

Dunaliella tertiolecta 의 葡萄糖酸化와 酸化酵素系(Ⅱ)

Cell-free Extracts 를 使用한 Glycolytic 및 Pentose Phosphate Pathway 의 存在確認

權 寧 命

(서울大學校 生藥研究所)

Glucose Oxidation and It's Oxidative Enzyme Systems in
Dunaliella tertiolecta. (Ⅱ)

Evidence for Glycolytic and Pentose Phosphate Pathways in Cell-free Extracts.

KWON, Young Myung

(Natural Products Research Institute, Seoul National University)

ABSTRACT

By spectrophotometric assay method, the following enzymes could be detected in *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella pyrenoidosa* cell-free extracts: Hexokinase; Glucose-6-phosphate, 6-Phosphogluconate and Triosephosphate dehydrogenase; Transketolase; Phosphogluco and Ribosephosphate isomerase; Phosphoglucomutase; Phosphofruktokinase; Fructosediphosphate aldorase and Ribulosephosphate 3-epimerase. Such enzymes are in accordance with the proposed pathway of glucose catabolism by *D. tertiolecta* as well as *C. pyrenoidosa*. Also, it could be estimated, under the presence of NADP, that pentose phosphate pathway were more active than glycolytic pathway in *D. tertiolecta* cell-free systems.

緒 論

高等植物에서 hexosephosphate가 pentose phosphate pathway를 거쳐 酸化될 수 있음이 밝혀지고 (Gibbs, 1954), *Chlorella* 에 glycolytic pathway와 pentose phosphate pathway가 共存함이 報告된 以來 (Casselton & Syrett, 1962, Delvin & Galloway, 1968) 綠色植物에서 炭水化物代謝의 基本이 glycolytic pathway와 pentose phosphate pathway임이 一般的으로 알려졌으며, achloic algae인 *prothotheca zopfii* 에도 上記 두代謝系가 存在함이 Ciferri(1962)에 依하여 發表되기도 하였다.

Antia(1965)는 海洋性單細胞藻類의 enolase를 調査한 實驗에서 *Dunaliella* 를 비롯한 10餘種의 藻類 에는 enolase가 存在하나 *Coccolithophorid* 와 *Dinoflagellate* 에서는 enolase의 存在를 確認할 수 없다하고, 이들의 炭水化物代謝가 다른 藻類들과 다른 것이라 하였다. Jacobi(1957)도 紅藻類에는 aldolase, triosephosphate dehydrogenase 등의 活性이 測定되지 않았으나 綠藻類에는 存在하므로 이들간의 代謝系의 差異가 있을 것이라 한바있다. 한편 *Chlorella* 와 *Scenedesmus* 에서도 enolase를 包含하지 않는 glycolytic pathway가 있음이 Dvorakova-Hladka(1968)에 依해 報告되기도 하였다.

De Vries(1967)는 *Bifidobacterium*가 aldolase와 glucose-6-phosphate dehydrogenase의 參與없는 炭水化物代謝系를 갖고 있음을 發表하였고, Meloche(1962)는 *Lactarius sp.*에 phosphofruktokinase와 triosephosphate isomerase가 存在치 않는다고 하였으나 後에 이러한 結果가 實驗操作時에서 惹起된 該

當酵素의 不活性化에 原因이 있었음이 밝혀지기도 하였다(Casselton, 1966).

Andersen & Lundegren(1969)은 autotroph인 *Ferrobacillus*가 pentose phosphate pathway에서 重要한 位置에 있는 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase를 갖고 있지 않으나 CO₂를 固定할 수 있는 것으로 보아 特殊型의 CO₂ 固定系를 갖고 있을 것이라 하였다.

以上과 같이 生體에서 基本인 두 酵素系가 生物의 種類에 따라서 系의 活性이 다르고, 또한 系의 一部가 修整된것 등을 볼 수 있어, 一般적인 知識단으로 모든 生體를 다룰 수 없다고 보겠다.

