Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.
Vol. 18, No. 4, 383-389 (1990)

*Penicillium verruculosum*의 Avicelase 생성에 대한 Cellobiose Octaacetate와 Avicel 및 KC-flock의 영향

조남철 · 김강화* · 전순배[1] · 정기철[2]

전남대학교 가정대학 식품영양학과, [1]자연과학대학 미생물학과, [2]농과대학 유전공학과

Effect of Cellobiose Octaacetate, Avicel, and KC-flock on Production of Avicelases from *Penicillium verruculosum*

Cho, Nam-Chul, Kanghwa Kim*, Soon-Bai Chun[1] and Ki-Chul Chun[2]

Department of Food Science & Nutrition, [1]Microbiology, [2]Genetic Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

During the cultivation of *Penicillium verruculosum* in the media containing cellobiose octaacetate (COA), avicel, or KC-flock as an inducer and as a sole carbon source for 21 days, cellulolytic activity and SDS-PAGE pattern of proteins in the culture broth were investigated. Protein concentration and cellulolytic activity were highest in the COA medium. As cultivation period was increased, protein content and avicel hydrolytic activity of culture broth were increased as similar extent but neither β-glucosidase nor CMC hydrolytic activity was correlated to protein content. When crude proteins from the culture broth were separated on DEAE column by HPLC, distribution of avicel-hydrolytic activities were well correlated with that of major proteins. From those results it was suggested that three major proteins having 60 K, 68 K, and 76 K of Mr. were avicel-hydrolytic enzymes.

정에 의하여 최근 분리 보고된 *Penicillium verruculosum* F-3 균주(1)는 섬유소 분해효소 생성이 가장 우수한 균주로 알려진 *Trichoderma reesei* QM6a(2)와 비슷한 정도의 천연섬유소 분해활성을 갖고 있을 뿐 아니라 *T. reesei*보다 β-glucosidase 활성도가 더 높아 섬유소 분해시 β-glucosidase의 첨가가 요구되지 않으므로 섬유소자원 이용에 보다 적합한 균주가 될 수 있다는 가능성이 제안된 바 있다(3). 아울러 *P. verruculosum*의 섬유소 가수분해효소가 천연섬유소 분해활성이 뛰어나므로 아직 정확하게 규명되어 있지 않은 결정성 섬유소 분해기작을 연구하는데 좋은 모델이 될 것으로 생각된다. *P. verruculosum*에 의한 섬유소 가수분해효소는 섬유소 분해효소를 생성하는 다른 대부분의 균주들과 마찬가지로 KC-flock 및 avicel 등의 섬유소 탄소원에 의하여 유도되는 효소로 알려져 있다. 그러나 다른 균주와는 달리 cellobiose octaacetate(COA)가 가장 좋은 유도성물질임이 보고되었다(4). 이들 섬유소 분해효소 유도물질들에 의한 개별 효소성분의 생성에 관해서는 알려진 바 없으므로 COA, avicel 및 KC-flock를 유일한 탄소원으로 포함하는 배지에서 천연섬유소 분해에 일차적으로 작용하는 것으로 알려진 avicel 분해활성을 갖는 cellobiohydrolase(CBH)의 생성을 검토하였다. 본 논문에서는 *P. verruculosum* 균주를 avicel 혹은 COA 배지에서 배양하였을 때 배양액 여액 중에 avicel을 가수분해하는 두 종류의 효소단백질이 있으며, KC-flock 배지의 경우 이들과는 다른 것으로 생각되어지는 또 하나의 avicel 분해효소가 분포함을 보고하고자 한다.

Key word: Avicelase, *Penicillium verruculosm*, Inducer, Cellobiose Octaacetate, KC-flock
*Corresponding author

재료 및 방법

균배양

P. verruculosum F-3(1)를 효소 유도물질로서 KC-flock W-200(Sanyo Kokusaku pulp Co. Japan), Avicel PH-101(Fluka, Swiss), 혹은 COA(Aldrich Chemical Co., USA)를 1% 첨가한 섬유소 가수분해효소 생산배지(5)에서 21일간 30℃에서 진탕배양하면서 6일 이후 일정한 간격으로 배양액을 소량씩 취하여 원심분리한 후 상등액을 사용시까지 −20℃ 얼려 보관하였다.

효소 활성도 측정

Avicel(2%), 혹은 carboxymethylcellulose(CMC, 1%)를 포함하는 0.1M 초산나트륨 완충용액(pH 5.0)에 일정량의 배양액을 가하여 30분간 50℃에서 진탕 반응시킨 후 생성된 환원당을 dinitrosalicylic acid 방법(6)으로 정량하였다. β-glucosidase 활성도는 p-nitrophenyl-β-glucoside(PNPG) 10mM을 포함하는 0.1M 초산나트륨 완충용액(pH 5.0)에 배양상등액을 가하여 30분간 50℃에서 반응시킨 후 생성된 p-nitrophenol (PNP)의 양을 400nm에서의 흡광도로 측정하였다(7). 1분 동안에 PNP 혹은 포도당으로 환산한 환원당 1μmole을 생성하는 효소활성도를 1unit로 하였다.

단백질 정량 및 SDS-전기영동

배양여액에 trichloroacetic acid를 가하여 침전시킨 단백질을 변형된 Lowry 방법(8)으로 정량하였으며 Laemli 등의 방법(9)을 이용하여 SDS를 포함한 10% acrylamide 겔로 전기영동하였다.

DEAE관을 이용한 고속 액체크로마토그래피에 의한 분리

14일째의 배양여액 중에 포함되어 있는 단백질을 황산암모늄 침전법으로 분획하고 20mM Tris 완충용액(pH 7.6)에 녹인 다음, 고속 액체크로마토그라프(영인과학)를 이용하여 동일 완충용액으로 미리 평형시킨 DEAE관(Protein Pack Glass DEAE-5PW, 0.8×7.5cm)에 주입한 후 1ml/min 유속으로 KCl 농도구배(0.0~0.4M)로 용출하고 1ml씩 분획했다.

효소반응 생성물 확인

효소반응 상등액에 포함된 환원당 Silica Gel 박층 크로마토그라피로 확인하였다. 전개용매로서 n-butanol : ethanol : water(5 : 3 : 2)계(10)를 이용하였으며 발색시약으로는 silver nitrate-sodium hydroxide 시약을 사용하였다.

