

발아중인 벼 품종별 Malathion 가수분해효소에 관한연구

李 載 球

충북대학 농화학과

(1971. 12. 2. 수리)

A Study on Malathion-hydrolyzing Esterases of Germinating Seeds of Some Rice Plant Varieties

Jae Koo Lee

Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk College

(Received Dec. 2, 1971)

Summary

Kwanok, Fujisaka #5, Paldal, and Suwon #82 as japonica type and IR-262 and CP-slo as indica type of rice seeds were selected for this experiment among varieties grown in Korea. Activities of crude enzymes extracted from germinating seeds of these varieties on malathion and p-nitrophenyl acetate as substrates, esterase zymograms with 1-naphthyl acetate as substrate, and some observations are summarized as follows:

1. Activities per unit volume of crude enzyme preparations on malathion were in the order of Kwanok > IR-262 > Fujisaka #5 > CP-slo > Paldal > Suwon #82.
2. Esterase zymograms on agar-gel electrophoretograms exhibited three to four bands two electrodes with little difference among varieties, nevertheless showing a wide and strongly-colored band toward cathode. Suwon #82 has a somewhat different pattern from others.
3. Enzyme activities per milligram protein with p-nitrophenyl acetate as substrate were in the order of CP-slo > IR-262 > Paldal > Kwanok > Suwon #82 > Fujisaka #5, indicating that activities of indica type are much stronger than those of japonica type, but not in agreement with results with malathion.
4. Malathion did not much inhibit the esterase activity at the concentration of 0.2PPM on electrophoretograms.
5. It is supposed that there is a complex esterase system hydrolyzing malathion and p-nitrophenyl acetate in germinating rice seeds.

I. 머리말

농약의 잔류독성 문제는 오늘날 크게 논의 되고 있어 이에 관한 연구는 세계 각국에서 활발히 진행되고 있다. 유기인계 농약은 가수분해되기 쉬운 입산 ester로 되어 있어 잔류독성이 크게 우려되는

바는 아니나 이들 농약이 식물체에 살포되었을 때 침투되어 식물조직중의 esterase를 비롯한 각종 효소의 작용을 받아 무독성의 화합물로 분해된다는 사실은 잔류문제를 해결함에 있어 중요한 요인이 아닐 수 없다.

Esterase에 관하여 Hofstee⁽¹⁾는 지방산 ester가

수분해 효소를 (a) 용액상의 기질에 작용하는 효소(ester hydrolases proper)와 (b) 용해 되지 않은 기질에 주로 작용하는 효소(lipase-type ester hydrolases)로 대별 하였다.

Aldridge⁽¹⁾와 Augustinsson^(2,4,5) 및 기타^(6,1)에 의하면 혈장에서 얻은 ester hydrolases proper는 carboxyl esterase와 aryl esterase의 둘로 대별되며 기타 동물 조직의 esterase에도 적용된다.

Carboxyl esterase (carboxylic-ester hydrolases, aliesterases, B-esterases)는 넓은 특이성을 가지고 있으므로 지방족 및 방향족 ester를 가수분해 하고 choline esters는 가수분해 하지 못하여 대부분의 유기인제에 예민하지만 physostigmine (PI=5)에는 저항성을 가졌다. 이것은 다시 기질 특이성에 따라 acetyl-, propionyl-, butyryl-ester hydrolase로 나뉘어진다.

Aryl esterases(aryl-ester hydrolase, A-esterase)는 방향족 ester는 가수분해하지만 보통지방족 ester는 가수분해 하지 못하고 대부분의 유기인제와 physostigmine에 저항성이 있다. 이것은 diethyl⁽¹⁾ p-nitrophenyl phosphate (paraoxon)와 di-isopropyl⁽²⁴⁾ fluorophosphate(DFP)와 같은 유기인제 저해제를 가수분해 하기때문에 저해를 받지 않는다.

Bergmann⁽⁶⁾ 등에 의하면 이효소는 p-chloromercuribenzoate(PCMB)에 의해 저해된다고 하며 aryl esterase를 저해하는 농도에서 PCMB에 의하여 활성을 띄며 aryl esterase와 유사하게 행동하는 C-ester hydrolase를 돼지콩팥 추출물에서 얻었다 한다.

