

## 담배 현탁배양 세포로부터 $\beta$ -1,4-endoglucanase의 정제 및 성질

李榮美 · 康政勳 · 趙暎東

(延世大學校 理科大學 生化學科)

### Purification and Properties of $\beta$ -1,4-endoglucanase from Tobacco Suspension Cultured Cells

Lee, Young Mee, Jung Hoon Kang and Young Dong Cho

(Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul, Korea)

#### ABSTRACT

$\beta$ -1,4-endoglucanase (EC 3,2,1,4) was isolated and purified from *Nicotiana tabacum* L. Var. Virginia 115 suspension cultured cells. The molecular weight as estimated by Sephadex G-100 was about 14,000. The optimum pH for activity was 5.4. The Km value for carboxymethyl cellulose was 0.18 mg/unit and the enzyme was quite resistant to heating. Polyamine did not affect the activity of  $\beta$ -1,4-endoglucanase *in vitro* but the activity increased drastically when polyamines were added in the suspension culture medium. It is suggested that increase in  $\beta$ -1,4-endoglucanase activity due to polyamine might be related to growth of the plant.

#### 서 론

식물세포에서의 세포벽의 자가분해현상은 1967년에 Lee등에 의해 옥수수 떡잎 집에서 처음 관찰되었으며(Lee *et al.*, 1967), 이것은 식물이 성장할 때 세포벽의 강성률을 감소시켜 느슨하게 하는 현상으로 이해되어 왔고, 식물 성장호르몬인 IAA에 의한 길이 생장도 자가분해에 의해 세포벽의 느슨한 정도를 촉진시키기 때문인 것으로 알려졌다(Seara *et al.*, 1984; Cho *et al.*, 1988). 일반적으로 자가분해는 세포벽에 존재하는 여러가지 탄수화물 분해효소에 의해 일어나며, 이러한 탄수화물 분해효소들은 세포의 성장이나 분화의 조절에 중요한 역할을 담당하여 과일성숙(Ben-Arie *et al.*, 1979), 씨의 발아 (Ballance *et al.*, 1976), 세포팽창(Ridge and Osborne, 1969), 잎의 탈리 (Lewis and Varner, 1970), 꽃가루관의 길이성장(Roggen and Seanley, 1969), 맥관의 분화 (Sheldrake, 1970)등에 관계되어 있음이 보고되었다.

세포벽을 분리하여 배양시키면, 자가분해에 의해 올리고당류 및 단당류가 용액내로 방출되는데, 이렇게 방출되는 당들은 그 구성성분에 있어서 쌍자엽식물과 단자엽식물이 각기 차이를 보인다. 이 차이는 두 식물간의 기질구성이 다르기 때문인데(McNeil *et al.*, 1984; Taiz, 1984), 단자엽식물에서 주로 자가분해가 일어나는 세포벽성분은  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-glucans, glucur-

본 연구는 1988년도 문교부 기초과학 연구소 학술 연구 조성비 지원에 의한 것임.

onoarabinoxylans, xyloglucans 등이며, 쌍자엽식물의 경우는, polyuronides, galactans, arabinogalactaus, xyloglucans 등으로 알려져 있다. 이 중, 단자엽식물의  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-glucans, xyloglucans 및 쌍자엽식물의 xyloglucans에 주로 작용하는 효소는  $\beta$ -1,4-glucanase로 eudoglucanase와 cxoglucanase의 두가지 형태가 존재한다(Hurber and Nevins, 1981). 1981년에 Koyama 등은 성장 초기의 대두 하배측에서 xyloglucan이  $\beta$ -1,4-endoglucanase에 의해 커다란 조각으로 분해되고, 이것들은 다시 세포의 길이성장 동안 다른 효소들의 작용에 의해 단당류로 분해된다고 하였으며(Koyama *et al.*, 1981), 1987년에 Hatfield와 Nevins는 옥수수에서 분리된 eudoglucanase가  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-glucans에 높은 특이성을 보이거나(Hatfield and Nevins, 1987), 쌍자엽식물인 완두에서,  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 주요 반응물은, xylo-glucans임을 관찰한 외에도(Labrador and Nicolas, 1984) 쌍자엽 및 단자엽식물에서  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 반응물 특이성에 대한 많은 연구들이 수행되었다(Kato and Nevins, 1984; Lutteneggcr and Nevins, 1985). 쌍자엽식물 및 단자엽식물에서 xyloglucan을 분해하여 자가분해에 관여하는  $\beta$ -1,4-endoglucanase를 정제하여 그 작용양상이나 효소학적 특성을 규명하고자하는 연구는 1980년대에 와서 Huber와 Nevins에 의해 시작되었는데 (Huber and Nevins, 1981; Hatfield and Nevins, 1986), 이와같은 연구들은 탄수화물 분해효소들의 복합적 작용으로 나타난 세포벽의 자가분해 작용대사가 보다 상세하게 밝혀질 수 있는 기초를 제공할 것으로 보여진다.