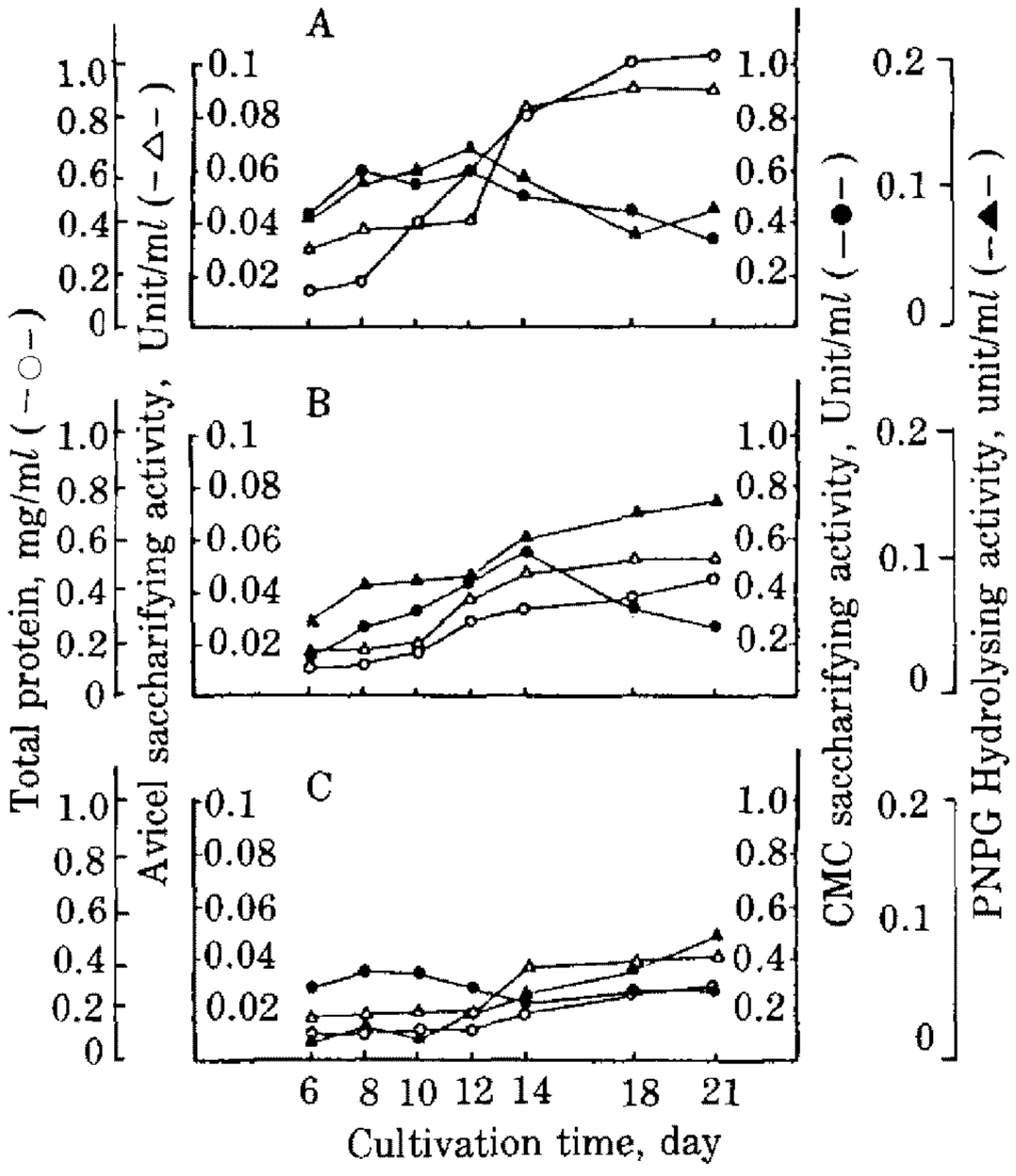

Fig. 1. Production of protein and cellulases by *P. verruculosum* in medium containing COA (A), avicel (B) or KC-flock (C) as an inducer.
After incubation of reaction mixture containing 100 mM sodium actate buffer, pH 5.0, culture filtrate and 2% avicel (△) or 1% CMC (●) or 10 mM PNPG (▲) at 50°C, reducing sugar in supernatant of the reaction mixture was determined by DNS method using glucose as a standard sugar or produced p-nitrophenol was determined by absorption at 400 nm. One unit of enzyme activity was defined as that which released 1μmole of glucose equivalent or p-nitrophenol per min.

결 과

배양시간에 따른 단백질량 및 섬유소 분해활성도의 변화

*P. verruculosum*을 유일한 탄소원으로서 COA, avicel 및 KC-flock를 포함하는 액체배지에서 배양했을 때 Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양여액 중의 총단백질량은 배양기간이 증가함에 따라 세 경우 모두 증가했다. Avicel과 KC-flock을 포함하는 배지의 경우 배양 6일째에는 배양여액 중의 단백질량이 0.1mg/ml였던 것이 배양 21일째에는 3~4배 증가하여 각각 0.4mg/ml 및 0.3mg/ml로 되었다. COA를 포함하는 배지의 경우 배양 초기 0.15mg/ml로부터 14일째에는 0.8mg/ml로 증가하였으며 계속해서 3주까지도 서서히 증가하여 avicel이나 KC-flock 배지에 비하여 단백질량이 약 3배