Choline esterases는 ester hydrolases proper로 분류되지만 $10^{-5}M$ 의 physostigmine에 의해 저해를 받는다.

식물의 esterase는 이에 준하여 분류하게 되며 Jansen 등^(12,13)이 본래 acetyl esterases(acetic ester hydrolase)라고 기술하였던 효소들은 DFP에 의하여 저해되므로 Jooste 등⁽¹⁴⁾에 의하면 acetyl-B-esterases라고 분류할수 있다고 한다.

보다 최근 Jooste 등⁽¹⁵⁾은 전기영동의 이동도와 기질 및 저해제의 특성에 의하여 오이 콩, 밀, 옥수수에는 복합 esterase system을 가지고 있다는 증거를 얻고 carboxyl-esterases와 aryl-esterases가 존재한다고 하였다.

이들은⁽¹⁴⁾ 또한 DFP(PI=3)에 의하여 활성화되고 PCMB에 의해 저해 되지 않으며 2-naphthyl phenoxy acetate에 특이성을 갖는 phenoxy-esterase

가 콩의 어린묘중에 존재함을 보고 하였다. Schwartz 등⁽³⁵⁾은 green bean, 양배추, 마령서(potato tuber), citrus albedo와 flavedo 및 많은 오이과의 열매중에서 esterase를 발견하고 이효소는 서로 상이한 종(species)이나 또는 동일종 내에서도 다른 strain이나 또는 같은 식물이라도 상이한 부분은 성질이 서로 다르다는 것을 발견하였으며 이는 동물의 경우와 유사한것 같다.^(2,3)

Frankel 등⁽⁹⁾ 발아중의 완두 12 품종의 추출액 으로부터 starch gel electrophoresis에 의하여 6개의 esterase 활성을 갖는 band를 분리 하였다.

저자는 일종의 ester 화합물인 유기인제 중에서 저독성이고 비교적 분해가 빠른 malathion을 기질로 취급하고 이것이 생육중인 벼에 살포되었을 때 조직내에서의 가수분해 작용을 예상하고 본실험을 착수 하였다.

O'Brien⁽²⁸⁾ 및 Metcalf 등⁽²³⁾은 malathion이 동식물의 조직중에서 carboxy esterase, phosphatase 및 demethylation 효소의 작용을 받아 분해되는 경로를 제시하였으며 Tomizawa 등⁽³⁸⁾은 S⁸⁵로 표시된 malathion을 벼(Norin #1)에 살포하고 1주일 후 분석시 thiophosphoric acid와 dicarboxylic acid of malathion이 주된 대사 물질 이었다고 보고하고 있다.

또한 Rowlands^(32,33)는 저장중의 옥수수와 밀에서의 malathion의 분해 및 밀 esterase에 의한 malathion의 in vitro 및 in vivo의 산화 및 가수분해에 관하여 보고한바 있다.

그러나 아직까지 벼 esterase에 관하여는 연구발표된바가 없으므로 본 실험에서는 우리나라의 대표적인 벼품종중에서 japonica type에 속하는 관옥 후지사카 5호, 팔달및 수원 82호의 4품종과 indica type에서 IR-262, CP-slo의 2품종을 선정하여 이들이 발아중일때의 조효소액을 만들어 malathion 및 p-nitrophenyl acetate에 대한 가수분해 활성을 비교 검토하고 agar-gel electrophoresis를 행하여 esterase zymogram을 관찰하고 벼 esterase에 관하여 약간의 고찰을 하였기 이에 보고 하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

실험재료

(1) Malathion 가수분해 실험

① 공시품종

a) 관옥(Kwanok)

b) 후지사카 5호(Funjisaka #5)

c) IR-262

d) CP-slo

e) 수원 82호(Suwon #82)

f) 팔달(Paldal)

② 시 약

Ethanol : CaO를 가해 water bath 위에서 3hrs. 환류, 탈수후 증류해서 사용.

CCl₄ : Conc. H₂SO₄, NaOH soln. (1%)로 차례로 세척한후 CaCl₂로 탈수 증류해서 사용.

$\frac{N}{2}$ -KOH-Ethanol soln. : KOH 2.8gr 을 상기 ethanol 100ml에 용해시킴.