한편, polyamine은 식물 동물 미생물에 광범위하게 존재하여 세포의 성장이나 분화, 긴장에 의한 대사동에 관여하는 것으로 알려져 있다(Slocum *et al.*, 1984). 고등식물에서 polyamine은 1965년에 처음 발견된 이후(Bertossi *et al.*, 1965) 세포의 길이성장, 노화등에서 대사조절물질로 밝혀졌으며, DNA나 RNA와 결합하여 전사에 영향을 미치거나(Igarashi *et al.*, 1982), 리보솜에 formyl-Met tRNA가 결합하는 것을 촉진시킨다(Igarashi *et al.*, 1978). 또한 polyamine은 세포 성장과 관련된 여러가지 효소의 활성화에 영향을 미치거나(Altman, 1982), 틸라코이드막과 결합하여 막을 안정화시키는 작용이 보고되었고(Popovic *et al.*, 1979), 호르몬의 작용을 중재하는제 이 매개물질로서의 역할이 제시되었다(Galston, 1983). 그리고 성장과 밀접한 관계가 있는 세포벽의 다당류합성에 관여하는 효소활성에도 polyamine이 영향을 미치고 있음이 관찰되었다(Cho *et al.*, 1985). 따라서, 앞에서 언급된 세포벽의 자가분해에 관여하는 효소들과의 상관관계도 예측할 수 있으나, 아직 보고된 바가 없다.

이상과 같은 연구배경으로 본 연구에서는 담배 배양세포의 xyloglucan에 작용하여 세포벽을 느슨하게 하는  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 성질을 규명하고, polyamine이 생체내 및 생체외에서 효소활성에 미치는 영향을 관찰하여 polyamine이 식물생장에 미치는 영향의 일부를 설명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험 식물** 본 실험에서는 황색종담배인 *Nicotiana tabacum* L. Var, Virginia 115 callus를 사용하였으며, 액체 현탁 배양시 250ml 삼각 플라스크에 B5 배지를 80ml씩 넣고 멸균시킨후, callus를 접종하여 25°C 암조건하에서 2주일간 배양하고, 이것을 다시 계대배양하여 사용하였다.

**효소의 활성도 측정** 효소반응액은 20mM 인산나트륨 완충용액 (pH 5.4), 0.25% carboxymethylcellulose, 100  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>에 효소액을 넣고 최종부피가 0.5ml이 되게 하였다. 반응액을 30°C에서 12-18시간 반응시킨 후, 발색시약(증류수 80ml에 30g Na-K tartrate를 녹인 용액에 2M 수산화나트륨 20ml에 3, 5-dinitrosalicylic acid 1g을 녹인 용액을 섞은 것) 0.5ml을 넣고 100°C에서 15분간 끓인 뒤, 상온에서 15분간 방치하고나서 546nm에서 흡광도를 측정하였다 (Li *et al.*, 1965). 반응액내의 환원성 말단은 maltose 표준곡선에 의해 maltose함량으로써 구하였다. 효소의 lunit는 30°C 반응조건에서 1시간 동안에 1 $\mu$ g의 maltose(환원당량)를 생성하는데 필요한 효소활성의 양으로 정하였고, 비활성도는 단백질 1mg당 효소활성으로 나타내었다.

**단백질정량** 효소 정제과정중 각 단계에서 단백질은 Shimadzu UV-120-02 분광 광도계를 이용하여 우 혈청 단백질로 하여 Lowry등의 방법으로 정량하였고(Lowry *et al.*, 1951), 정제과정중 컬럼에서 용출되는 각 분획의 단백질은 280nm에서의 흡광도를 정량하였다.

**Polyamine 농도별 실험구의 설정** 담배 현탁 배양시 배양액에 putrescine, spermidine, spermine을 10<sup>-8</sup>M에서 10<sup>-4</sup>M까지 10배 간격으로 처리하여 2주일간 배양한 것을 농도별 실험구로 하여 각각에서 효소활성도를 측정하여 polyamine이 생체내에서 미치는 영향을 관찰하였다. 생체외에서 유도기(7일째), 활성기(14일째), 정지기(21일째)의 담배 현탁 배양세포를 수집하여 효소액을 제조하고 여기에 putrescine, spermidine, spermine을 10<sup>-8</sup>M-10<sup>-3</sup>M까지 10배 간격으로 처리하여 효소활성도를 측정하였다.

