

Papaya Latex에 있는 蛋白質分解酵素들의 熱不活性에 관하여

노 봉수* · 박 관화

서울대학교 농과대학 식품공학과

*동서식품주식회사 개발실

(1980년 6월 14일 수리)

Heat Inactivation of Proteolytic Enzymes in Papaya Latex

Bong Soo Noh*, Kwan Hwa Park

Department of Food Technology, College of Agriculture, Seoul National University, Suwon

*Dong Suh Foods Corporation, Incheon

(Received June 14, 1980)

Abstract

Proteases from papaya latex were partially purified by ammonium sulfate precipitation and separated into two fractions (Fraction I and II) by carboxymethyl cellulose column chromatography. Each fraction, mixture of the two fractions, and crude extract of the papaya latex at pH 7.0 were inactivated at the range of 60~90°C and thermal properties of the enzymes were investigated. In the thermal inactivation of fraction I, the enthalpy of activation was 89.5 kJ/mol; the entropy of activation, -44.0 J/mol·K; the free energy of activation, 104.6 kJ/mol; z-value, 25°C. For fraction II, the enthalpy of activation was 96.5 kJ/mol; the entropy of activation, -22.0 J/mol·K; the free energy of activation, 104.0 kJ/mol; z-value, 23°C. For the mixture of fraction I and II, the enthalpy of activation was 90.9 kJ/mol; the entropy of activation, -38.8 J/mol·K; the free energy of activation, 104.2 kJ/mol; z-value, 24.6°C. For crude extract, the enthalpy of activation was 113.8 kJ/mol; the entropy of activation, 22.0 J/mol·K; the free energy of activation, 106.2 kJ/mol; z-value, 23.2°C. It was indicated that the fraction I was more heat-stable than the fraction II and this suggested that the thermal stability of the proteases in papaya latex is probably due to the fraction I.

서 론

파파이아 라텍스(papaya latex)에 존재하는 파파인(papain)이나 카이모파파인(chymopapain)같은 단백질분해효소는 식품공업뿐만 아니라 의약품, 화장품, 섬유공업에도 널리 사용되고 있다.

파파이아 라텍스로부터 분리한 단백질분해효소인 파파인과 카이모파파인은 열안정성이 비교적 크다고 알려져 있어⁽¹⁾ 이러한 성질을 이용하여 맥주의 저온혼탁(chill haze)을 방지하기 위한 단백질분해효소로써

사용하고 있다. 특히 저온살균 과정후에도 상당한 역가가 유지되어야 하는데 파파인과 같은 열안정성이 높은 효소가 바람직한 것으로 알려져 있다.

Cayle등⁽²⁾은 파파이아 라텍스에서 분리한 효소를 이용하여 맥주의 혼탁방지(chill proofing)효과에 대한 실험을 하였고 최근에는 spherosile에 고정화시킨 파파인으로 맥주의 혼탁을 방지하는 연구보고도 있다⁽³⁾. 한편 파파인은 피신(ficin), 브로멜린(bromelain) 및 그 밖의 프로테아제(protease)들과 더불어 연육소로써 많이 이용되고 있는데 Kang등⁽⁴⁾은 브로멜린, 콜라게나아제(collagenase), 피신, 파파인, 로자임(rhozyme

p-11), 트립신(trypsin)처리에 의한 牛肉筋蛋白質의 용해율에 대해서 실험한 결과 파파인처리가 가장 우수하였다는 것을 인정하였다. 맥주공업에서 뿐만 아니라 연육소로 사용되는 과정에서 고기에 효소를 처리한 후 요리할 때 60~70°C의 온도가 되면 이러한 온도에서 효소에 의한 연육과정이 이루어져야 함으로 열에 안정한 효소가 요구되고 있다. 이러한 관점에서 볼때 파파이아 프로테아제(papaya protease)의 열안정성은 매우 중요한 의미를 가지며 따라서 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다. Ebata등⁽⁵⁾은 파파이아 라텍스로부터 카이모파파인을 분리하여 열안정성에 관한 실험을 하였고 Kang등⁽⁶⁾은 파파이아 라텍스에서 얻은 단백질분해효소를 이용하여 육류 조리시에 효소역가 감소를 측정하였다.

이와 같이 순수하게 분리한 효소에 대한 실험과 함께朴등⁽⁷⁾은 열처리할때의 주위의 환경요인을 고려하여 파파야열대로부터 얻은 조추출액(crude extract)의 열 불활성에 관한 실험을 하였다.