2% Bismuth nitrate soln : Bi(NO₃)₃ 2gr을 1 : 4 질산수용액 100ml에 용해시킴.

Triton X-100 : 농촌진흥청에서 분양.

활성 Al₂O₃⁽⁴¹⁾ : 시판 활성 Alumina 200 gr을 증류수 400ml 중에 현탁시키고 conc. HCl 5ml 를 가하고 가끔 교반하면서 2시간 방치함. 이것을 glassfilter 로 흡인 여과하고 methyl orange indicator 로 산성이 없어질때 까지 증류수로 세척하고 다시 Me-OH 300ml로 세척한후 130°C에서 4hrs 건조하고 실온에서 약 1시간 방치함.

1,000ppm Malathion 유제원액 : Silica gel thin-layer plate 위에서 정제한 malathion 을 Me-OH 에 녹이고 TritonX-100 을 유화제로 사용하여 조제하였다.

③ 사용기기

Coleman Universal Spectrophotometer

Beckman DU-2 Spectrophotometer

(2) Esterase 실험

p-Nitrophenyl acetate⁽⁷⁾ : p-nitrophenol 3.5 gr과 acetic anhydride 5cc 를 pyridine 촉매하에 water bath 위에서 2.5hrs 동안 환류하면서 반응시킨 후 포화 Na₂CO₃를 소량씩 가하여 거품을 방지하면서 증화시킨후 Buchner funnel 로 여과하여 건조시킨 후 Me-OH로 2회 재결정시켜 사용함.

α -Naphthyl acetate⁽⁴⁰⁾ : 상기와 유사한 방법으로 α -naphthol 2.4gr과 acetic anhydride 4cc를 pyridine 촉매하에서 반응시켜 합성하고 역시 Me-OH 로 2회 재결정하였다.

(M.P. : 45°C, 문헌치 : 44.8°)

Naphthanil diazo blue B (Fast Blue B salt) : Merck 회사제를 구입함.

Agar gel : Difco agar를 Erogor⁽⁶⁾의 방법으로 정제하였다.

Gel buffer : Tris-HCl (pH7.5) Buffer⁽⁴⁹⁾

Chamber buffer : 0.3M-Boric acid-NaOH Buffer

(pH 8.6)⁽⁴⁹⁾

방 법

(1) Malathion의 가수분해

1) 조효소액 조제(crude enzyme preparation)

상기 공시 품종을 각각 5日間 물에 침지한후 여지 2장씩을 깐 petri dish 위에 놓고 incubator 내에서 받아시켜 25°C에서 5일간 두어 초장이 2~3 cm 된 것을 시료로 사용 하였다.

이 시료들을 화장지 위에서 충분히 습기를 제거한후 10gr 썩을 평량하여 비닐 봉투에넣어 충분히 냉동시킨후 미리냉장고에서 냉각시킨 0.2M-phosphate buffer (pH 7.0)^(45,27) 100ml를 가하여 Waring blender에서 3min 간 마쇄하고 냉동원심 분리기(3°C)에서 12,000rpm으로 30min 간 원심분리하여 그투명한 상등액을 조효소액(crude enzyme)으로 사용하였다. Still⁽³⁷⁾에 의하면 뿌리는 줄기보다 효소작용이 약할것으로 생각되나 균일하게 뿌리도포함 시켰다.

2) Malathion 정량

Malathion 잔류량의 비색정량법인 Norris⁽²⁸⁾의 방법은 너무 번잡하고 불안정 하기 때문에 보다 안정하고 용이한 Yamauchi⁽⁴⁰⁾의 방법을 사용하여 미분해된 malathion 을 표준곡선에 의하여 정량하고 분해되기 전의 malathion 량에서 뺌으로서 분해된 양을 환산하였다.

방법을 보면 우선 미리 조제한 1,000ppm-malathion 유제 1ml, 증류수 10ml, TritonX-100 0.1ml, 효소액 5ml를 대형시험관에 넣어 약 62.5ppm반응액을 만들고 이것을 37°C에서 60min간 incubation 시킨후 5min간 비등수중에 넣어 효소의 活性은 중지 시켰다.