**효소의 정제** 효소액 제조는 Koyama등의 방법을 변형하여 사용하였다(Koyama *et al.*, 1981). 담배 현탁 배양세포 800g을 1mM EDTA, 5% glycerol, 0.01% sodium azide, 0.4M sucrose가 포함된 20mM 인산 완충용액(pH6.2, 완충용액A) 1.6에 넣고, 막자사발로 파쇄하여 균질화시킨 뒤 3,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물을 완충용액A로 2번 씻어 주었다. 이 침전물에 1.0M 염화나트륨, 1mM EDTA, 5% glycerol, 0.01% sodium azide가 포함된 20mM 인산나트륨 완충용액(pH6.2, 1.0M 염화나트륨, 완충용액B) 최소부피를 넣고 다시 균질화시킨 뒤 3,000 $\times$ g에서 15분간 원심분리하였다. 이때 얻은 상층액을 효소액으로 사용하였으며, 다음단계에서 사용하기 위하여 0.2M 염화나트륨 완충용액B로 10시간 투석하였다. 투석하여 얻은 용액을 0.2M 염화나트륨 완충용액B(pH6.2)로 미리 평형시킨 SP-Sephadex 컬럼(2.5 $\times$ 20cm)에서 30ml/시간의 속도로 주입하였다. 동일한 속도, 동일한 완충용액으로 컬럼을 세척하여 용출된 용액의 흡광도가 280nm에서 0.05이하로 떨어졌을 때 0.2M-0.5M 염화나트륨 완충용액B(pH6.2) 직선 농도 구배로 하여 50ml/시간의 속도로 단백질을 용출시켰다. 각 분획은 12ml씩이었고, 각 분획마다 환원성 말단의 증가를 측정하여 효소활성도를 측정하고, 활성이 있는 분획을 모아 이를 0.1M 염화나트륨 완충용액B(pH6.2)로 10시간 투석하였다. 앞에서 얻은 효소용액을 0.1M 염화나트륨 완충용액B(pH6.2)로 미리 평형에 이르게 한 CM-Sephadex 컬럼(2 $\times$ 10cm)에 20ml/시간의 속도로 주입하였다. 동일한 속도, 동일한 완충용액으로 컬럼을 세척하여 280nm에서 단백질이 검출되지 않을 때 0.1M-0.4M 완충용액(pH6.2) 직선 농도 구배로 하여 20ml/시간의 속도로 단백질을 용출시켰다. 각 분획은 10ml씩이었고, 각 분획마다 환원성 말단의 증가를 측정하여 효소 활성도를 측정하고, 활성이 있는 분획을 모아 이를 0.2M 염화나트륨 완충용액B(pH6.2)로 10시간 투석하여 다음 단계에서 사용하였다. 앞 과정에서 얻은 효소용액을 0.2M 완충용액B(pH6.2)로 미리 평형에 이르게 한 Bio-rcx70 컬럼(2 $\times$ 6cm)에 10ml/시간의 속도로 주입하였다. 동일한 속도, 동일한 완충용액으로

로 컬럼을 세척하여 280nm에서 단백질이 검출되지 않을 때 0.2M-0.8 M 염화나트륨 완충용액 B(pH6.2) 직선 농도 구배로 하여 14ml/시간의 속도로 단백질을 용출시켰다. 각 분획은 4ml씩이었고, 각 분획마다 환원성 말단의 증가를 측정하여 효소 활성도를 측정하고, 활성이 있는 분획을 모아 centricon으로 농축하여 차후의 실험에 사용하였다.

**효소의 분자량 측정.**  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 분자량은 Andrews의 방법(Andrew, 1964)에 따라 Sephadex G-100 겔 거르기하여 결정하였다. 20mM인산나트륨 완충용액(pH6.2)으로 미리 평형화된 Sephadex G-100 겔 컬럼(1.4×90cm)에 표준 단백질로  $\gamma$ -글로블린(150,000돌턴), 우혈청 단백질(66,000돌턴), 계란 알부민(45,000돌턴), 라이소자임(14,300돌턴)을 주입하고, 같은 완충용액을 사용하여 3ml/시간의 속도로 단백질을 용출하고, 280nm에서 흡광도를 측정하여 각 단백질에 대한 용출부피를 결정하였다. 표준단백질의 용출부피와 로그값 분자량을 도시하고,  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 용출부피에 대한 분자량을 결정하였다.