이미 *Dunaliella*의 cell-free systems이 葡萄糖을 酸化할 수 있고, pyridine nucleotide를 供給하면 特別히 NADP에 依하여 CO₂의 生成이 가장 크게 增加하는 것으로 이루어 pentose phosphate pathway가 存在하며, 그 活性이 glycolytic pathway보다 強할 것이라 한 바 있으나(Kwon, 1969) 葡萄糖의 酸化經路를 詳細히 알지 못하였고, NADP에 依해서 관련 pentose phosphate pathway의 活性이 增加함을 더 以上 確證하지 못하였기 때문에 本實驗에서는 glycolysis의 初期過程에 關係되는 酵素와 pentose phosphate pathway의 酵素를 各各 調査하여 그들의 存在를 確認하고, 이러한 酵素를 갖고 있는 것으로 알려진 *Chlorella pyrenoidosa*의 實驗을 對照로써 병행하여 그 結果를 比較考察하고자 한다.

材料 및 方法

材料와 培養; *Dunaliella tertiolecta*(Butcher)와 *Chlorella pyrenoidosa*는 既報한 바와 同一한 培養液에서 培養하였다(Kwon, 1969). 培養은 容積 3l의 連續培養器를 使用하여 每日 4.8l의 培養된 細胞液을 얻었다. 培養條件은 光度 400燭光, 溫度 22°C, pH 7.6으로 하였으며, 5% CO₂의 空氣를 계속 通過시키면서 每時 200 ml의 새로운 培養液을 miropump로 注入하였다.

Cell-free extracts의 製造; 遠心分離에 依해 細胞를 모으고, 洗滌, 遠沈하여 다시 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)로 浮遊液을 만들고, 이것을 French Pressure Cell로 細胞膜을 破壞시킨 後, 30分間 遠心分離(32,000 G, 4°C)하여 그의 上澄液을 cell-free extracts로 하였다.

豫備實驗에서 細胞膜을 破壞한 材料를 低溫에 (-15°C)貯藏함으로써 大部分의 色素와 一部 蛋白質을 除去할 수 있다는 Devlin & Galloway(1968)의 實驗結果를 確認하여 모든 材料는 最少限 -15°C에서 24時間을 處理한後 使用하였다. 이때 特定酵素의 活性이 減少된다는 現象은 보지 못하였다.

酵素活性의 測定; 各酵素의 活性測定은 基質에 依한 pyridinenucleotides(NAD, NADP, NADH)의 酸化 또는 還元의 程度로하였다. 測定은 室溫에서 1 cm, quartz cell로 340 mμ의 波長에서 Shimadzu spectrophotometer로 하였다.

Hexokinase(EC, 2, 7, 1, 1,)는 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD)와 連關시켜 NADP의 還元으로 測定하였다. 基質로서는 葡萄糖, fructose, mannose 및 galactose를 ATP와 함께 使用하였다. Glucosephosphate isomerase(EC, 5, 3, 1, 9,)도 G6PD와 連關된 NADP의 還元으로 測定하였는데 基質로는 Fructose-6-phosphate(F 6 P)를 使用하였다. G6PD(EC, 1, 1, 1, 49)와 6-phosphogluconate dehydrogenase(EC, 1, 1, 1, 44)는 Devlin & Galloway(1968)의 方法을 基礎로 하였다.

Transketolase(EC, 2, 2, 1, 1,)는 Ribose-5-phosphate를 基質로 하고, triosephosphate dehydrogenase에 依한 NADP의 還元으로 測定하였으며, phosphofrutokinase(EC, 2, 7, 1, 11,)와 fructose-diphosphate aldolase(EC, 4, 1, 2, 13)는 fructose-1,6-diphosphate 또는 fructose-6-phosphate와 ATP를 基質로 하고, TIM, GDH에 依한 NADH의 酸化로써 測定하였다(Casselton, 1966).

Triosephosphate dehydrogenase(EC, 1, 2, 1, 12, EC, 1, 2, 1, 13)는 glyceraldehydphosphate에 依한 NAD 또는 NADP의 還元으로 測定하였다(Devlin & Galloway, 1968).

