

大豆 β -amylase Isozyme 의 分離 및 精製

池 義 相

信興專門大學 食品營養科

Separation and Purification of Soybean β -amylase Isozymes

Eui-Sang Ji

Department of Food and Nutrition, Shin Heung Junior College

ABSTRACT

The soybean β -amylase [α -1, 4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2] is composed of seven isozymes(I', I, II, III, IV, V and VI), and isozyme II and IV are the main components among these.

The purification of β -amylase isozymes from soybean whey were performed by ammonium sulfate fractionation, CM-Sephadex C-50 column chromatography, DEAE-Sephadex chromatography and Gel filtration. The resulted purity of β -amylase was throughly confirmed by electrophoresis, and then determined its isoelectric point and molecular weight. The results obtained were as follows ;

1. Five active fractions of soybean β -amylase were derived on CM-Sephadex C-50 column chromatography.
2. Seven active bands of β -amylase isozymes were detected by isoelectric focusing gel electrophoresis, and their isoelectric points(I' to VI) were 5.07, 5.15, 5.25, 5.40, 5.55, 5.70 and 5.93, respectively.
3. Isozyme II and IV were main components of soybean β -amylase.
4. The molecular weights of both isozyme II and IV were determined to be 56,000 daltons by the result of SDS polyacrylamide gel electrophoresis.
5. Km values of main isozyme II & IV for amylopectin were determined to be 2.25 mg/ml, which suggest the same function of each isozyme.

I . 緒 論

最近 들어 maltose 製造를 비롯한 食品工業은

물론 醱酵工業, 醫藥品 工業 等에까지 널리 利用 되면서 產業的으로 重要한 位置를 차지하고 있는 β -amylase[α -1, 4-glucan maltohydrolase,

EC. 3.2.1.2]는 澱粉이나 glycogen 과 같은 α -1, 4-glucan 의 非還元性 末端으로부터 maltose 單位로 順次 切斷하여 最終生成物로 β -maltose 와 β -limit dextrin 으로 分解하는 Exo型 酵素¹⁻²⁾로, 1924年 Kuhn³⁾에 의하여 처음으로 β -amylase 라 命名되었다.

高等植物에만 存在하는 것⁴⁻⁹⁾으로 알려져 온 β -amylase 는 最近 微生物에도 存在하는 것¹⁰⁻¹¹⁾으로 밝혀졌으며, 現在까지 大豆^{5,12-16)}, 고구마¹⁷⁻¹⁹⁾, 밀²⁰⁻²¹⁾, 麥芽⁴⁾, 보리²²⁻²³⁾, 쌀²⁴⁻²⁵⁾, 수수⁷⁾, 무우⁷⁻⁹⁾, 옥수수²⁶⁾, 완두²⁷⁾ 등에서 抽出, 精製된 바 있다.

고구마 β -amylase^{17,28-29)}가 유일하게 分子量 50,000 dalton 程度의 同一 subunit 4個로 形成된 tetrameric enzyme 인데 반하여 大豆^{6,12)}를 비롯한 밀²⁰⁾, 보리²²⁾, 쌀²⁵⁾, 수수⁷⁾, 무우⁸⁾ 등의 高等植物에서 精製된 β -amylase 는 分子量 50,000-60,000 dalton 程度의 monomeric enzyme 으로 報告되었으며, 植物性 β -amylase 는 아미노酸 組成, 等電點, 反應最適 pH 등의 理化學的 性質이 類似²⁹⁾한 것으로 알려져 있고, 그 밖에도 高等植物系 β -amylase 에 대해서는 遺傳的인 面과 β -amylase 活性的 細胞內制御와 關聯한 多様な 特性도 報告³⁰⁻³¹⁾되어 있다.

또한, 대부분의 β -amylase 는 ρ -chloromercuribenzoic acid, N-ethylmaleimide, iodoacetamide 등의 SH 試藥에 의해 失活^{29,32)}되므로 SH 酵素라고 알려져 왔으나, 大豆 β -amylase¹³⁾ 및 고구마 β -amylase³³⁾의 경우는 SH 基가 酵素의 活性化에 반드시 必須的인 것이 아님이 밝혀지는 등 最近들어 精製된 β -amylase 의 繼續的인 需要增加와 더불어 많은 研究가 이루어지고 있다.

本 研究에서는 β -amylase 를 大豆에서 分離 및 精製하여 여러가지 isozyme 이 存在하는 것을 確認하였으며, 그에 따른 活性分割을 얻어 主要 isozyme, 等電點, 分子量, Km 值 등을 檢討하였다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材 料

本 實驗에 使用된 材料는 1988年 3月 日本 大阪, 不二製油(株)로부터 供給받은 soybean whey (脫脂大豆의 酸抽出液)로써, 여러가지 品種이 섞여 있는 것을 使用하였다.