**효소의 Km값 결정**  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 carboxymethyl cellulose에 대한 Km은 ecarboxymethyl cellulose의 농도를 변화시켜가면서 효소활성도를 측정한 후 Line weaver-Burk 도식법에 의하여 결정하였다.

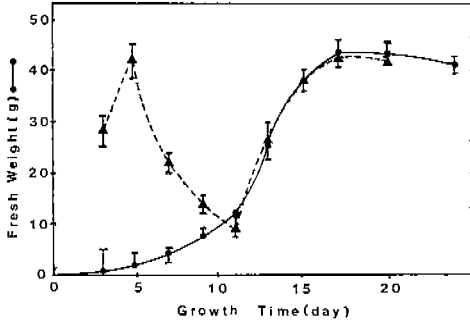
**효소의 온도에 대한 안정성 측정.**  $\beta$ -1,4-endoglucanase를 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C에서 각각 10분간 처리한 뒤 효소 활성도를 측정하여 열을 가하지 않은 효소의 활성도와 비교하였을 때의 잔여 활성도를 백분율로 구하였다.

**효소의 활성에 미치는 pH의 영향.** 100mM 시트르산나트륨 완충용액 pH3.8, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4로 같은 농도의 인산나트륨 완충용액을 pH5.8, 6.2, 6.6, 7.0으로, 같은 농도의 Tris완충용액을 pH7.4, 7.8, 8.2, 8.6으로 하여 각각의 완충용액에 0.25% carboxymethyl cellulose를 넣은 것을 반응액으로 하여  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 활성도를 측정하였다.

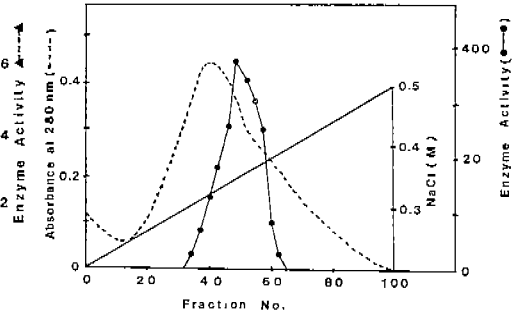
## 결과 및 고찰

**담배세포의 액체 현탁 배양.** 담배 현탁배양 세포의 성장곡선은 일반적인 S자형 곡선을 나타내며, 9일경 부터는 지수적 성장을 보였으며, 17일경에는 정지상에 도달하였다(그림1). 배양 시기에 따른 효소활성도를 측정한 결과, 활성도는 초기에 급격히 증가하다가 감소하여 배양 11일째에는 가장 낮은 활성도를 보였으며, 세포가 빠른 성장을 할 때 활성도가 다시 증가하여 정지상에서는 높은 활성도를 일정하게 유지하였다. 초기에 높은 효소의 활성도를 설명하기가 어렵지만 10일 이후 성장과 효소의 활성도가 평형을 이루는 것은 이 효소가 성장과 밀접한 관계가 있음을 암시하기도 한다.

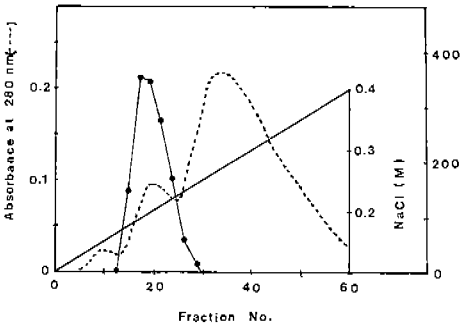
**효소의 정제 및 특성** 2주일간 배양한 담배 현탁배양 세포의 세포벽으로부터 정제를 위한 효소액을 제조하였고, 이때 세포 추출물은 비활성도가 16.43units/mg인 효소액으로 SP-Sephadex, CM-Sephadex, Bio-rex 70이온 교환 크로마토그래피를 수행한 결과 비활성도가 1988.5units/mg으로 121배 정제되었으며, 이 과정에서 최종회수율은 9%이었다(그림 2, 3, 4, 표1). 또한 Sephadex G-100 겔거르기로 측정한 표준단백질의 용출부피를 로그값 분자량으로 도시하고, 같은 방법으로 결정한  $\beta$ -1,4-endoglucanase활성의 용출부피와 비교한 결과  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 분자량은 14,000돌턴이었다(그림5). 그리고 이 효소의 carboxymethyl-cellulose에 대한 Km값은 0.18mg/unit 이었다(그림6). 효소활성은 pH5.4에서 최대의 값을 나