이러한 조추출액과 순수 분리한 각각의 효소의 열 불활성 정도는 서로 다를 것이 예상되며 조추출액의 열저항성에 기여하는 정도를 분석할 수 있으리라 예상된다. 본 실험에서는 먼저 조추출액을 carboxymethyl cellulose column에 통과시켜 카이모파파인과 파파인으로 생각되는 fraction으로 분리한다음 각각에 대해 열처리 실험을 하고 이어 두 분획의 효소를 동일하게 혼합하여 실험한 것과 조추출액의 열불활성 실험을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

재 료

파파이아 라텍스 : 공업용(Columbia産)으로 조선맥주에서 수입한 것을 사용하였다.

CM-cellulose: 독일 Serva社 제품으로 capacity는 0.8mEg/g이었다.

방 법

단백질 분해 효소의 역가 측정

가. 용액의 조제

카제인(casein)용액 : 1.2g의 카제인과 5N NaOH 0.5ml를 증류수 100ml에 혼합한 다음 90°C에서 15분간 가열하여 녹인 후 냉각시킨 다음 0.1M 인산 완충용액(pH 7.0)으로 2배 희석하여 37°C로 유지시켜 사용하였다. activator로는 0.02M EDTA를 함유하는 0.1M 인산 완충 용액(pH 7.0)에 0.08M NaCN을 첨가하였으며 역가를 측정할 때마다 즉시 만들어 사용하였다.

단백질 침전 시약 : 0.11M CCl₃COOH, 0.22M CH₃COONa, 0.33M CH₃COOH를 혼합하여 1l로 하여 사용하였다.

나. 측정

열처리한 효소액 1ml에 activator용액 0.4ml를 가하여 10분간 방치한 후 기질 용액 5ml와 혼합하여 20ml들이 시험관에 넣은 후 37°C에서 교반하면서 15분동안 반응시켰다. 이 반응액에 단백질 침전시약 5ml를 가하여 효소반응을 중지시켰다. 37°C에서 20분간 방치하여 침전시킨 후 여과시켰다. 이 여과액 1ml에 0.55M NaCO₃용액 5ml와 Folin시약(3배 희석액) 1ml를 가하여 20분동안 발색시킨 후 분광광도계(Spectronic 20A, Bausch & Lomb)를 써서 660nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 효소용액을 먼저 100°C에서 30분 가열한 후 activator용액 0.4ml를 넣고 10분간 방치한 후 단백질 침전 시약을 넣고 20분 후에 기질 용액을 넣은 후 여과하였다. 이때 단위시간당 반응 생성물에 의한 흡광도의 변화(ΔE/Δt)를 효소의 역가로 하였다.

효소의 정제

가. 추출 및 (NH₄)₂SO₄ 염석

파파이아 라텍스 2.5g를 유발에 넣고 다색시켜 0.1M 인산 완충 용액(pH 7.0) 200ml에 가하고 5~6시간 동안 침지시킨다음 여지(Toyo No.2)로 여과하였다. 여액에 (NH₄)₂SO₄를 사용하여 0.45포화용액을 만들고 4°C, 20,000×g에서 원심 분리한 후 상등액에 0.5N HCl를 가하여 용액을 pH 2.0로 하였다. 생성된 침전물을 제거하고 상등액에 (NH₄)₂SO₄를 넣어 0.65포화용액으로 한다음 침전을 분획채취하였다.

나. 투석(Dialysis)

침전물을 0.02M acetate buffer(pH 5.0)에 녹인 후 동일한 완충용액(0.001M EDTA 포함)에서 18시간동안 투석하였고 6시간마다 완충용액을 갈아 주었다.

다. Carboxymethyl cellulose column chromatography

투석하여 얻은 효소용액을 미리 0.02M acetate buffer(pH 5.0)로 평형시켜 놓은 CM-cellulose column(30×1.5cm)에 주입시키고 0.02M, 0.1M, 0.7M acetate buffer(pH 5.0)를 유속 20ml/hr의 속도로 단계적으로 흘려보낸다음 최종적으로 1M acetate buffer(pH 5.0, 1M NaCl 포함)를 흘려보냈으며 10ml씩 분획하였다. 이때 1M acetate buffer에서 분획된 것은 다시 투석하여 측정하였다.