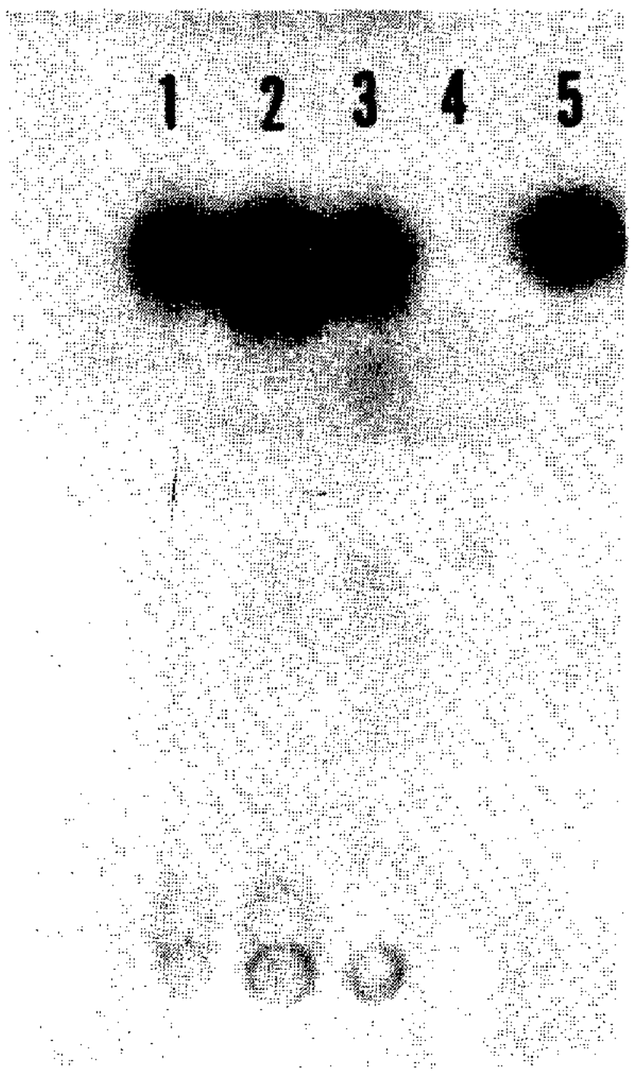

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of cotton by culture filtrate of *P. verruculosum*.

Reaction mixture containing 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, cotton and each cuture filtrate. The supernatant of the reaction mixture was separated using butanol: ethanol: water (5:3:1) as a developing solvent system on precoated silica gel plate and reducing sugars were detected by silver nitrate-sodium hydroxide reagent. Lanes: 1, COA medium; 2, avicel medium; 3, KC-flock medium; 4, cellobiose; 5, glucose.

였다. 세 종류의 배지 모두 단백질량이 증가함에 따라 완전히 비례하지 않았지만 avicel 분해활성도가 증가했다. 특히 COA 배지의 경우 CMC 혹은 PNPG 분해활성도와는 달리 avicel 분해활성도가 총단백질량의 증가와 비슷한 정도로 증가했다(Fig. 1A). COA 유도물질에 의해서는 avicel 분해효소 생성이 보다 더 잘 일어나는 것으로 생각되었다. PNPG를 기질로 하여 측정한 β-glucosidase 활성도는 avicel과 KC-flock 배지의 경우 배양기간이 길어짐에 따라 증가했으나, COA 배지의 경우는 12일째까지는 증가했다가 그 이후 오히려 감소했다. CMC 분해활성도는 avicel 배지의 경우 배양 14일까지 증가하다가 그 후 감소하였으며 COA와 KC-flock 배지에서는 배양 전기간에 걸쳐 큰 변화가 없었다. 배양 6일째와 21일째 배양여액을 cotton에 반응시킨 후 박층크로마토그라피로 반응생성물을 확인했을 때 주된 생성물은 포도당이었으며 셀로비오스와 삼당류 이상의 올리고당류도 소량이었다(Fig. 2).

배양시간에 따른 단백질분포 양상의 변화

배양 21일째 세 종류 배양여액 중의 총단백질량이 같도록 각각 일정 부피의 배양여액을 배양전기간에 걸쳐 전기영동한 결과는 Fig. 3과 같았다. COA 배지의 경우는 배양 초기에 60 kDa와 66 kDa의 단백질이 주로 분포하였으며 배양함에 따라 이들 단백질량이 현저히 증가되

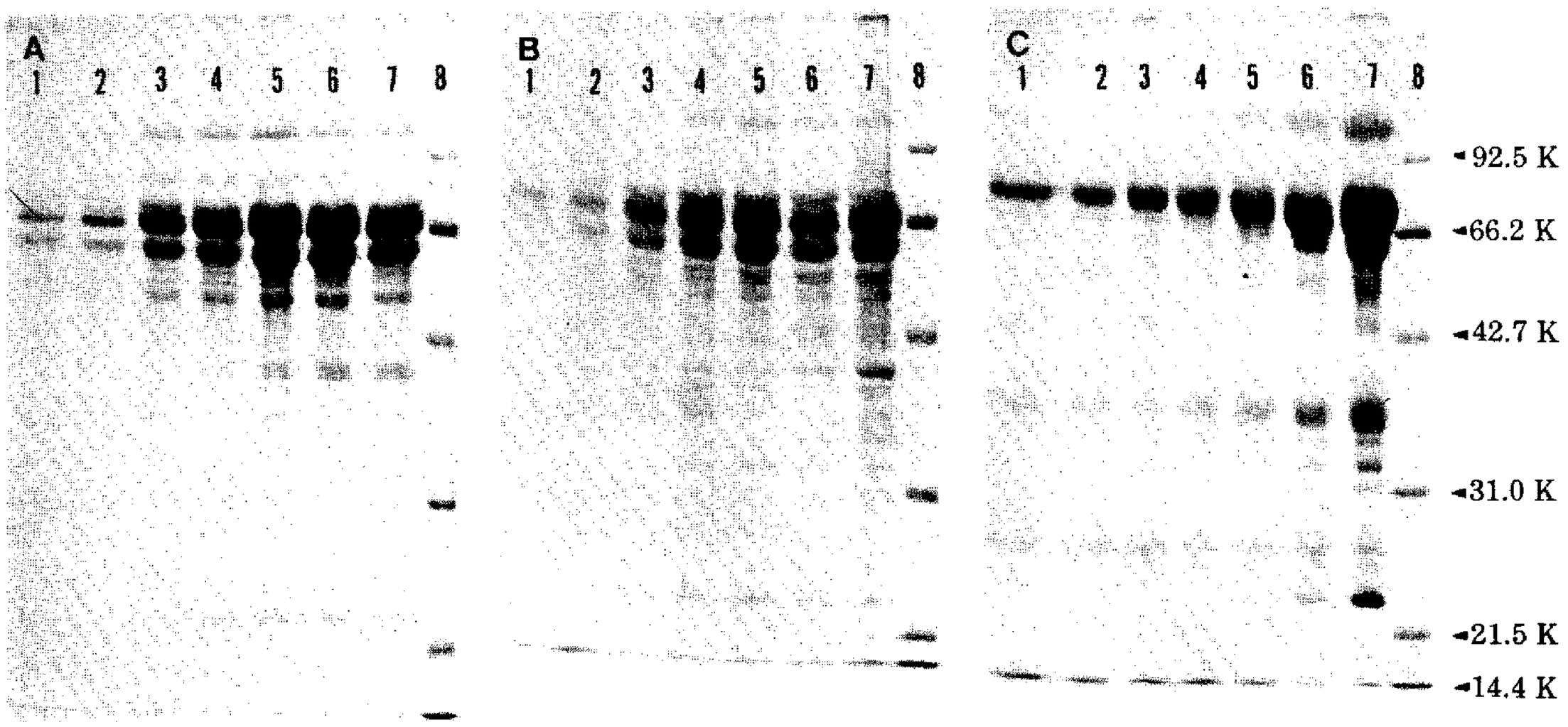

Fig. 3. SDS-PAGE of proteins in culture filtrate of *P. verruculosum* was cultured in medium containing COA (A), avicel (B), or KC-flock (C) for 21 days.

