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 180(1972).
- 35) Y. SAKANO, M. KOGURE and T. KOBAYASHI: unpublished data.
- 36) K. UMEKI and T. YAMAMOTO: *J. Biochem.*, **72**, 1219(1972).
- 37) 廣海啓太郎: 生化学, **44**, 233(1972), 澱粉科学, **21**, 190(1974).
- 38) 廣海啓太郎: 小野宗三郎(編), “入門酵素反応速度論”, 共立出版, p. 138(1975).

Question

Bent Stig Enevoldsen, Carlsberg Res. Cent.

A Comment: Since the systematic name for isopullulanase (pullulan 4-glucanohydrolase) does not specify which of the two types of α -1,4-linkages that are hydrolyzed, it is helpful to think of the name isopullulanase as short for “Isopano-pullulanase” since the final product from pullulan is isopanose. Following this line of thought the new enzyme from *Thermoactinomyces* which produces panose from pullulan (*i.e.*, hydrolyses the other of the two types of α -1,4-linkages) could be named “Pano-pullulanase.” Although the *Thermoactinomyces* enzyme resembles α -amylase, to my knowledge α -amylases are not known to hydrolyse pullulan (except some pullulans which contain some maltotetraose in the molecule). Thus I propose Pano-pullulanase as the Recommended name for this type of enzyme.

Answer

Thank you very much for your comment, Dr. Enevoldsen. I agree with you that the name, pullulan 4-glucanohydrolase, does not signify the specificity of isopullulanase. After the enzymatic properties of the *Thermoactinomyces* enzyme is more clarified, two kinds of “pullulan 4-glucanohydrolase”

will be named better than now.

Question

J. John Marshall, Howard Hughes Med. Inst.

I would like to ask Dr. Sakano two questions. Firstly, in regard to the *Thermoactinomyces vulgaris* enzyme, what is the action of the enzyme on the branched component of starch, in particular, what are the nature of the linear and branched dextrins containing α -1,6-glucosidic linkages that result from the action of the enzyme. Secondly, do cyclodextrins act as substrates or inhibitors of either isopullulanase or the *Thermoactinomyces* enzyme. It has been shown in my laboratory (J.J. Marshall, *FEBS Lett.*, **37**, 269~273(1973)) that cyclodextrins are not yet able to explain the mechanism of the inhibition of pullulanase by cyclodextrin; a study of the effect of these unusual oligosaccharides on the two other pullulan-hydrolyzing enzymes you have described may be informative in term of arriving at an explanation of the inhibitory effect.

Answer

Sakano; Thank you very much for your questions and comments. Mr. Tamura, C.P.C. Japan, would you please answer to the first question?

Tamura; *T. vulgaris* α -amylase produced 12% of glucose, 74% of maltose, 3% of panose and other higher branched oligosaccharides from soluble starch (1%). Its action on starch was similar to those of *Asp. oryzae* and porcine pancreas α -amylases.

Sakano; We have not yet made any experiments concerning the inhibition of isopullulanase and the *Thermoactinomyces* enzyme by cyclodextrins. I hope I will be able to do these experiments soon.

【質問】

阪大産研 雨村

1) プルラナーゼには cell bound と extracellular のものがありますが、示されたデータはどちらのものを使われましたか。

2) cell bound のものと extracellular のものとは M.W. が違いますが、protein として異なるとお考えですか。

【答】

1) Table 2 のデータは両酵素に関するもので、プルラナーゼの基質特異性のデータは extracellular の酵素に関するものです。

2) まだ、確実な実験結果は得られてないが、cell bound の酵素が、培養条件、微生物の環境条件の変化によって extracellular の酵素になるのだろうと考えています。九大の上田先生はどのようにお考えでしょうか。〔九大、上田先生の答〕 小生も同一蛋白質に由来するものと考えています。intracellular のものが若干分子量が大きい程度のちがいだけです。

【質問】

大阪市立工研 辻阪

グルコアミラーゼでグルコースを製造するときに、イソプルラナーゼを併用してはどうかのご意見ですが、

もし両酵素が存在すると図に示すBのような糖ができ、これにグルコアミラーゼが作用するとイソマルトースが残ると考えられ、むしろ分解率は下ると思われます。

【答】

ご指摘のようなことも考えられますが、グルコアミラーゼ単独より、糖化速度を上げるのには効果的だと思います。

【質問】

京大農 廣海

サブサイト構造を水解反応の相対速度から考察する際に、productive な結合様式のみを反映するパラメーターとして、(K_m/k_0) の相対値が有用であり、そのためにはできるだけ低い (K_m に比して) 基質濃度で測られた相対速度を用いるのが望ましいと思います。

【答】

先生のご指摘のとおりですが、あえて、プルラナーゼ、イソプルラナーゼのサブサイト構造の評価を試みた。 α -1,6-結合を含む基質を多量に調製することが大変困難なので、それぞれの基質に対する K_m 値は測定されてません。今後、この種のオリゴ糖の調製法が確立されれば、もっと十分な討論ができると思います。