라. Polyacrylamide gel 전기영동

Reisfeld의 방법⁽⁸⁾을 이용하여 7.5% acrylamide 농도를 가진 gel(pH 4.3)을 0.5×10cm 유리관에 길이

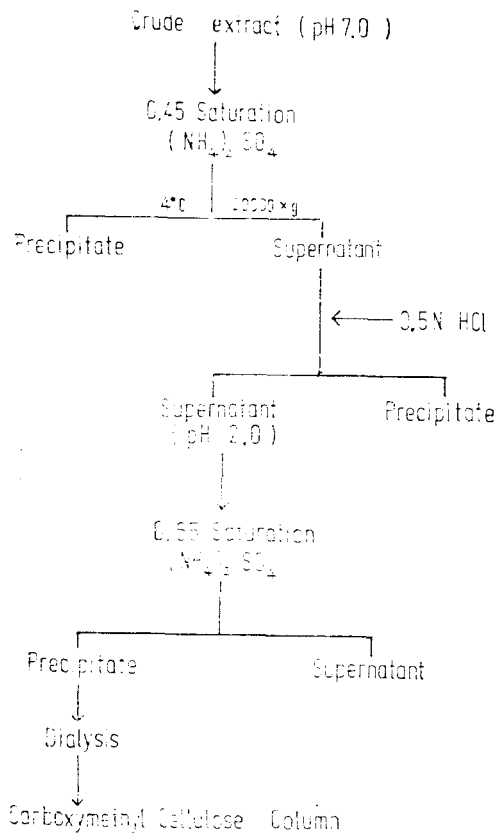


Fig. 1. Schematic diagram for purification of fraction I

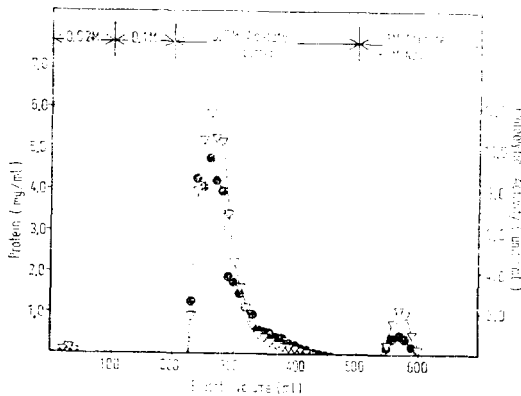


Fig. 2. Chromatography of the dialyzed ammonium sulfate precipitate (0.45 to 0.65 saturation) on carboxymethyl cellulose. 0.46 g of protein were chromatographed on a 1.5 x 30 cm column. Fractions of 10 ml were collected.
 △—△ protein, ●—● proteolytic activity

7 cm로 주조하였다. 음극, 양극에는 각각 β -alanine-acetic acid buffer (pH 4.5) 350 ml를 사용하여 3 시간동안 먼저 pre-electrophoresis를 행하였고 pre-electrophoresis 후 β -mercaptoethanol(0.05M) 존재 하에서 1.5시간 동안 전기영동을 행하였다. gel의 염색은 0.25% Coomassie blue(Bio-Rad)용액을, 탈색에는 7% acetic acid용액을 사용하였다.

마. 효소용액의 열불활성

효소용액의 열처리하는 Levine의 "Flask method"의 원칙을 변조한 방법을 사용하였다⁽¹⁰⁾.

근 三口 flask에 15 ml의 완충 용액을 넣고 열처리 하고자 하는 온도까지 도달하게 한 후 자석식 교반기로 격렬히 교반하면서 5 ml의 효소용액을 가하고 일정시간 후에 피펫으로 1 ml를 취하여 미리 얼음으로 냉각시켜 놓은 시험관에 옮겨 냉각시켰다.

결과 및 고찰

Carboxymethyl cellulose column chromatography

Fig. 3은 $(NH_4)_2SO_4$ 0.45~0.65포화용액 분획물을 CM-cellulose column에 단계적으로 chromatography 한 결과이다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 3개 단백질 peak를 얻었다. 첫째 peak는 0.02M acetate buffer로 용출한 부분에서 미세하게 나타났으나 단백질 분해능력은 나타나지 않았다. 대부분의 단백질이 0.7M acetate buffer로 용출한 부분에서 나타났는데 이 부분을 fraction I (F-I)이라 칭하고 F-I의 단백질 회수율은 76%이었다. 단백질 분해능력은 단백질 용출곡선과 거의 일치하였다. 세번째 peak는 1.0 M acetate buffer로 용출시킨 부분에서 나타났는데 단백질 분해역가를 가졌다. 이 부분을 fraction II (F-II)로 정하였다. 시료 2.5 g 으로부터 얻은 분리 과정의 결과는 Table 1에 수록하였다.