本實驗에 使用한 buffer는 參考文獻에는 關係없이 tris-HCl buffer를 選擇하였고, 적용된 pH도 豫備實驗에서 該當酵素들의 活性이 測定되어 任意로 決定하였다.

蛋白質의 定量; cell-free extracts의 酵素活動度를 計算하기 爲한 蛋白質의 定量은 Folin-phenol 試藥法으로 하였다(Lowry, et al. 1951).

略語解説; NAD; oxidized nicotinamide adenine dinucleotide. NADH; reduced nicotinamide adenine dinucleotide. NADP; oxidized nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, ATP; adenosine triphosphate, TIM; triosephosphate isomerase. GDH; α -glycerophosphate dehydrogenase. TPP; thiamine pyrophosphate.

結果 및 論議

Hexokinase의 活性은 比較的 容易하게 測定할 수 있었고 反應도 長時間 維持되었다(Fig. 1). *Chlorella*가 fructose를 生長物質로 利用하지 못하며, mannose에 依하여는 生長阻止를 받으면서도 이들

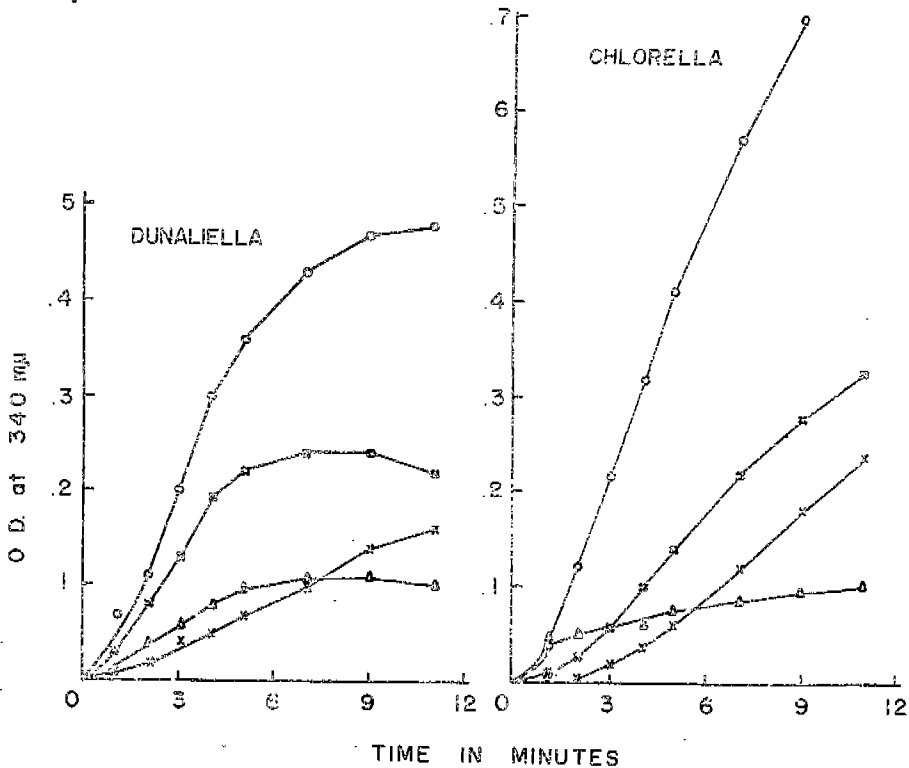


Fig. 1. Assay of hexokinase. 3.0 ml final reaction mixture contained 250 μ moles tris buffer (pH 7.6), 15 μ moles $MgCl_2$, 10 μ moles ATP, 500 μ g NADP 20 μ moles substrates and 2.0 mg protein of cell-free extracts of *D. tertiolecta* and 1.7 mg protein of cell-free extracts of *C. pyrenoidosa*.
 ○—○ glucose, ×—× fructose, △—△ mannose, □—□ galactose.