다음 이것을 분액여두에 옮기고 냉각된 10%-TCA 10ml와 위에서 정제한 CCl₄ 25ml를 넣어 격렬하게 20sec.간 진탕한후 CCl₄ 층을 분리하면 malathion의 분해산물은 친수성⁽⁸⁸⁾ 이므로 10%-TCA 수용액층에 남고 CCl₄ 층에는 미분해된 malathion 이 抽出된다. 이때 원심분리를 하여 완전히 분리해야 하나 오차 때문에 분액 여두를 장시간 방치함으로서 완전히 분리시켰다.

이 CCl₄ 층을 다시 분액여두에 옮기고 위에서 정제한 Et-OH 10ml, $\frac{N}{2}$ -KOH-Ethanol solution 2ml를 넣어 20~25°C에서 10min.간 방치한후 증류수 50ml, 2% Bismuth nitrate soln. 1ml를 가하여 20 sec.동안 격렬하게 진탕한후 활성화시킨 Al₂O₃를 미리 1gr씩 충전시킨 column 을 통과 시켜 불순물을 제거하고 Beckman DU-2 Spectrophotometer로

파장 327.5 μ 에서 흡광도를 측정하여 Standard curve에 의해 미분해된 malathion을 정량하였다.

3) 표준곡선

Standard malathion 0.1068gr을 100ml의 mess flask에 정확히 취하고, ethanol을 사용해서 定容으로 한다. 이 용액 10ml를 취해 100ml의 mess flask에 옮겨 ethanol로 定容이되게 하여 이액을 malathion의 표준용액으로 사용하였다. (0.1068mg/ml)

표준용액 10ml를 separatory funnel(250ml)에 취하고, CCl₄ 25ml, 증류수 50ml, 2% Bi(NO₃)₃ 용액 1ml, N/2-KOH 용액 2ml를 순차로 가한후 20秒間 격렬히 진탕한후 CCl₄층을 취하여 波長 327.5 μ 에서 吸光度를 測定하여 遊離 dimethyl dithio phosphoric acid에 의한 量으로 하였다.

다음에 표준용액 2.5ml, 5ml, 7.5ml, 10ml를 各 separatory funnel(250ml)에 취하고 ethanol을 사용해서 全용량을 10ml로 한다.

여기에 N/2-Ethanol性 KOH 용액 2ml를 가하여 서서히 흔들어서 20~25°C에서 2분간 방치한후 여기에 증류수 50ml, CCl₄ 25ml, 2% 硝酸 Bismuth 용액 1ml를 순차로 가하고 20 sec.간 진탕한 후 CCl₄ 층을 취하여 波長 327.5 μ 에서의 吸光度를 측정하고 上記 Blank test의 値를 빼서 全 dimethyl dithio phosphoric acid에 의한 흡광도를 구하고 다시 各各의 全 dimethyl dithio phosphoric acid에 의한 吸光度로부터 대응하는 유리 dimethyl dithio phosphoric acid에 의한 吸光度를 빼서 표준곡선을 作成하였든바(그림 1)과 같다.

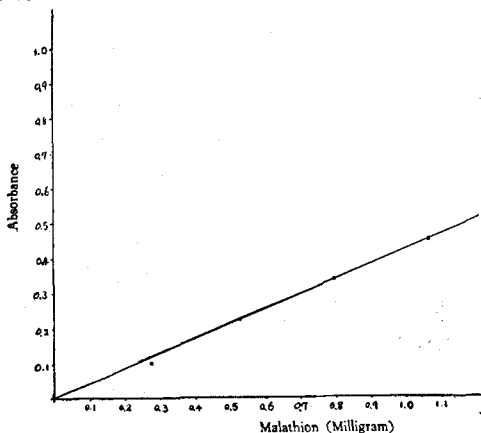


Fig. 1. Standard curve of malathion determination

4) 단백질정량 : 조효소액 0.2ml에 증류수 0.3ml씩을 가하고 Lowry등⁽¹⁷⁾의 방법에 의하여 결정형 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Coleman

Universal Spectrophotometer로 파장 500 μ 에서 정량 하였다.