Protein samples in the culture filtrate were separated by 10% SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie blue. Culture days for lanes: 1, 6th day; 2, 8th day; 3, 10th day; 4, 12th day; 5, 14th day; , 18th day; 7, 21th day.

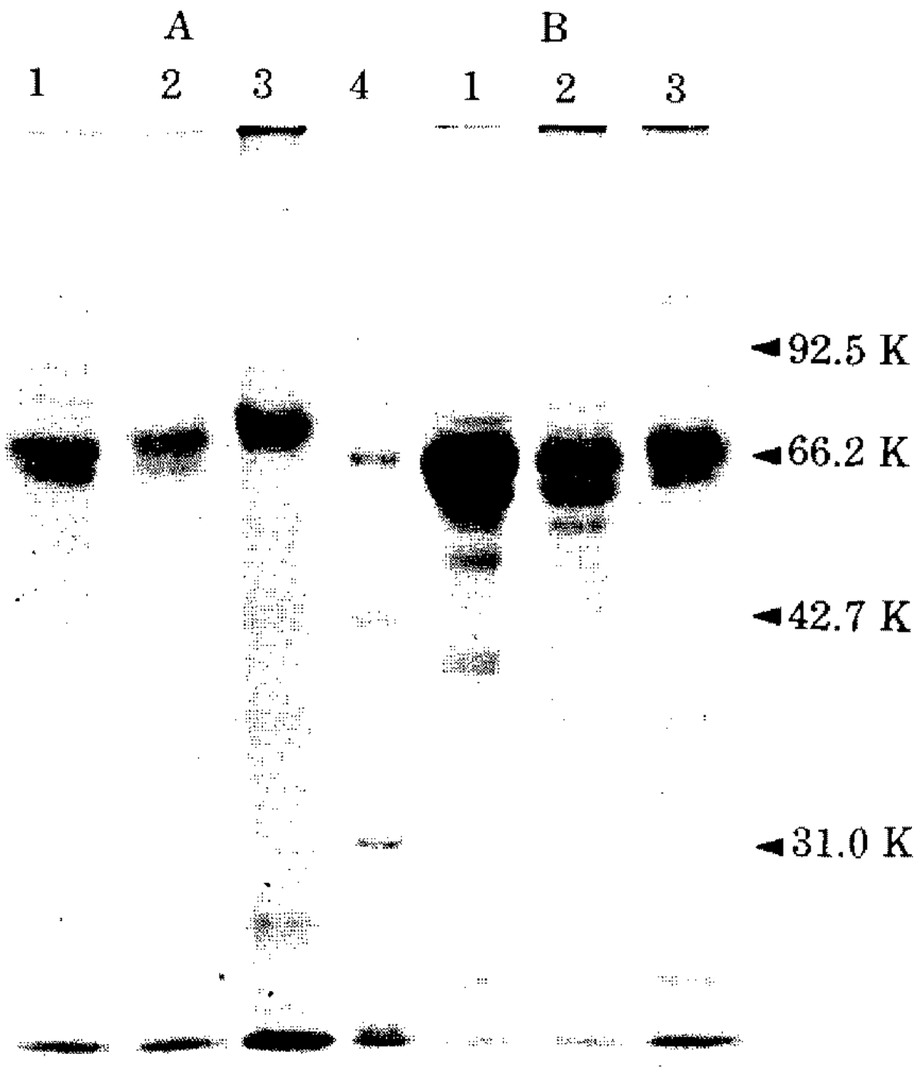

Fig. 4. SDS-PAGE of protein produced by *P. verruculosum* in a medium containing COA (lane 1), avicel (lane 2) or KC-flock (lane 3). *P. verruculosum* was cultured in the medium for 6 days (A) or 21 days (B).
Protein samples in those culture filtrate were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie blue.

었다. 120 kDa의 단백질은 10일 이후 증가되다가 17일 이후부터는 감소되었으며 53 kDa, 40 kDa 및 23 kDa의 단백질을 포함한 60 kDa 이하의 단백질들은 10일 이후의 배양여액 중에 분포하였다. Avicel 배지의 경우 COA 배지와 마찬가지로 배양 초기에는 주로 60 kDa와 66 kDa의 단백질이 분포하였으며 배양시간이 길어짐에 따라 주로 이들 단백질들이 증가하였다. 배양 10일 이후부터는 120 kDa의 단백질을 포함한 66 kDa보다 큰 단백질과 함께 60 kDa 이하의 여러 단백질들이 생성되어 배양 말기의 단백질 분포양상은 대체로 COA 배지의 경우와 비슷하였다. KC-flock를 포함하는 배지의 경우 COA나 avicel 배지와는 달리 배양초기에 분자량 76 K의 단백질과 아울러 34 K 및 24 K의 단백질이 분포했는데 배양시간이 증가함에 따라 이들 중에서 주로 76 kDa의 단백질만이 증가했으며 또한 이 단백질보다 분자량이 조금 작은 단백질이 배양 10일째부터는 증가했고 배양 21일째 배양여액 중에는 60 kDa의 단백질도 있었다. 배양 14일 이후에는 120 kDa의 단백질이 급격히 증가했는데 이는 β-glucosidase 활성도의 증가와 일치했다. 이러한 결과는 avicel 및 COA 배지에서의 120 kDa 단백질의 변화와 β-glucosidase 활성도의 변화가 일치되는 것과 같았다. KC-flock 배지 배양여액 중의 34 kDa와 24 kDa 단백질은 avicel이나 COA 배지에서는 배양기간에 관계없이 거의 존재하지 않았다. 탄소원이 다른 세 종류의 배지에서의 단백질 분포는 배양초기에 현저한 차이가 있었으나 주된 단백질의 양상이 배양기간이 길어짐에 따라 비슷해져 21일의 경우 60 kDa에서부터 76 kDa 범위의 단백질 분포는 비슷했다. 그러나 60 kDa 이하의 단백질 양상은 조금씩 차이가 있었다(Fig. 4). COA와 avicel 혹은 KC-flock과 avicel을 함께 포함하는 배지에서 배양한 경우 배양여액에 포함되어 있는 단백질의 전기영동 양상은 각각 COA 혹은 KC-flock 만을 포함하는 배지의 경우와 차이가 없었다.