化合物을 磷酸化시킬 수 있는 hexokinase를 體内に 保有하는 것과 같이 (Devlin & Galloway, 1968) 葡萄糖조차 炭素源으로 利用하지 못하는 *Dunaliella*도 hexokinase를 갖고 있으며, 活性도 *Chlorella*보다 크게 틀리지 않는 것으로 보아 이것이 constitutive enzyme임을 알 수 있다.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase의 測定時 NAD의 還元은 全혀 볼 수 없었으며, NADP의 경우도 基質이 存在하지 않으면 Casselton(1966)의 경우와 같은 弱한 還元조차 볼 수 없었다.

Glucose-6-phosphate에 依한 NADP의 還元이 6-phosphogluconate에 依한 것보다 2倍程度나 높은 것

은 (Fig. 2) G 6 PD 活性自體가 6 PGD 보다 2 배나 높은 것이 아니라 G 6 PD 에 의해 生成된 物質이 6 PGD 의 공격을 받기 때문이다. glucosephosphate isomerase 는 酵素의 作用이 G-6-P 生成에 有利하므로 基質로 F-6-P 를 使用하여 쉽게 活性를 測定했으나, G-6-P 를 基質로 하고 phosphofructokinase, fructosediphosphate aldolase, 및 GDH 의 힘을 빌려 NADH 의 酸化를 測定할 경우 긴 lag phase(3~4 分)를 갖이여, 낮은 酸化를 測定할 수 있었을 뿐이다(未發表).

Transketolase 의 基質로는 ribose-5-phosphate 만을 使用하였으며, 이때 반드시 TPP 의 存在가 必要하였다(Fig. 3). 그러므로 *Dunaliella* 와 *Chlorella* 의 cell-free extracts 에는 相當히 強力한 活性를 갖인 ribosephosphate isomerase(EC, 5, 3, 1, 6,)와 ribulosephosphate 3-epimerase(EC, 5, 1, 3, 1,)가 있음을 알 수 있고, 이들의 作用으로 또 다른 基質인 xylulose-5-phosphate 를 供給한 ribose-5-phosphate 로부터 얻고 있음을 알 수 있다. 또한 이들 兩酵素는 特異한 化合物의 存在를 要求하지 않았다.

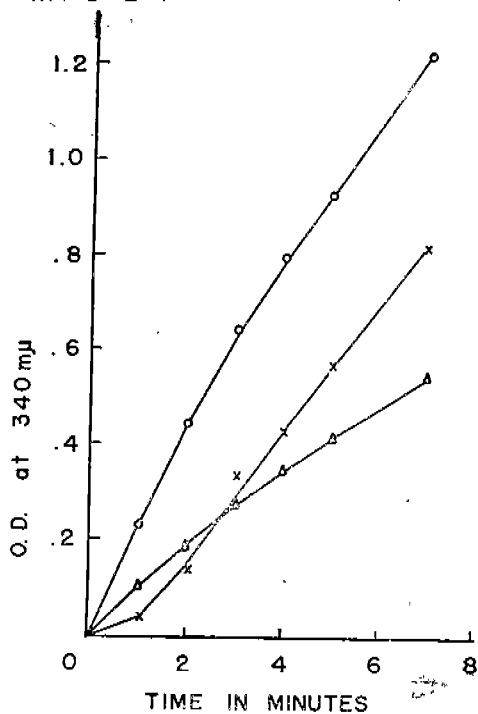


Fig. 2. Demonstration of Glucose-6-phosphate and 6-Phosphogluconate dehydrogenase, and Glucosephosphate isomerase.

3.0 ml final reaction mixture contained 200 μ moles tris buffer(pH 7.6), 10 μ moles $MgCl_2$, 500 μg NADP and 0.7 mg protein of cell-free extracts. \circ — \circ 5 μ moles G-6-P. \times — \times 7 μ moles F-6-P. \triangle — \triangle 10 μ moles 6-PG.