(2) Esterase 실험

a) Agar-gel plate 제작⁽³⁰⁾ : 비등중인 일정량의 gel buffer (20ml)에 정제된 Difco agar 0.2gr을 녹여 1% 용액으로 만든후 pipette로 2ml씩을 3×1 in. 현미경 slide glass에 균일하게 떨어뜨리면 대략 1mm 두께의 plate가 된다. 이것은 20 min. 후면 사용할수 있으나 충분한 시간 놓아두는것이 전기영동시 streaking을 방지하는데 효과적이다.

b) Electrophoresis: 위에서 제작한 plate의 거의 중앙부에 면도날로 가로 8mm세로 1mm정도의 slit를 만들고 이와같은 크기의 Whatman No. 3 MM filter paper에 효소액을 흡수 시킨후 slit 속에 삽입하고 두꺼운 vinyl로 덮어 증발을 방지하고 열음으로 냉각된 chamber내에서 6°C 이하를 유지하면서 약 220 volts에서 40mA로 90min.간 행하였다

c) Esterase의 염색 및 탈색 : (14,30) 증류수 100ml, 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 10ml, α -naphthyl-acetate stock solution (1% in 50% acetone) 1ml, Triton X-100 0.5ml, naphthanal diazo blue B 100mg을 포함한 액을 petri dish에 넣고 전기영동한 plate를 담가 37°C에서 40min.간 incubation 한후 수도수로 충분히 세척하고 다시 Me-OH : Acetic acid : 증류수 (50 : 10 : 50)용액에 담가 배경을 탈색시켰다.

d) Clearing of Gels⁽²¹⁾ : 보다 선명하게 하기 위하여 순수한 glycerin을 oven내에서 70~80°C로 가열하고 plate를 여기에 20~30 sec.간 담근후 사진을 찍었다.

e) 효소액 : 여기서 사용한 효소액은 (NH₄)₂SO₄로 앞에서 조제한 효소액을 포화시킨후 3,000r.p.m으로 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전은 약간의 0.05M-phosphate buffer (pH 7.0)로 녹여서 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

(3) p-Nitrophenyl acetate의 가수분해

기질로서 50% acetone에 용해된 100 μ M-p-nitrophenyl acetate 2ml와 효소액 3ml를 시험관에 넣고 37°C에서 40min.간 incubation 시킨후 바로 냉장고에 넣어 효소의 작용을 억제시키고 가급적 빨리 490 μ 에서 흡광도를 측정하였다. blank로는 p-nitrophenyl acetate soln. 2ml와 효소액 추출시에 사용한 0.2M-phosphate buffer (pH 7.0) 3ml를 취하여 동일한 방법으로 행하였다.

(4) Malathion에 의한 저해 실험

Triton X-100을 유화제로 사용하여 0.02M-

phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 0.2ppm malathion emulsion에 전기영동용 plate를 37°C에서 30 min.간 incubation 한후 위에서와 같이 naphthanil diazo blue B salt 용액에 담가 37°C에서 40min. 간 incubation 시켜 malathion에 의한 esterase의 저해를 관찰 하였다.

III. 결과 및 고찰

(1) Malathion의 분해

표준곡선에 의하여 분해된 malathion의 량을 환산한 결과는 표 1과 같다.

Table 1. Comparison of malathion decomposed by crude enzymes of rice plant varieties

Varieties	Malathion decomposed (mg/5ml crude enzyme)
1) Kwanok	0.52
2) Fujisaka #5	0.49
3) IR-262	0.50
4) CP-slo	0.48
5) Suwon #82	0.43
6) Paldal	0.46
*7) Control	0.39

* Control은 조효소액 5ml를 5min 간 boiling 하여 불활성으로 함것임.

효소 단백질 배 milligram 당의 malathion 분해 량을 보면 다음 표 2와 같다.

Table 2. Comparison of malathion decomposed in terms of milligram protein among varieties

Varieties	mg. Protein/5ml crude enzyme	Malathion decomposed (mg/mg protein)
1) Kwanok	2.625	0.198
2) Fujisaka #5	3.25	0.151
3) IR-262	2.875	0.174
4) CP-slo	2.75	0.175
5) Suwon #82	2.45	0.176
6) Paldal	2.25	0.204

표 1에서 보는 바와 같이 조효소액 5ml에 대한 malathion의 분해 량이 관옥이 0.52 milligram으로 가장 많은 것으로 보아 분해력의 절대 량이 가장 크다고 볼수있고 수원 82호가 0.43 milligram으로 가장 적은 것은 절대적인 분해능력이 가장 작다고 볼수있을 것이다. 또한 control보다 모두 많은 것은 효소의 작용을 말해 주는 것이다.