고속 액체크로마토그라피용 DEAE 관에 의한 조단백질의 분리 양상

섬유소 가수분해효소를 구성하는 각 성분들의 섬유소 분해시 상승작용을 하는 것으로 알려져 있으며 배양여액 중에 있는 섬유소 분해산물들에 의한 저해효과가 다를 수가 있다. 따라서 배양여액의 각 활성도만으로는 효소의 각각 성분의 분포를 알 수 없을 뿐만 아니라 특정 단백질과의 관계를 추정할 수 없기 때문에 천연섬유소 분해활성에 관여하는 것으로 제안된 avicel 분해활성도의 분포를 검토하기 위해서 각 배지에서 14일간 배양한 배양여액 중의 단백질을 고속 액체크로마토그라피용 DEAE 관에 주입한 후 KCl 농도구배를 이용하여 분리하고 활성도와 전기영동상의 단백질 분포양상을 검토하였다. COA 배지의 배양여액 중에 포함된 조단백질을 고속 액체크로마토그라피로 분리했을 때 단백질의 용출양상 및 효소활성도와 분획 중에 분포하는 단백질의 전기영동 양상은 Fig. 5와 같았다. 단백질은 주로 100 mM에서 350 mM의 KCl 농도범위에서 용출되었으며 CMC를 분해하는 활성도는 단백질이 용출되는 전 범위에 걸쳐 분포하였고 avicel을 분해하는 활성도는 150 mM과 210 mM KCl 농도 부근의 두 곳 분획들 중에 분포하였다(Fig. 5). β-glucosidase 활성도 또한 염농도가 낮은 분획들 중에 분포했으나 250 mM 염농도 부근에도 또 하나의 낮은 활성도가 분포했다. 전기영동상의 단백질 분포양상에 있어서 대체로 avicel 분해활성의 분포는 조단백질 중 가장 많이 차지하는 주된 단백질의 분포와 거의 일치하였다. Avicel 배지 조단백질의 경우 단백질의 용출양상은 COA 배지의 경우와 거의 같았으며 CMC를 가수분해하는 활성도는 COA 배지에서처럼 단백질이 분포하는 거의 전 범위에 분포했다. PNPG를 분해하는 β-glucosidase 활성도는 주로 150~220 mM KCl의 분

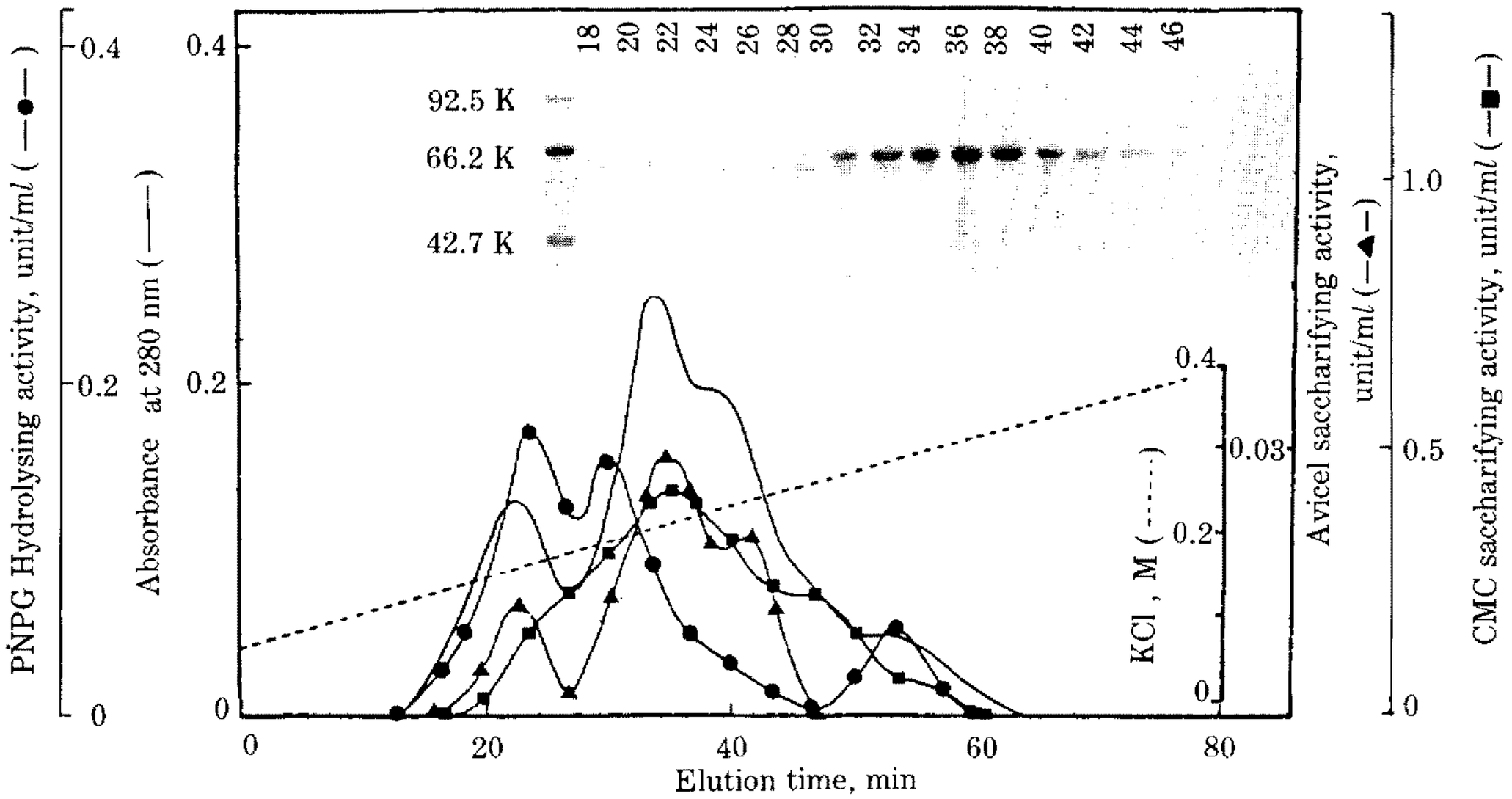

Fig. 5. HPLC DEAE ion exchange chromatography of crude protein produced by *P. verruculosum* in COA medium. After cultivation of *P. verruculosum* in COA medium for 14 days, protein sample obtained from culture filtrate was applied to HPLC DEAE column preequilibriated with 50 mM Tris, pH 7.6, and then eluted with KCl gradient (0.0-0.4 M). Avicel (▲) and CMC (■) saccharifying activities and PNPG hydrolysing activity (●) were measured as described in Fig. 1. (Inset) SDS-PAGE of proteins in fractions. Fourty μl of indicated fractions were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel and then stained with Coomassie blue. Numbers above the lanes of SDS-PAGE denote fraction numbers.