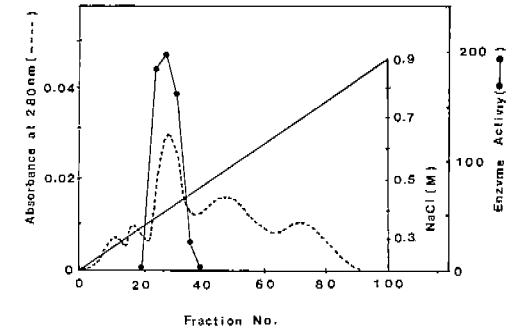
**Fig. 1.** Growth and  $\beta$ -1,4-endoglucanase activity of tobacco cell cultures as a function of time. Enzyme activity is expressed as  $\mu\text{g}$  maltose formed per hr and per  $\mu\text{g}$  of the crude enzyme.



**Fig. 2.** Ion exchange chromatography of  $\beta$ -1, 4-endoglucanase on SP-Sephadex.



**Fig. 3.** Ion exchange chromatography of  $\beta$ -1, 4-endoglucanase on CM-Sephadex.



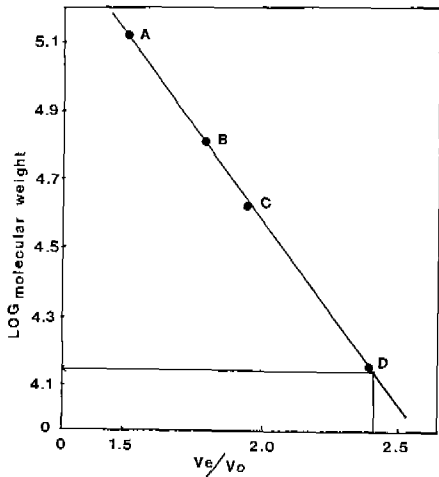
**Fig. 4.** Ion exchange chromatography of  $\beta$ -1, 4-endoglucanase on Bio-rx 70.

**Table 1.** Purification of  $\beta$ -1,4-endoglucanase from 800g of tobacco cell cultures

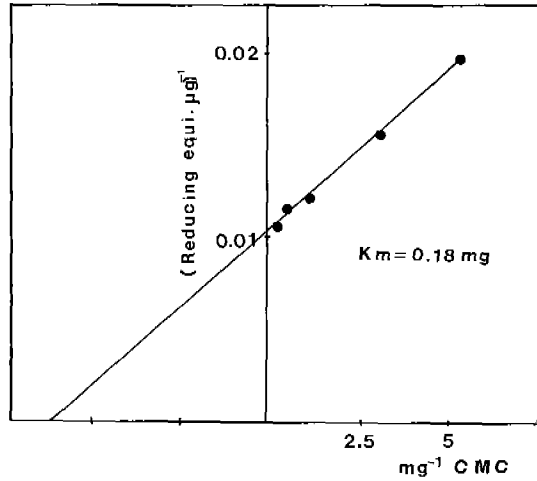
Step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Recovery %	Purification
Crude	368	6044	16.43	100	1
SP-Sephadex	47.6	5273	110.78	87	7
CM-Sephadex	5.4	2875	532.41	48	32
Bio-rx 70	0.26	517	1988.5	9	121

타내었으며(그림7), 효소액을 30 $^{\circ}\text{C}$ , 40 $^{\circ}\text{C}$ , 50 $^{\circ}\text{C}$ , 60 $^{\circ}\text{C}$ , 70 $^{\circ}\text{C}$ , 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 10분간 처리하였을 때, 60 $^{\circ}\text{C}$ 까지는 효소활성을 80%이상 유지하였으나, 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 활성도가 급격히 떨어졌다(그림8). 따라서 이 효소는 열에 대해 비교적 안정한 것 같다.