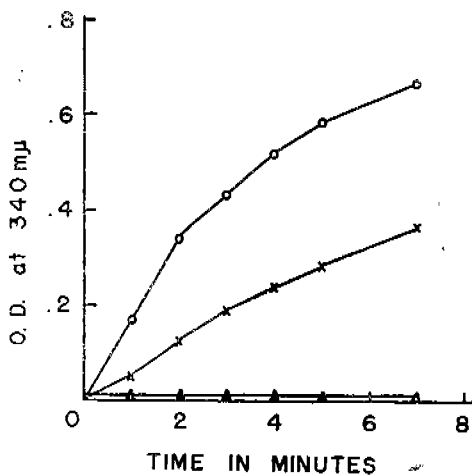


Fig. 3. Assay of transketolase. 3.0 ml final reaction mixture contained 200 μ moles tris buffer (pH 7.6), 10 μ moles $MgCl_2$, 5 μ moles TPP, 30 μ moles Na-arsenate, 500 μg NADP and 10 μ moles ribose-5-phosphate: \times — \times 0.7 mg protein (cell free extracts) \circ — \circ 1.8 mg protein \triangle — \triangle no addition of substrate or TPP.

Phosphofructokinase (Fig. 4)는 必要한 PO_4 의 供給源으로 ATP 를 使用할 수 있었다. ATP 의 濃도가 10 mM 에 達하면 酵素反應에 顯著한 阻害를 갖어왔다. ADP 는 PO_4 의 donor 가 되지 못하고 오히려 阻害物質의 하나였다. Citrate 도 阻害現像을 나타내었으나 比較的 高濃

度(50 mM)에서만 볼 수 있었다(未發表).

이러한 phosphofructokinase 의 特性은 Mil'man(1967)의 結果와 비슷하며 Scrutton & Utter(1968)가 報告한 바와 같은 特殊한 性質의 것은 아닌것 같다.

Triosephosphate dehydrogenase 는 NAD 와 NADP 모두를 還元할 수 있는 點으로 보아 光合成細胞 에 特有한 NADP-dependent 한 酵素가 *Dunaliella* 에도 存在하였다(Fig. 5). *Euglena* 에서는 光線에 依

해서만 NADP-dependent 酵素가 生成되며 (Brawerman & Konigsberg, 1960), *Chlorella*의 경우는 constitutive 한 것으로 光이 完全に 遮斷된 條件에서 生育한 個體에서도 本酵素의 活性이 測定되었다고 한다(Devlin & Galloway, 1968). 그렇지만 *Dunaliella*의 暗所培養이 不可能한 現在로서 *Dunaliella*의 NADP-dependent triosephosphate dehydrogenase가 inducible 한 것인지 constitutive 한 것인지는 알 수 없다. 反應液에 無機 PO_4 를 供給치 않고 arsenate를 使用한 것으로, 反應生成物에는 아무런 差異는 없다. 즉 acyl-enzyme 에 依한 arsenolysis로 3-phosphoglyceric acid가 生成되기 때문이다(Boyer & Segal, 1954).

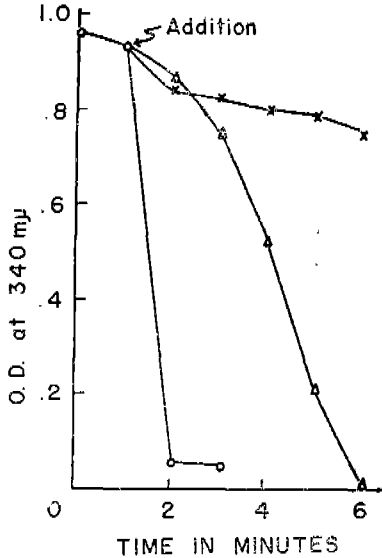


Fig. 4. Demonstration of phosphofructokinase and fructosediphosphate aldolase. 3.0 ml final reaction mixture contained 200 μ moles tris buffer (pH 7.6), 10 μ moles $MgCl_2$, 5 μ moles Na-monoiodoacetate, 10 units TID, 8.5 units GDH, 350 μ g NADH and 0.8 mg protein. ○—○ 10 μ moles Fructosediphosphate ×—× 20 μ moles fructose-6-phosphate △—△ 10 μ moles fructose-6-phosphate and 10 μ moles ATP.