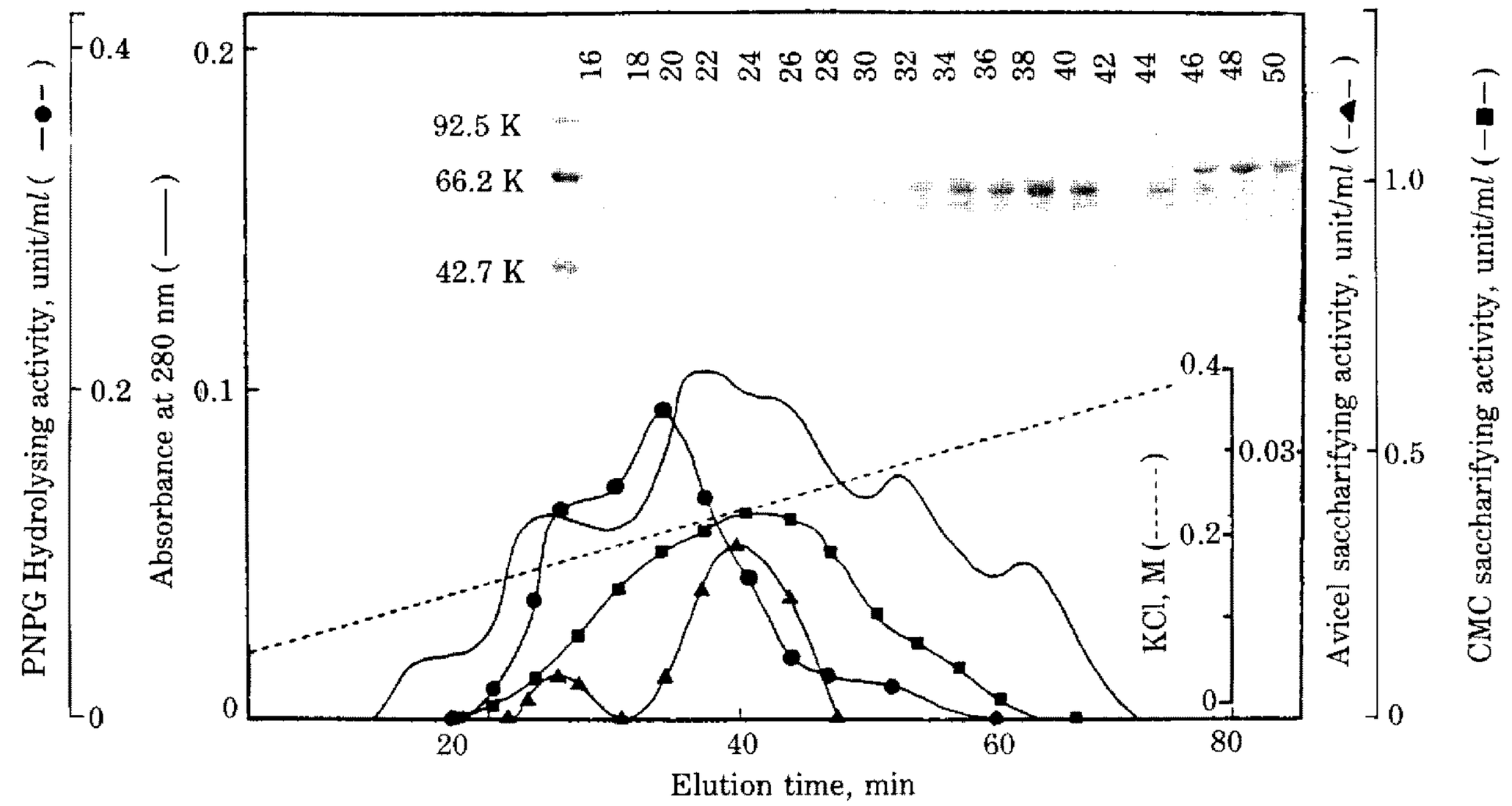

Fig. 6. HPLC DEAE ion exchange chromatography of crude protein produced by *P. verruculosum* in avicel medium. After cultivation of *P. verruculosum* in avicel medium for 14 days, protein sample obtained from culture filtrate was applied to HPLC DEAE column preequilibriated with 50 mM Tris, pH 7.6 and then eluted with KCl gradient (0.0-0.4 M). Avicel (▲) and CMC (■) saccharifying activities and PNPG hydrolysing activity (●) were measured as described in Fig. 1. (Inset) SDS-PAGE of proteins in fractions. Fourty μl of indicated fractions were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel and then stained with Coomassie blue. Numbers above the lanes of SDS-PAGE denote fraction numbers.