Polyacrylamide gel 전기영동

Fig. 2의 peak중 단백질 분해역가가 있는 F-I, F-II를 Reisfeld system⁽⁹⁾으로 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같다.

B는 파파이야 라텍스에서 함량이 가장 많은 카이모파파인으로 생각되는데 Ebata등⁽⁵⁾에 의하면 본 실험과 유사한 조건하에서 F-I에 lysozyme이 포함되어 있다고 하였으며 Cayle등⁽²⁾은 lysozyme의 band가 카이모파파인의 바로 윗부분에 나타난다고 보고 하였다.

본 실험에서 F-I에 band가 넓게 나타난 것은 카이모파파인 외에 lysozyme에 기인한 것일 수도 있겠다.

Table 1. Partial purification of fraction I

| Fraction | Volume (ml) | Protein (mg/ml) | Activity (unit/ml) | Specific activity (unit/mg) | Total activity (unit) | Yield (%) |
|---|-------------|-----------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------|
| Crude extract | 179 | 7.83 | 12.6 | 1.61 | 2255.4 | 100 |
| Supernatant of 0.45 saturation of (NH ₄) ₂ SO ₄ at pH 7.0 | 200 | 7.086 | 9.0 | 1.27 | 1800 | 79.8 |
| Precipitate of 0.65 saturation of (NH ₄) ₂ SO ₄ at pH 2.0 | 20 | 22.96 | 24.6 | 1.07 | 492 | 21.8 |
| Carboxymethyl cellulose | 92 | 3.239 | 5.389 | 1.66 | 495.78 | 22.0 |



Fig. 3. Reisfeld system electrophoresis pattern at pH 4.3 on 7.5% polyacrylamide gel of the selected fraction in Fig. 2 A, crude extract ;B, fraction I; C, fraction II.

한편 Ebata는 F-II가 파파인이라고 한데 비해 Cayle 은 파파인이 카이모파파인보다 분자량이 적고 상대적 移動度를 보면 카이모파파인 > lysozyme > 파파인의 순 으로 카이모파파인이 훨씬 빨리 이동하여 카이모파파인 보다 훨씬 윗쪽에 나타난다고 하였다. Kang등⁽⁶⁾도 파 파인이 카이모파파인보다 위에 나타나며 카이모파파인 보다 아래쪽에는 파파이야 펩티다아제 A(papaya pep-

tidase A)의 band가 나타난다고 보고하였다. F-II는 移動度로 미루어보면 파파이야 펩티다아제 A라고도 생각될 수 있다.

열 불활성화

CM-cellulose column에서 얻은 2개의획분을 각각 열 불활성 실험을 하고 이어 두획분의 효소용액을 혼합하여 실험한 것과 조 추출액의 열 불활성 실험을 하여 얻은 결과는 다음과 같다. 열처리 온도 60~90°C 사이에서의 F-I의 잔류역가를 시간에 따라 표시한 열 불활성 곡선은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 각 온도 에서 꺾여지는 점을 보여주고 있다.

Fig. 4에서 D-value를 구하고 (Table 2) 이들을 온 도에 따라 그린 결과는 Fig. 5와 같다.

다시 Fig. 5로부터 z-value를 구하고 Table 2에 적었

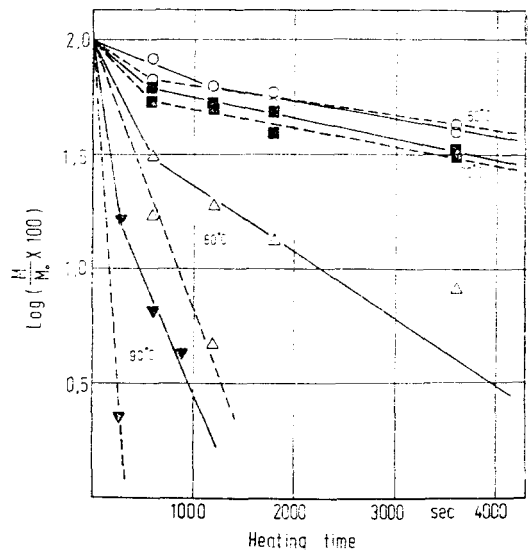


Fig. 4. Thermal inactivation of fraction I and II at various temperature in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 Fraction I (—) and fraction II (---) M : enzyme activity at heating time, t M₀ : enzyme activity at zero heating time