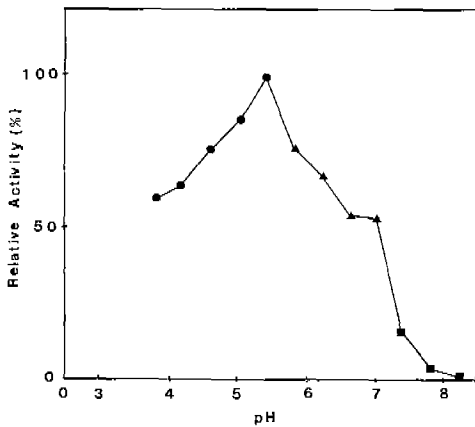
**Polyamine**이 효소활성에 미치는 영향 7, 14, 21일간 배양세포로부터  $\beta$ -1,4-endo glucanase를 얻어서 put, spd, 및 spm이 이 효소활성에 미치는 영향을 관찰하였다(그림9, 10, 11). 어느 경



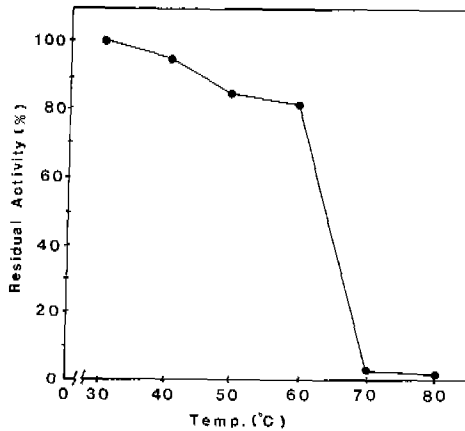
**Fig. 5.** Determination of molecular weight of  $\beta$ -1,4-endoglucanase by Sephadex G-100 gel filtration. A:  $\gamma$ -globulin (150,000)  
B: bovine serum albumin (66,000)  
C: egg albumin (45,000)  
D: lysozyme (14,000)



**Fig. 6.** Double reciprocal plot of enzyme activity vs carboxymethylcellulose amount. Detailed procedures are described in "Materials and Methods".



**Fig. 7.** Effect of pH on  $\beta$ -1,4-endoglucanase activity. The enzyme was assayed in 100 mM sodium citrate (●), 20 mM sodium phosphate (▲) and 20 mM Tris-HCl (■).



**Fig. 8.** Heat stability of  $\beta$ -1,4-endoglucanase. Detailed procedures are described in "Materials and Methods".

우에서도 효소활성에 영향을 주지 못하였다. 많은 경우에서 polyamine이 효소활성에 영향을 주는 경우를 고려하면 매우 주목할 만하다고 사료된다(Altman, 1982; Cho *et al.*, 1985).

그러나, 담배세포의 현탁배양시 polyamine을 농도별로 배양액에 2주간 처리하였을 때 put은  $10^{-6}$  M에서, spd는  $10^{-5}$  M~ $10^{-6}$  M에서, spm은  $10^{-7}$  M에서 효소 활성도를 크게 증가시켰다(그

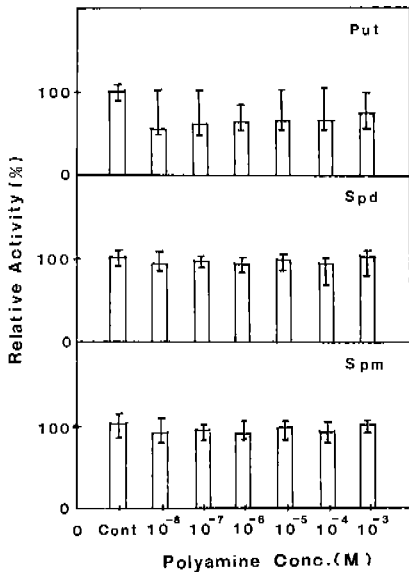


Fig. 9. Effect of polyamine on  $\beta$ -1,4-endoglucanase activity from tobacco cell cultures at the lag phase (7 day). 100% is arbitrarily given to the control.

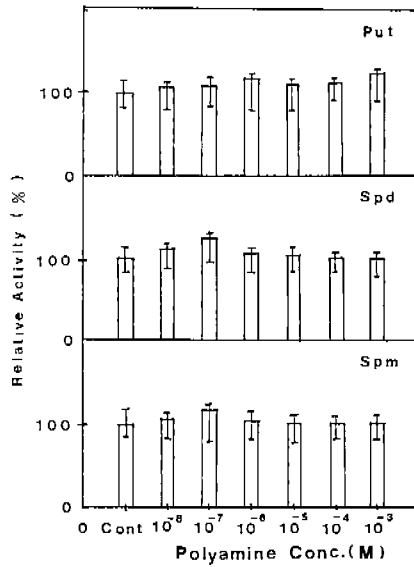


Fig. 10. Effect of polyamine on  $\beta$ -1,4-endoglucanase activity from tobacco cell cultures at the log phase (14 day). 100% is arbitrarily given to the control.