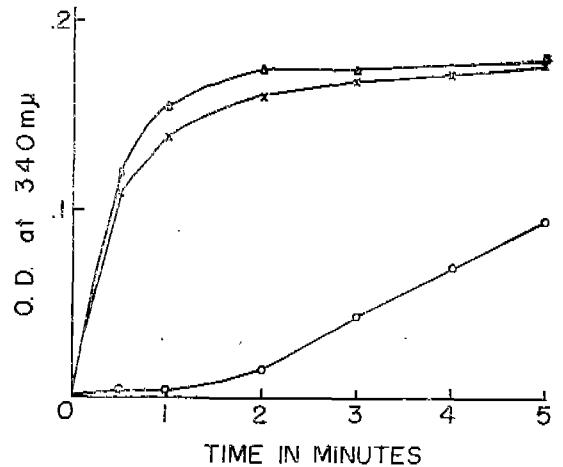


Fig. 5. Assay of Triosephosphate dehydrogenase and aldolase. 3.0 ml final reaction mixture contained 200 μ moles tris buffer (pH 8.6), 30 μ moles Na-arsenate, 300 μ g NAD (or NADP) and 0.7 mg protein: ○—○ 8 μ moles Fructosediphosphate ×—× 8 μ moles 3-Phosphoglyceraldehyde and NAD △—△ 8 μ moles 3-phosphoglyceraldehyde and NADP.

*Dunaliella*에서는 triosephosphate dehydrogenase에 依하여 NADP의 還元이 항상 NAD보다 優勢하였으며, *Chlorella*에서는 NAD의 경우가 優勢하였다(Table, 1). 이러한 결과가 *Dunaliella*의 obligate phototroph 한 性質이 *chlorella*보다 더強하다는 說明을 할수 있을런지 모르겠다.

Fructosediphosphate aldolase(aldolase)의 存在는 두가지 方法으로 測定할 수 있었다(Fig. 4 and 5). NADH의 酸化일 경우 基質添加 즉시 反應이 始作된 反面, NADP의 還元일 경우는 1~2分の lag phase를 갖었는데, 理由로서는; 前者의 경우 過量의 TID와 GDH가 存在하기 때문이며, 後者の 경우는 extracts의 TID가 dihydroxyacetone phosphate 生成에 有利하게 作用하기 때문에 (Buecher & Hohorst, 1963) 充分한 glyceraldehydephosphate가 蓄積되던 얼마간의 時間이 必要하기 때문일 것이다.

Table 1에서는 *Dunaliella*와 *Chlorella*의 各酵素의 活性을 比較하기 爲하여 酵素活動度를 計算하였다. Phosphofructokinase와 aldolase의 値는 NADH의 酸化로 計算한 것이며, phosphoglucomutase는 Fig. 1과 同等한 條件에서 G-1-P(10 μ mole)를 基質로하고, NADP의 還元으로 測定하였다. 이때

Table 1. Enzyme activities in cell-free extracts

Enzymes	<i>D. tertiolecta</i>	<i>C. pyrenoidosa</i>
Glucose-6-PO ₄ dehydrogenase	64-87	135-145
6-Phosphogluconate dehydrogenase	12-31	63-86
Transketolase	51-94	82-95
Phosphoglucomutase	0.3-1	8-11
Phosphoglucoisomerase	25-30	77
Phosphofructokinase	48-68	62-64
Fructosediphosphate aldolase	97-185	191-283
Triosephosphate dehydrogenase		
NAD-dependent	31-55	52-55
NADP-dependent	32-60	20-44

All values given in terms of μ moles pyridine nucleotide oxidized or reduced per min. per mg protein. The range of values obtained from at least three separate experiments is given.

ATP의 존재는 反應自體에 아무런 影響을 미치지 못했다. *Dunaliella*에서의 phosphoglucomutase 活性이 *Chlorella*의 1/10~1/25이라는 激甚한 差를 보이는 것은 *Dunaliella*에서 炭水化合物代謝의 一部가 *Chlorella*와 다르다고 解析할 수 있겠다.