Table 2. First order reaction rate constants and D-values for inactivation of proteases from papaya latex

| Heating temperature(C) | D-value(sec) | | | | Reaction rate constants, k(sec ⁻¹ ·10 ⁴) | | | |
|------------------------|--------------|------|----------------|--------------|---|-------|----------------|--------------|
| | F-I | F-II | Mixture (I&II) | Papaya latex | F-I | F-II | Mixture (I&II) | Papaya latex |
| 60 | 6200 | 3671 | 6857 | 8000 | 3.71 | 6.27 | 3.36 | 2.8 |
| 70 | 2728 | 2234 | 2386 | 4857 | 8.44 | 10.31 | 9.65 | 4.7 |
| 80 | 1157 | 871 | 1314 | 1914 | 19.91 | 16.42 | 17.5 | 12.0 |
| 90 | 360 | 180 | 342 | 400 | 63.97 | 127.0 | 67.3 | 57.5 |
| z-value(°C) | 25 | 23 | 24.6 | 23.2 | | | | |

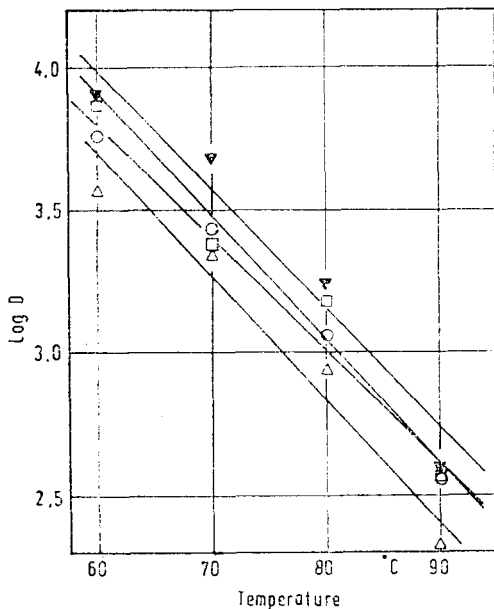


Fig. 5. Thermal destruction curve for inactivation of proteases from papaya latex
 ○—○ : fraction I, △—△ : fraction I and II
 □—□ : mixture of fraction I and II
 ▲—▲ : papaya latex

다. 열 불활성 반응의 reaction rate constant는 $k = 2.303/D$ 의 관계식에 의하여 구하였으며 절대 반응 속도 이론에 의거한 열역학적인 값은 Eyring의 방법⁽¹¹⁾에 의하여 Fig. 6과 같이 plot한 후 산출하여 Table 3에 기술하였다.

Fig. 4에서는 fraction II의 열 불활성화 곡선을 보여 주고 있다. F-II의 경우 60~70°C에서는 F-I과 마찬가지로 효소의 역가가 열 처리 시간에 따라 지수 함수적으로 감소되지 않고 꺾여지는 점을 볼 수 있다. 즉, 열 불활성 속도가 초기에는 빠르나 일정한 열처리 시간 후 갑자기 완만해지고 따라서 長時間 열처리 후

에도 활동적인 효소가 남아 있다는 것이다.

이는 효소의 불활성화가 1 차반응을 따르고 있지 않음을 시사하는 것으로 sweet corn peroxidase^(12,13) lipoixdase⁽¹⁰⁾등에서도 이와 같은 경향을 볼 수 있다 Lund⁽¹⁴⁾는 열저항성이 큰 isoenzyme의 열 불활성화 곡선이 한점(절편값)에서 만날 경우에 속도상수를 간단히 계산할 수 있는 식을 제시하였으나 본 실험의 경우 완만한 부분의 연장선이 한점에서 만나지 않아 적용할 수 없었다. 한편 파파이야 카탈라아제(papaya