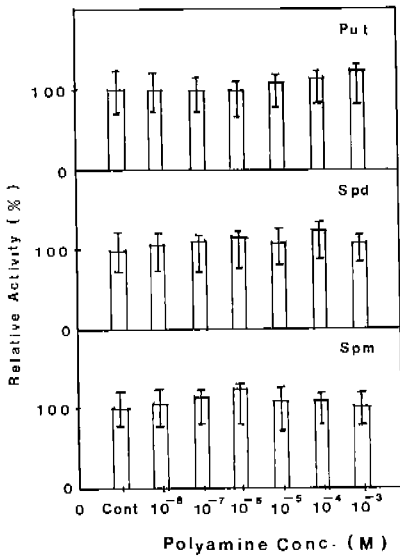


Fig. 11. Effect of polyamine on  $\beta$ -1,4-endoglucanase activity from tobacco cell cultures at the stationary phase (21 day). 100% is arbitrarily given to the control.

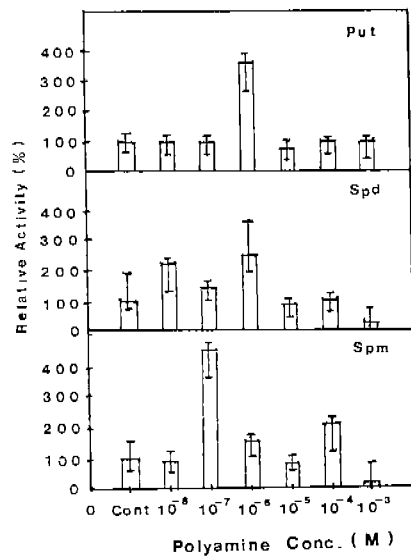


Fig. 12. Change in  $\beta$ -1,4-endoglucanase activity in the tobacco cell cultures grown on medium containing various concentrations of polyamine for two weeks. Detailed assay conditions of the enzyme are described in "Materials and Methods".

림 12).

물론, spm의 경우  $10^{-7}$  M 이외의 다른 농도에서도 활성도의 증가를 보이나, 각 농도에서 변동이 심한 결과로  $10^{-7}$  M 에서 활성도증가가 뚜렷한 것으로 보여진다. Put, spd, spm 모두, 자가분해와 관계있는  $\beta$ -1,4-endoglucanase활성을 증가시킨 것은 성장에 영향을 줄 수 있음을 암시하는 것으로 사료된다. Polyamine 중 spm이 담배 배양세포 성장에 영향을 준다고 Fallen과 Phillips는 주장한 바있다(Fallen and Phillips. 1988).

이러한 일련의 결과들은 polyamine이 자가분해에 관련된 효소의 활성을 증가시킴으로써 성장에 영향을 줄 수 있는 가능성도 있다고 본다.

### 적 요

$\beta$ -1,4-endoglucanase를 *Nicotiana tabacum* L. Var. Virginia 115 현탁배양 세포로부터 분리, 정제하였다. 분자량은 Sephadex G-100 gel filtration에 의해 1,400으로 측정되었고 최적 pH는 5.4였으며 carboxymethyl cellulose에 대한 Km 값은 0.18mg/unit 였다. 이 효소는 열에 대하여 아주 안정한 편이었다. *In vitro* 에서 polyamine은 이 효소의 활성에 별다른 영향을 주지 못하였으나 *in vivo*에서는 polyamine을 처리하여 배양했을 때 현저한 효소 활성의 증가를 보였다. 이러한 polyamine에 의한  $\beta$ -1,4-endoglucanase의 활성 증가는 식물성장에 영향을 줄 것으로 사료된다.