이제 *Dunaliella* cell-free system(Kwon, 1969)에서 glycolytic pathway와 pentose phosphate pathway 間의 競争을 考察하면, 가장 重要な 基質인 G-6-P의 供給이 各酵素에 充分할 경우 서로間의 競争은 없으나, 不足할 時엔 競争이 顯著해진다(Ramasarma, 1956). cell-free system에 ¹⁴C-glucose를 添加한 後 ¹⁴CO₂의 發生이 2時間以後까지 계속 增加하는 것으로(未發表) 보아 葡萄糖酸化系의 活性이 長時間 持續될 事를 알겠다. 그런데 cell free systems의 酸素消費量이 whole cell의 경우보다 74~76%나 低下하는 것으로 보아(未發表)서 細胞膜의 破壞로 cytochrome系의 不活性化가 일어남으로 어느 時間以後에는 glyceraldehyde phosphate와 pyruvate 등의 化合物의 濃도가 증가하여 포화상태에 이르게 될 것이며, 結果로 glycolytic pathway에서 G-6-P의 利用은 阻害를 받을 것이다(Scrutton & Utter, 1968). 그러나 pentose phosphate pathway는 NADP의 存在로 계속 높은 活性을 갖일 것이므로, 오히려 glycolysis의 逆過程이 일어나게 될 것이다(Sauerman, 1967).

그러므로 NADP가 存在하는 cell free system에서는 葡萄糖의 酸化가 pentose phosphate pathway를 거쳐서 일어난다고 하겠다.

結 論

各酵素의 活性을 測定할 때 最適條件을 調査하지 못하였으나 兩材料를 各各 同一한 條件과 方法으로 取及하였으므로 그 結果를 比較할 수는 있겠다.

*Dunaliella*의 全酵素의 活性이 *Chlorella*보다 낮으나(Table 1) 그러한 差異라고는 볼 수 없고 酵素別 活性의 경향이 兩材料에서 같다고 보겠다. 두 材料를 比較할 때 考慮할 것은; 1) 低溫處理時 除去되는 蛋白質의 量이 다를 수 있으며, 2) cell-free extracts內의 該當酵素蛋白과 他蛋白質間의 量的 差異 및 3) 蛋白質과 試藥의 反應으로 생기는 色의 差 등이 活動度計算에 미치는 影響이 있을 것이며 4) 海洋性藻類와 淡水藻類間에 存在하는 生理生化學的인 差에서 오는 影響등을 모른다는 것등이다.

結論으로 指摘할 수 있는 것은 *Dunaliella*의 cell-free extracts가 pentose phosphate pathway와 glycolytic pathway의 酵素를 갖고있고, 各酵素間의 調節作用은 모르지만(Rapoport, 1968) NADP가 存在하는 cell-free system에서는 pentose phosphate pathway가 glycolytic pathway보다 큰 活性을 갖고 있다

할 수 있다. 그리고 上記의 兩醇素系를 갖인 *Dunaliella*가 葡萄糖을 利用할 수 없는 것이 細胞膜의 不透過性에 있음을 (Kwon, 1969) 다시 한번 確認한 것이다.

要 約

*Dunaliella tertiolecta*와 *Chlorella pyrenoidosa*의 cell-free extracts를 使用한 實驗에서; Hexokinase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, Transketolase, Phosphogluco isomerase, Phosphoglucomutase, Phosphofructokinase, Fructosediphosphate aldolase, Triosephosphate dehydrogenase의 存在를 確認하고, Ribosephosphate isomerase와 Ribulosephosphate 3-epimerase의 存在를 認定할 수 있었다.