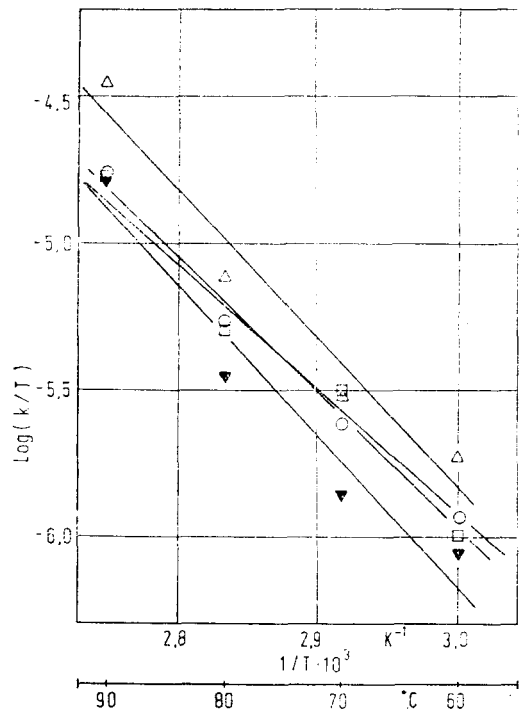


Fig. 6 Inactivation rate constant of protease from papaya latex as a function of temperature
 ○—○ : fraction I, △—△ : fraction I and II
 □—□ : mixture of fraction I and II
 ▲—▲ : papaya latex

Table 3. Thermodynamic quantities for inactivation of proteases from papaya at 70°C

| ΔH* (kJ/mol) | | | | ΔG* (kJ/mol) | | | | ΔS* (J/mol·K) | | | |
|--------------|------|------------------|--------------|--------------|-------|------------------|--------------|---------------|-------|------------------|--------------|
| F-I | F-II | Mixture (I & II) | Papaya latex | F-I | F-II | Mixture (I & II) | Papaya latex | F-I | F-II | Mixture (I & II) | Papaya latex |
| 39.5 | 96.5 | 99.9 | 113.8 | 104.6 | 104.0 | 104.2 | 105.2 | -44.0 | -22.0 | -38.8 | 22.0 |

catalase)⁽¹⁵⁾, 파파이야 인베르타아제(papaya invertase)⁽¹⁶⁾에서는 한 점에서 만나지 않았지만 각기 열 저항성이 다른 isoenzyme에 의한 것이라고 꺾여지는 관계를 설명하고 있다. 본 실험에서 비교적 순수하게 분리되었다고 생각되는 F-I 과 F-II에서 각각 꺾여지는 점을 보인 것으로 보아 이는 isoenzyme說로 설명할 수 없으며 aggregate說로 설명이 가능함을 시사하고 있다.

Table 2에는 F-II의 열 불활성화 곡선에서 얻은 D-value와 z-value를 표시하였다. Table 3에는 열역학적인 값을 수록하였다. F-I의 z-value는 25°C이고 F-II의 z-value는 23°C로써 비교적 높은 값을 보여주고 있다. 60°C에서 F-I의 D-value가 6200초인 반면 F-II는 3371초이고 90°C에서는 각각 330초 및 180초로 F-I이 F-II보다 열 저항성이 크다는 것을 보여주고 있다.

Kang⁽⁶⁾에 의하면 파파인은 75°C, pH 7.0에서 30분간 처리하였을 때 30% 정도의 역가가 잔존하였다고 보고하였다. 파파이야 펩티다아제 A 경우는 50% 정도의 감소를 보인 반면 카이모파파인⁽⁶⁾은 75°C, pH 7.2에서 75분 처리하였을 때 50%의 감소를 보여 주어 파파인이나 파파이야 펩티다아제 A 보다는 카이모파파인이 열에 안정하다고 하였다. 본 실험에서는 카이모파파인이라 생각되는 F-I을 70°C에서 20분간 처리하였을 때 40% 감소하였다. 지금까지 보고된 것보다는 카이모파파인의 열안정성이 약간 저하된 것으로 보이나 이는 실험 조건이 서로 동일하지 않은 까닭으로 보여진다.

F-I과 F-II를 같은 비율(역가를 동일하게 함)로 혼합한 효소용액의 열 불활성화는 대체로 F-I의 경우와 비슷한 경향을 보였는데 이는 Table 2에서 z 및 D-value를 비교하여 보면 알 수 있다.