(2) Electrophoresis에 의한 isoenzyme의 분리

Agar-gel electrophoresis를 행한 결과는 [그림 2]에서 보는 바와 같다.

[그림 2]에서 보는바와같이 관옥, IR-262, CP-slo, 팔달에서는 anode와 cathode 쪽으로 각기 2개씩 4개의 band가 나타나 있고, 후지사카 5호에서는 B가 없어 3개의 band가 나타나고 수원 82호는 B 하나만이 나타나있다.

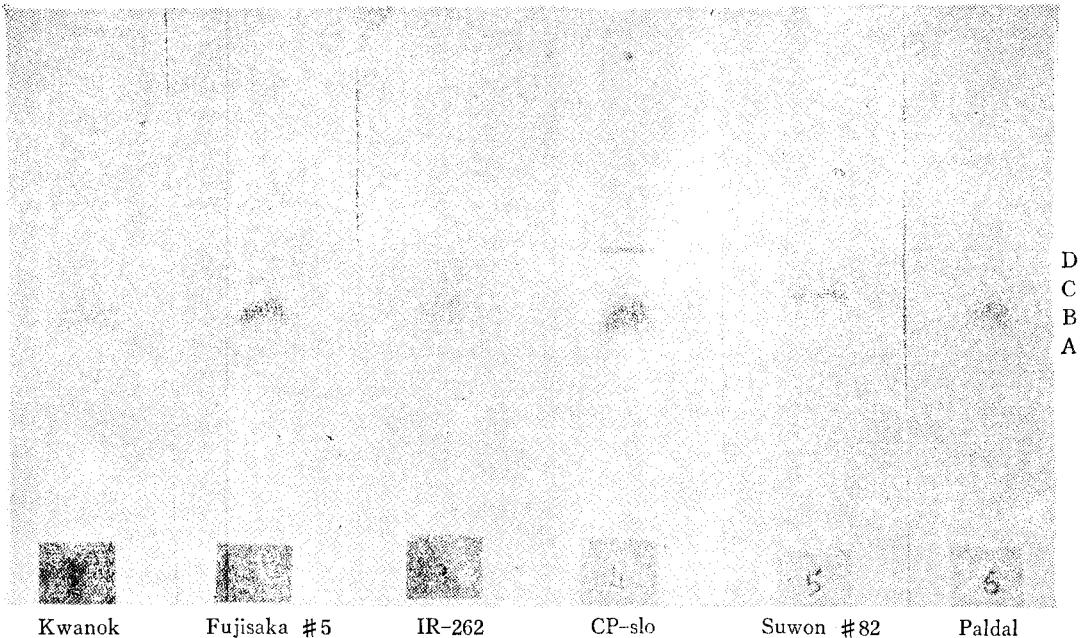


Fig. 2. Electrophoretic patterns obtained with the micro agar-gel method

눈에 띄이는 점은 (-)극으로 굵고 진한 band가 보인다는 점이다. 수원 82호는 앞의 malathion 분해량에서도 가장 적었던 점으로 미루어 보아 band B는 band A와 여러면에서 다른 iso enzyme 이라고 추측된다.

(3) Malathion에 의한 Esterase의 저해

0.2ppm 농도의 malathion 용액에 위에서 전기영동한 plate 를 pre-incubation 한후 다시 위와 동일한 방법으로 esterase 를 검출하였을때 저해됨이

전혀 없었다. 이것으로 보아 저농도의 malathion에 대해서는 저해됨이 없이 malathion을 가수분해하는것으로 생각되며 여기에는 Jooste와 Moreland (15)가 밝힌바와같이 복합 esterase system 이 작용하리라고 추측된다.

(4) p-Nitrophenyl acetate에 대한 효소활성

방향족 ester 기질로서 100 μ M-p-nitrophenyl acetate 를 사용하여 상기조효소액과 반응시킨후의 결과를 보면 표 3과 같다.