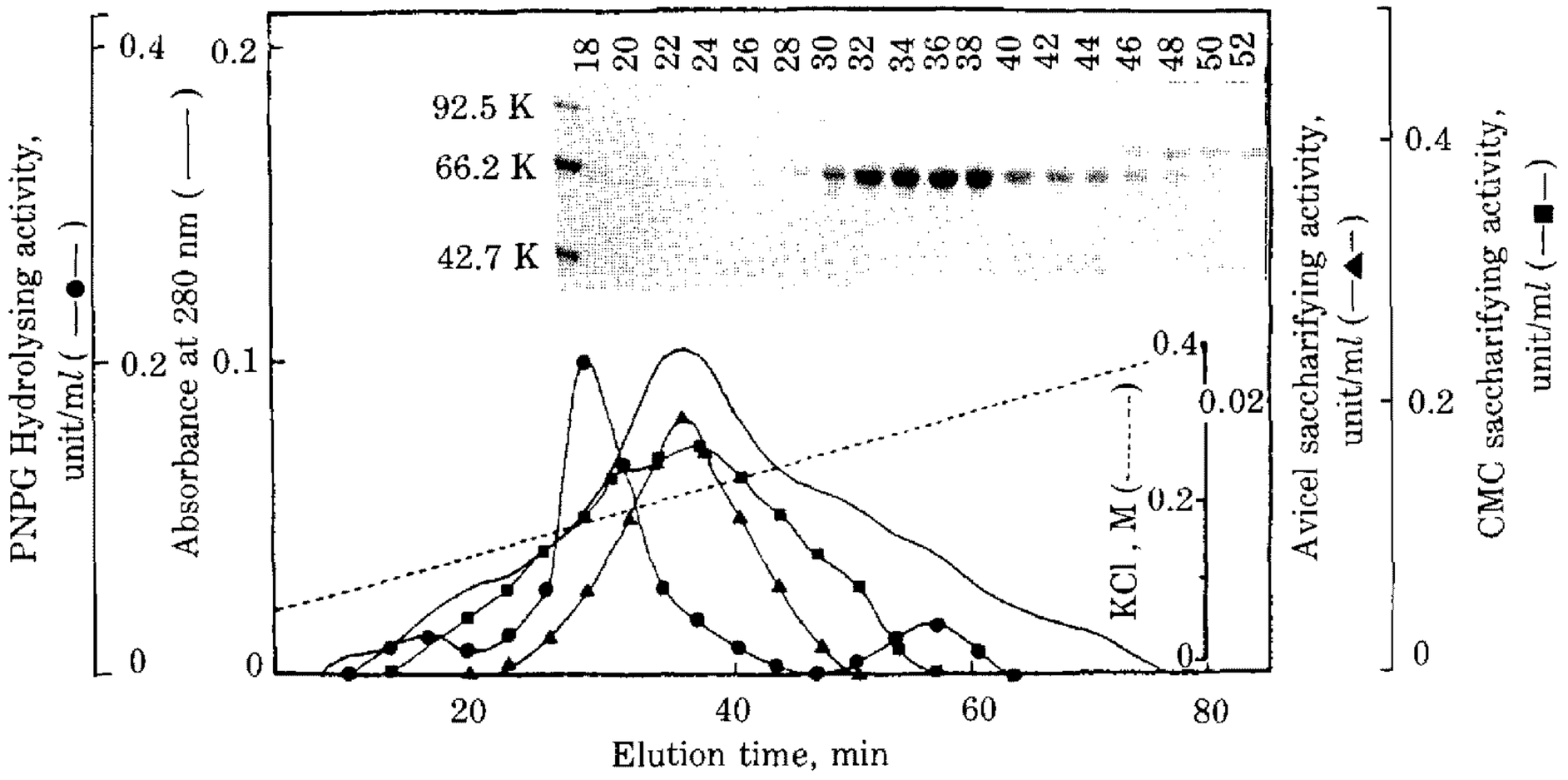

Fig. 7. HPLC DEAE ion exchange chromatography of crude protein produced by *P. verruculosum* in KC-flock medium.

After cultivation of *P. verruculosum* in KC-flock medium for 14 days, protein sample obtained from culture filtrate was applied to HPLC DEAE column preequilibriated with 50 mM Tris, pH 7.6 and then eluted with KCl gradient (0.0-0.4 M). Avicel (▲) and CMC (■) saccharifying activities and PNPG hydrolysing activity (●) were measured as described in Fig. 1. (Inset) SDS-PAGE of proteins in fractions. Fourty μl of indicated fractions were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel and then stained with Coomassie blue. Numbers above the lanes of SDS-PAGE denote fraction numbers.

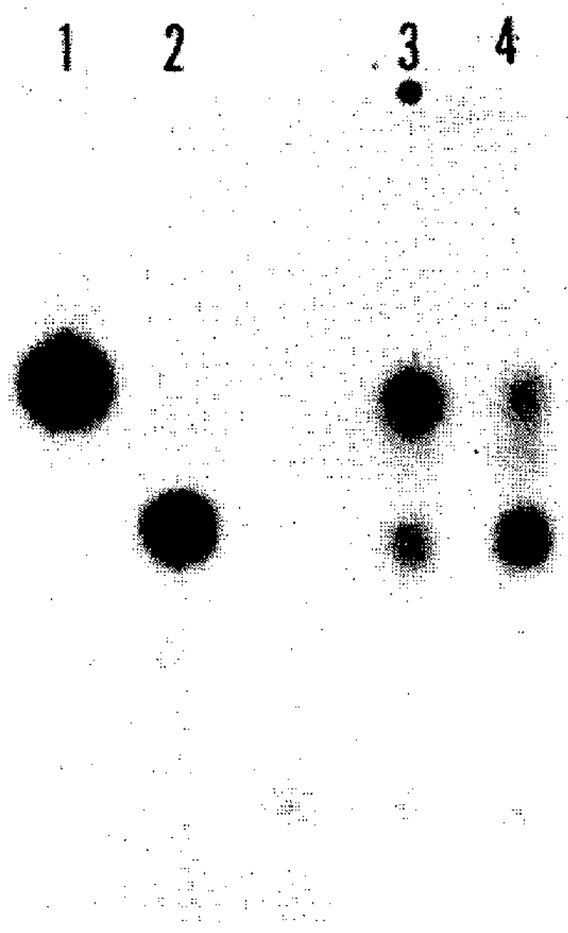

Fig. 8. Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products avicel by culture filtrate of *P. verruculosum*.

Reaction mixture containing 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 2% avicel, and fraction No. 24 or fraction No. 32 in Fig. 5. was incubated at 50°C with shaking. The supernatant of the reaction mixture was separated using butanol: ethanol: water (5:3:2) as a developing solvent system on precoated silica gel plate and reducing sugars were detected by silver nitrate-sodium hydroxide reagent. Lanes: 1, glucose; 2, cellobiose; 3, reaction mixture containing fraction No. 24; 4, reaction mixture containing fraction No. 32.