한편 정제하기 전 파파이야 라텍스의 열불활성화와 비교하여 보면 두 fraction을 혼합하여 처리한 것과 비슷한 경향을 보여주고 있다(Table 2참조). D-value는 60°C에서 8000초로 F-I의 6200초보다 높고 90°C에서도 330초보다 약간 높은 400초이나 대체로 보아 F-I과 비슷하다고 볼 수 있다.

이로써 주 함량인 동시에 열 저항성도 강한 카이모

파파인의 열 불활성화가 파파이야 조 추출액의 열 불활성정도에 큰 영향을 미친다고 볼 수 있다.

차등⁽⁷⁾은 파파이야 조 추출액의 z-value가 29°C로 비교적 큰 것으로 나타났으나 D-value를 보면 60°C에서 5490초로 파파이야 라텍스의 8000초에 비하면 훨씬 떨어지는데 이는 라텍스가 아닌 열매 자체를 분말로 하여 실험하였으므로 실험조건이 다른 데서 기인한 차이라고 생각된다.

요 약

파파이야 라텍스를 (NH₄)₂SO₄ 분획 및 CM-cellulose column을 통과시켜 두개의획분으로 분리하고 각 획분 별로 pH 7.0, 60~90°C에서 열 불활성 실험을 행하고 다음과 같은 열역학적인 자료를 얻었다.

1. fraction I의 z-value는 25°C이었고 70°C에서 활성화 엔탈피(enthalpy of activation) 89.5 kJ/mol, 활성화엔트로피(entropy of activation) -44.0 J/mol·K, 활성화 자유 에너지(free energy of activation) 104.6 kJ/mol이었다.

2. fraction II의 z-value는 23°C이고 70°C에서 활성화 엔트로피 -22.0 J/mol·K, 활성화 자유 에너지 104.0 kJ/mol이었다.

3. fraction I과 fraction II를 혼합한 경우의 z-value는 24.6°C, 70°C에서 활성화 엔탈피 90.9 kJ/mol, 활성화 엔트로피 -38.8 J/mol·K, 활성화 자유에너지 104.2 kJ/mol이었다.

4. 조 추출액의 z-value는 23.2°C이고 70°C에서 활성화 엔탈피 113.8 kJ/mol, 활성화 엔트로피 22.0 J/mol·K, 활성화자유에너지 105.2 kJ/mol이었다.

이상의 결과에서 fraction I이 fraction II보다 열에 안정하다고 볼 수 있었고 파파이야 라텍스에 있는 단백질 분해 효소의 열 안정성은 주로 fraction I에 기인하는 것을 알 수 있었다.

문 헌

1. Jansen, F. F. and Balls, A. K.: *J. Biol. Chem.*, **137**, 459 (1941)

2. Cayle, T., Saletan, L. T. and Lopez-Ramos B.: *Wallerstein Lab. Comm.*, **27**, 87 (1964)
3. Monsan, P., Duteurtre, B., Moll, M. and Durand, G.: *J. Food Sci.*, **43**, 424 (1978)
4. Kang, C. K. and Rice, E. E.: *J. Food Sci.*, **35**, 563 (1970)
5. Ebata, M. and Yasunobu, K. T.: *J. Biol. Chem.*, **237**, 1086 (1962)
6. Kang, C. K. and Warner, W. D.: *J. Food Sci.*, **39**, 812 (1974)
7. 박관화, 김재옥, 신재두, 노봉수: 한국식품과학회지, **11**, 171 (1979)
8. Kalckar, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 461 (1947)
9. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E.: *Nature (London)*, **195**, 281 (1962)
10. Park, K. H.: Dissertation, University of Karlsruhe, Germany (1976)
11. Joffe, F. M. and Ball, C. O.: *J. Food Sci.*, **27**, 587 (1962)
12. Yamamoto, H. Y., Steinberg, M. P. and Nelson, A. I.: *J. Food Sci.*, **27**, 113 (1962)
13. Chenchin, E. E. and Yamamoto, H. Y.: *J. Food Sci.*, **38**, 40 (1973)
14. Lund, D. B. and Ling, A. C.: *J. Food Sci.*, **43**, 1307 (1978)
15. Chan, H. T. Jr., Tam, S. Y. T. and Koide, R. T.: *J. Food Sci.*, **43**, 989 (1978)
16. Chan, H. T. Jr. and Kwok, S. C. M.: *J. Food Sci.*, **41**, 320 (1976)