Table 3. Enzyme activity with p-nitrophenyl acetate as substrate

Varieties	Absorbance(at 490m μ)	mg protein/3ml enzyme soln.	Absorbance/mg protein
1) Kwanok	0.22	1.575	0.139
2) Fujisaka #5	0.196	1.95	0.101
3) IR-262	0.286	1.725	0.165
4) CP-slo	0.29	1.65	0.175
5) Suwon #82	0.18	1.47	0.122
6) Paldal	0.19	1.35	0.141

표 3에서 indica type에 속하는 CP-slo 와 IR-262가 japonica type의 품종들 보다 방향족 ester에 대한 활성이 큰것을 알수 있으나 Myers (26)에 의하면 방향족 ester는 광범위한 esterase에 의하여 분해됨으로 malathion을 분해하는 효소와 반드시 일치하지는 않는것 같다.

다음에 이들 품종중에서 가장 활성이 강한 CP-slo에 대하여 온도 및 시간에 따른 p-nitrophenyl acetate에 대한 활성을 보면 그림 3과 같다.

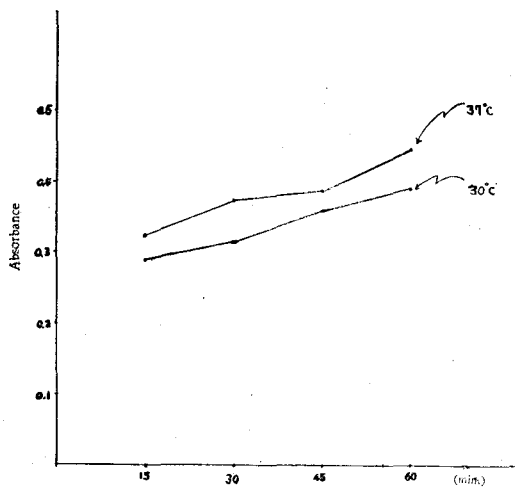


Fig. 3. Activity of esterase in reaction to various temperature. sample: CP-slo

V. 요 약

우리나라에서 재배되고있는 대표적인 수도 품종중에서 japonica type으로 관옥, 후지사카 5호, 팔달, 수원 82호의 4품종과 indica type으로 IR-262 CP-slo의 2 품종을 선정하여 ester형인 유기인계 살충제 malathion과 방향족 ester로서 p-nitrophenyl acetate에 대한 esterase의 활성을 비교해 보고 agar-gel electrophoresis에 의하여 α -naphthyl acetate를 기질로하여 esterase의 zymogram을 관찰한 바를 요약해 보면 다음과 같다.

1. 조효소액(crude enzyme)의 malathion 가수분해 능력을 효소액일정량에 대한 분해된 malathion milligram으로 비교하면 관옥 > IR-262 > 후지사카 5호 > CP-slo > 팔달 > 수원 82호의 순으로 관옥이 가장 활성이 강하고 팔달, 수원 82호가 가장 약하다

2. Esterase zymogram을 보면 품종간에 대차없이 3~4개의 band가 두극으로 움직이며 cathode로 특히 굵고 진한 band가 있고 수원 82호는 다른 품종과 약간 다른 pattern을 보였다.

3. p-Nitrophenyl acetate를 기질로 할때 매 milligram 단백질당의 흡광도로 활성을 비교하면 CP-slo > IR-262 > 팔달 > 관옥 > 수원 82호 > 후지사카 5호의 순으로 indica type의 품종이 훨씬 활성이 강하나 malathion 경우와 일치하지는 않는다.

4. 0.2ppm 정도의 malathion으로 벼의 esterase는 별로 저해 되지 않았다.

5. 발아중인 벼종자에는 malathion과 p-nitrophenyl acetate를 가수분해하는 복합 esterase가 존재할 것으로 추측된다.