획들 중에 분포했는데 이들 분획 중에는 120 kDa의 단백질이 분포했다. 결정성 섬유소인 avicel을 분해하는 활성도는 170 mM과 230 mM 염농도의 분획들 두 곳에 분포했는데 낮은 염농도에서의 avicel 분해활성도의 분포는 60 kDa의 단백질 분포와 유사했다. Avicel 분해활성도가 분포하는 230 mM 부근의 분획들에는 여러 종류의 단백질이 분포했는데 활성도 분포와 비교적 일치하는 것은 66 kDa 부위의 두 단백질 band였다. KC-flock 배재의 경우도 대체로 avicel 및 COA 배지의 경우와 비슷하였으나 β-glucosidase 활성도가 비교적 좁은 범위에서 용출되었으며 avicel 분해활성도는 다른 두 배지의 경우 두번째 peak에 해당하는 220 mM 염농도 부근에서 하나의 peak로만 용출되었다. KC-flock 배지의 경우 avicel 분해활성도는 76 kDa의 단백질과 비교적 잘 부합되었으며 β-glucosidase 활성도를 포함하는 분획들 중에는 다른 두 배지의 경우와 마찬가지로 120 kDa의 단백질이 분포했다(Fig. 7). COA 배양여액 중의 단백질을 분리한 후 avicel 분해활성도가 가장 높은 두 분획을 avicel 기질에 반응시켰을 때 Fig. 8에서 보는 바와 같이 150 mM 염농도 분획 중에 포함된 avicel 분해활성도에 의해서는 셀로비오스와 함께 포도당이 주된 생성물이었으며 그 보다 높은 염농도에서 용출되는 활성도에 의해서는 주로 셀로비오스가 생성되었다.

고 찰

섬유소 가수분해효소 유도물질로서 COA, avicel 및 KC-flock 등의 탄소원을 포함하는 배지에서 *P. verruculosum*을 배양했을 때 배양여액 중에 분자량 60K로부터 76K 범위의 단백질들이 전체 단백질의 거의 대부분을 차지했으며(Fig. 3과 4) 이들 단백질들이 고속 액체크로마토그라피 방법으로 각 조단백질 시료를 분리했을 때 avicel 분해활성과 이들 단백질의 분포가 대체로 일치했다(Fig. 5, 6과 7). 천연섬유소 분해활성이 높은 균주인 *T. reesei* 배양여액으로부터 avicel을 분해하는 CBH가 2종류 정제되었는데 이들 CBH는 비활성도가 매우 낮은 반면 천연섬유소에 대한 친화력이 크며 배양여액 단백질의 거의 대부분(60% 이상)을 차지하고(11) SDS를 포함하는 전기영동 방법으로 추정된 분자량이 60K 이상으로 보고된 바 있다. 이러한 점들로 미루어 avicel 혹은 COA 배지에서의 *P.verruculosum* 배양여액 중에 있는 60kDa 및 66kDa의 단백질과 아울러 KC-flock 배지여액의 76kDa 단백질이 avicel 분해활성을 갖는 단백질로 추정되었다. COA 및 avicel과 KC-flock 등의 유도물질에 의하여 생성되는 avicel 분해효소의 이러한 차이가 유도물질에 의한 유전자 발현의 차이가 기인하는지 혹은 효소단백질의 번역 후 변형의 차이에 기인하는지는 각각 효소를 정제한 후 검토되어야 할 것으로 생각되었다. Avicel 기질에 이들 단백질을 포함하는 분획을 가하고 반응시켰을 때 반응생성물이 포도당과 셀로비오스였으며 삼당류 이상의 올리고당류가 거의 검출되지 않았으므로(Fig. 8) 이들 avicel 분해활성도는 exocellulase로 추정되었다.

*P. verruculosum*의 배양기간에 따른 β-glucosidase의 변화(Fig. 1과 3)나 크로마토그라피 분획 중의 β-glucosidase의 분포는 120kDa 단백질의 변화와 잘 부합되었다(Fig. 5, 6과 7) 따라서 *P. verruculosum* 배양여액 중 분자량이 가장 큰 120kDa의 단백질이 β-glucosidase 활성을 갖는 주된 효소로 생각되었다. 이는 일반적으로 β-glucosidase들의 분자량이 섬유소 분해효소 복합체 중 가장 크다는 보고와 일치했다. CMC를 분해시키는 endoglucanase들은 주로 60kDa보다 작은 단백질인 것으로 추정되었다.

요 약

Penicillium verruculosum 섬유소 분해효소의 유도물질인 KC-flock, avicel 및 cellobiose octaacetate (COA)를 유일한 탄소원으로 포함하는 배지에서 21일간 배양하면서 배양여액 중의 섬유소 분해효소 각 성분의 활성도와 전기영동상의 단백질 양상을 검토하였다. 배양여액 중의 총단백질 생정 및 섬유소 분해활성도의 유도효과는 COA 배지가 다른 두 배지의 3배 이상이었다. 배양기간의 증가에 따라 배양여액 중의 총단백질량이 증가되었는데 CMC 분해활성이나 β-glucosidase 활성도의 증가보다는 avicel 분해활성도의 증가가 총단백질량의 증가와 유사했다. 전기영동상의 단백질 양상은 배양 초기에는 각 배지의 경우 달랐으나 배양기간이 증가함에 따라 비슷해졌으며, 60,000 내지 75,000의 분자량을 갖는 단백질들이 배양여액 중의 전체 단백질의 거의 대부분을 차지했다. 각 배양여액 중의 단백질을 이온교환수지를 이용한 고속 액체크로마토그라피로 분리한 각 분획 중의 섬유소 분해효소 각 성분의 활성도와 전기영동상의 단백질 양상으로부터 배양여액 중의 단백질의 거의 차지하는 60~75kDa의 단백질들의 avicel 분해활성과 관계가 있으며 이러한 단백질은 적어도 3종류가 있음을 추정할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1988년도 한국과학재단에서 지원하는 목적기초연구비에 의하여 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chung, K.C., *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **12,** 57 (1984).
2. Rye, D.D.Y. and M. Mandels, *Enzymes, Microbiol. Technol.*, **2,** 91 (1980).
3. Chung, K.C., *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **123,** 165 (1984).
4. 丁基喆, 河合啓一, 入島重昻, 江口良友, 발효공학회지, 일본 **60**(5), 355(1982).
5. Chung, K.C., *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15,** 388 (1987).
. Miller, G.L. *Anal. Chem.* **31,** 426 (1959).
7. Desphande, M.V., K.E. Erikssom and Pettersson. L.G. *Anal. Biochem.* **138,** 481 (1984).
8. M.A.K. Markwell, S.M. Haas, N.E. Tolbert and L.L. Bieber, *Methods Enzymol.*, **72,** 296 (1981).
9. Laemmli, U.K., *Nature,* **227,** 680 (1970).
10. Kennedy, J.F., White, C.A. and Riddiford, C.L., *Starch,* **31,** 25 (1979).
11. Dopson, M.J., Tuite, M.F., Roberts, N.A., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M. *Neucleic Acid Res.* 10, 2625 (1982).

(Received June 27,1990)