### 參 考 文 獻

- Altman, A. 1982. Polyamines and wounded strong tissue inhibition of RANase activity and solute leakage. *Physiol. Plant.* **54** : 194-198.
- Andrew, P. 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* **911** : 222-233.
- Ballance, G. M., W.O.S. Meredith and D.E. LaBrge. 1976. Distribution of and development of endo- $\beta$ -glucanase activities in barley tissues during germination. *Can. J. Plant Sci.* **56** : 459-466
- Ben-Aric, R., N. Kislev and C. Frenkel. 1979. Ultrastructural changes in the cell walls of ripening apple and pear fruit. *Plant Physiol.* **64** : 197-202
- Bertossi, F.N., G. Bagni, Moruzzi and C.M. Calderera. 1965. Spermine as a new growth-promoting substance for *Helianthus tuberosus* *in vitro*. *Experientia.* **21** : 80-81
- Cho. Y.D., J.H. Kang, Y.M. Lee, S.H. Lee, J.S. Lee and Y.H. Kang. 1988. Cell biological studies on growth and development. Effect of polyamine and auxin on  $\beta$ -1,4-endoglucanase *Korean J. Bot.* **31** : 239-247
- Cho, Y.D., S.H. Lee, H.W. Kim and H.M. Lee. 1985. Effect of polyamines on glucan synthetase activity. *Korean J. Bot.* **28** : 243-251
- Fallen, K.M. and R. Phillips. 1988. Polyamines in relation to growth in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* **88** : 224-227
- Galston, A.W. 1983. Spermidine as modulators of plant development. *Bioscience* **33** : 382-388.
- Hatfield, R.D and D.J. Nevins. 1987. Hydrolytic activity and substrate specificity of an endoglucanase from *Zea may* seedling cell walls. *Plant Physiol.* **83** : 203-207



- Hatfield, R.D and D.J. Nevins. 1986. Purification and properties of an endoglucanase isolated from the cell walls of *Zea mays* seedling. *Carbohydr. Res.* **148** : 265-278
- Huber, D.J. and D.J. Nevins. 1981. Partial purification of endo- and exo- $\beta$ -glucanase enzymes from *Zea mays* seedlings and their involvement in cell wall autohydrolysis. *Planta* **151** : 206-214
- Igarashi, K., I. Sakamoto, N. Goto, K. Kashiwagi, R. Honma and S. Hirose. 1982. Interaction between polyamines and nucleic acid or phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **219** : 438-443
- Igarashi, K., Y. Watanabe, K. Nakamura M. Kojima, Y. Fujiki and S. Hirose. 1978. Effect of spermidine on N-formyl-methionyl-tRNA binding to 30s ribosomal subunits and on N-formyl-methionyl-tRNA dependent polypeptide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83** : 806-866
- Kato, Y. and D.J. Nevins. 1984. Enzymic dissociation of *Zea* shoot cell wall polysaccharides. II. Dissociation of (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan by purified (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolase from *Bacillus Subtilis*. *Plant Physiol.* **75** : 745-752
- Koyama, J., T. Hayashi, Y. Kato and K. Matsuda. 1981. Degradation of xyloglucan by wall-bound enzymes from soybean tissue. *Plant & Cell Physiol.* **22** : 1191-1195
- Labrador, E. and G. Nicolas. 1984. Autolysis of cell walls in pea epicotyls during growth. enzymatic activities involved. *Physiol. Plant.* **64** : 541-546.
- Lee, S., A. Kivilaan, R.S. Banduski. 1967. *In vitro* autolysis of plant cell walls. *Plant Physiol.* **42** : 968-972.
- Lewis, I.N. and J.E. Varner. 1970. Synthesis of cellulose during abscission of *Phaseolus vulgaris* leaf explants. *Plant Physiol.* **46** : 194-199.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Fahr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275.
- Li, L., H. Flora and R.M. King. 1965. Detection of carboxymethyl oligosaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.* **111** : 439-443.
- Luttenegeger, D. G. and D.J. Nevins. 1985. Transient mature of a (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan in *Zea mays* coleoptile cell walls. *Plant Physiol.* **77** : 175-178.
- Mc Neil, M., A. G. Darvill, S.C. Fry and P. Albersbeim. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* **53** : 625-663.
- Popovic, R.B., D.J. Kyle, A.S. Cohen and S. Zalik. 1979. Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf disc. *Plant Physiol.* **64** : 721-726
- Ridge, I. and D.J. Osborne. 1969. Cell growth and cellulase: Regulation by ethylene and indole-3-acetic acid in shoots of *Pisum sativum*. *Nature* **223** : 318-319
- Roggen, H. P. and R.G. Stanley. 1969. Cell wall hydrolysis enzymes in wall formation as measured by pollen tube extension. *Planta* **84** : 295-303
- Seara, J., G. Nicolas and E. Labrador. 1984. Autolysis of the cell wall. its possible role in endogenous and IAA-induced growth in epicotyl of *Cicer arietinum*. *Physiol. Plant.* **72** : 769-774.
- Sheldrake, A.R. 1970. Cellulose and cell differentiation in *ACER pseudoplatanus*. *Planta* **72** : 167-178.
- Slocum, R.D., R. Kaur-Sawhney and A. W. Galston. 1984. The physiology and biochemistry of polyamine in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **235** : 283-303.
- Taig, L. 1984. Plant cell expansion. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35** : 585-657.