참 고 문 헌

- 1) Aldridge, W.N.: *Biochem. J.* **53**, 110 (1953)
- 2) Allen, J.M. & Hunter, R.L.: *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 50 (1960)
- 3) Augustinsson, K.B.: *Nature* **181**, 1786 (1958)
- 4) idem: *Acta. Chem. Scand.* **13**, 571 (1959)
- 5) idem: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 844 (1961)
- 6) F. Bergmann, F. Segal and S. Rimón: *Biochem. J.* **67**, 481 (1957)
- 7) Cram and Hammond: *Organic Chemistry*, p. 309(McGraw Hill Book Company, Inc., New York 1959)
- 8) Erogor, A.H., Valchabov, A.K. H.: *J. Chromatog.* **46**, 143 (1970)
- 9) Frankel, T.N., Garber, E.D.: *Botan. Gaz.* **126**, 221 (1965)
- 10) Gomori, G.: *J. Lab. Clin. Med.*, **42**, 445(1953)
- 11) B.H.J. Hofstee, *The Enzymes*, Vol. 4, p.485 (Ed. by P.D. Boyer, H. Lardy and K. Myrbäck, Academic Press Inc., New York, 1960)
- 12) E.F. Jansen, R. Jang and L.R. MacDonnell: *Arch. Biochem.* **15**, 415 (1947)
- 13) E.F. Jansen, M-D.F. Nutting and A.K. Balls: *J. Biol. Chem.* **175**, 975 (1948)
- 14) J.V.d.W. Jooste and D.E. Moreland: *Nature* **195**, 907 (1962)
- 15) idem: *Phytochemistry* **2**, 263 (1963)
- 16) Kaufman, S., Schwert, G.W. and Neurath, H.: *Arch. Biochem.* **17**, 203 (1948)
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* **193**, 265(1951)
- 18) L.R. MacDonnell, R. Jang, E.F. Jansen and H. Lineweaver: *Arch. Biochem.* **28**, 260 (1960)
- 19) MacRae, H.F., Randall, C.J.: *Can. J. Biochem.* **43**, 1779 (1965)
- 20) C.L. Markert and R.L. Hunter: *J. Histochem. and Cytochem.* **7**, 42 (1959)
- 21) Marsh, C.L., C.R. Jollitt and L.C. Payne: *Amer. J. Clin. Pathol.* **41**, 217
- 22) C.E. Mendoza, D.L. Grant and K.A. McCully: *J. Agr. Food Chem.* **17**, 623 (1969)
- 23) Metcalf et al.: *Econ. Entomol.*, **49**, 194(1956)
- 24) L.A. Mounter: *J. Biol. Chem.* **209**, 813(1954)
- 25) L.A. Mounter and M.E. Mounter: *Biochem. J.* **85**, 576 (1962)
- 26) D.K. Myers, *The Enzymes* **4**, p.475 (Ed. P.D. Boyer, H. Lardy and R. Myrbäck, Academic Press, New York, 1960)
- 27) M.J. Norgard and M.W. Montgomery: *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 587-596 (1968)
- 28) Norris, M.V., Vail, W.A. & Averell, P.R.: *J. Agr. Food Chem.* **2**, 570 (1954)
- 29) O'Briem: *J. Econ. Entomol.* **52**, 1063 (1959)
- 30) J. Paul & P. Fottrell: *Biochem. J.* **78**, 418 (1961)
- 31) Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press, New York, 1961
- 32) D.G. Rowlands: *J. the Science of Food & Agriculture* **15**, 824 (1964)
- 33) idem: *ibid.* **16**, 325 (1965)
- 34) D. Schwartz: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **46**, 1210 (1960)
- 35) H.M. Schwartz, S.I. Biedron, M.M. von Holdt and S. Rehm, *Phytochemistry*, **3**, 189 (1964)
- 36) A. Sosa & C. Sannie: *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris* **26**, 457 (1944)
- 37) Gerald, G. Still: *Science* **159**, 992-993 (1968)
- 38) Chojiro Tomizawa & Toshiro Sato: *Japanese Appl. Entomol. Zool.* **6**, 70 (1962)
- 39) Yakulis, V.J., Gibson, C.W. and Heller, P.: *Am. J. Clin. Pathol.*, **38**, 378-382 (1962)
- 40) Masao Yamauchi, Fumitaka Tanaka: *Botyukagaku* **30**, 18 (1964)
- 41) Masao Yamauchi: *ibid.* **31**, 67 (1966)