兩材料에서 各醇素의 活性을 比較할 때 重要한 差異는 없었고, NADP가 存在하는 cell-free system에서는 pentose phosphate pathway가 glycolytic pathway보다 높은 活性을 갖고 長時間 反應이 계속 될 수 있음을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Anderen, K. J. & D. G. Lundergren, 1969. Enzymatic studies of the iron oxidizing bacterium, *Ferrobacillus ferrooxidans*: evidence for a glycolytic pathway and Krebs cycle. *Can. J. Microbiol.* 15, 73-79.
2. Antia, N. J., J. Kalmakoff, & A. Watt. 1966. Enolase activity in marine planktonic algae. *Can. J. Biochem.* 44, 449-454.
3. Boyer, P. D. & H. L. Segal. 1954. Sulphydryl groups of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and acyl-enzyme formation. In: *The mechanism of enzyme action* (ed. by W. D. McElroy and B. Glass.) pp. 520-544. Johns Hopkins Press. Baltimore.
4. Brawerman, G. & N. Konigsberg. 1960. On the formation of the TPN requiring glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase during the production of chloroplasts in *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 43, 374-381.
5. Buecher, T. & Hans-juergen Hohorst. 1963. Determination with glycerol-1-phosphate dehydrogenase, aldolase and triosephosphate isomerase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. pp. 246-252. (ed by Hans-Ulrich Bergmeyer) Academic Press. New York.
6. Casselton, P. J. & P. J. Syrett. 1962. The oxidation of ¹⁴C-labelled glucose by *Chlorella vulgaris*. *Ann. Bot.* 26, 71-82.
7. Casselton, P. J. 1966. Enzymes of the Embden-meyerhof and Pentose phosphate pathways in *Polyporus brumalis* extracts. *J. exptl. Bot.* 17, 579-589.
8. Ciferri, O. 1962. Carbohydrate metabolism of *Prototheca zopfii*. I. Enzymes of the glycolytic and hexose monophosphate pathways. *Enzymologia.* 24, 283-297.
9. Devlin, R. M. & R. A. Galloway, 1968. Oxidative enzymes and pathways of hexose and triose metabolism in *Chlorella*. *Physiologia plantarum.* 21, 11-25.
10. DeVries, W., S. J. Gerbrandy & A. H. Stouthamer, 1967. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 136, 415-425.
11. Dvorakova-Hladka, J. 1968. On the catabolic pathways of sugars in green algae. *Biologia plantarum*

- (Praha) 10. 58-71.
12. Gibbs, M. 1954. The respiration of the pea plant. Oxidation of hexose phosphate and pentose phosphate by cell-free extracts of pea leaves. *Plant physiol.* 29. 34-39.
 13. Jacobi, G. 1957. Vergleichend enzymatische untersuchungen an marinen gruen und rotalgen. *Kiel Meersforsch.* 13. 212-219.
 14. Kwon, Y. M. 1969. Glucose Oxidation and It's Oxidative Enzyme Systems in *Dunaliella tertiolecta*. I. Oxidation of ^{14}C -glucose in Whole Cells and in Cell-free Systems. *Korean J. Bot.* 12. 55-62.
 15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193. 265-275.
 16. Melche, H. P. 1962. Enzymatic utilization of glucose by a Basidiomycete. *J. Bacteriol.* 83. 766-774.
 17. Mil'man, L. S. & Yu. G. Yurovitskii. 1967. Phosphofructokinase activity and regulation of the pasture effect during early embryogenesis. *Biochemistry.* 32. 344-349.
 18. Ramasarma, T. & Giri, K. V. 1956. Phosphoglucose isomerase of green gram(*Phaseolus radiatus*). *Arch. Biochim. Biophys.* 62. 91-96.
 19. Rapoport, S. 1968. The regulation of glycolysis in Mammalian erythrocytes. In: *Essays in Biochemistry* (ed. by Campbell, P. N. & G. D. Greville) Academic Press (London).
 20. Sauermann, G. 1967. The iodoacetate-induced translocation of glucose carbon in ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 136. 577-579.
 21. Scrutton, M. C. & M. F. Utter. 1968. The regulation of glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. In; *Ann. Rev. Biochem.* (ed. by Boyer, P. D.) *Ann. Rev. Inc. U.S.A.*