特殊試藥으로는 Pharmarite(特級, Pharmacia Co., Sweden)를 使用하였고, 機器 및 裝置로는 Flat Bed Apparatus FBE-3000(pharmacia Co., Sweden), densitometer OZ-700(Asuka Co., Japan)을 使用하였다.

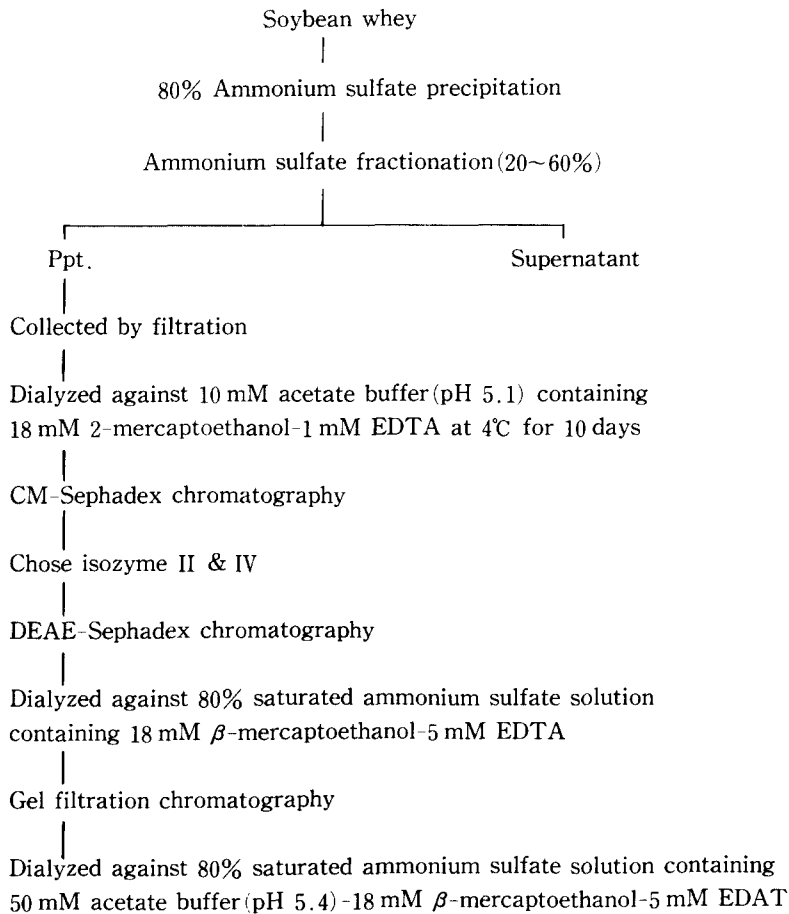
2. 方 法

1) 酵素의 精製

大豆 β -amylase 의 精製는 等電點이 다른 成分을 分離하기 위해, Morita 等³⁴⁾의 方法을 약간 變形시켜 Fig. 1에서 보는 바와 같이 다음과 같은 順序로 行했다.

(Step 1) Ammonium sulfate 沈澱物 形成 : Soybean whey 中の 酵素를 ammonium sulfate 80% 飽和溶液으로 沈澱시킨 다음, 濾過에 의하여 沈澱物을 모았다. 얻어진 沈澱物을 ammonium sulfate 20% 飽和狀態가 되도록 하기 위하여 3.5 mM β -mercaptoethanol 과 1 mM EDTA 가 含有된 4倍量의 蒸溜水에 녹였고, 그 後 ammonium sulfate 의 濃度를 60% 飽和狀態가 되도록 높은 다음 沈澱物을 다시 濾過에 의하여 모았다. 이것은 ammonium sulfate 의 除去를 위해 18 mM 2-mercaptoethanol-1 mM EDTA-10 mM acetate buffer(pH 5.1)에서 10日間(4°C) 透析시킨 뒤, 다음의 CM-Sephadex chromatography 를 4°C에서 行했다.

(Step 2) CM-Sephadex chromatography ; CM-Sephadex C-50 column(2.5×90 cm)은 18 mM 2-mercaptoethanol-1 mM EDTA-10 mM acetate buffer(pH 5.1)로 平衡化시킨 後 酵素溶

Fig. 1. Purification of soybean β -amylase

液을 column에 注入시켰다. Column은 앞의 buffer溶液 2.5 l로 씻었으며, 溶出은 buffer의 濃度와 pH를 다음과 같이 增加시키면서 行하였다. ①各各 250 ml씩의 10 mM acetate buffer (pH 5.1)와 50 mM acetate buffer (pH 5.1)에서 勾配溶出한 다음, 50 mM acetate buffer (pH 5.1) 500 ml로 column을 씻었다. ② 50 mM acetate buffer의 pH를 5.1에서 5.6까지 各各 600 ml씩으로 勾配溶出한 다음, 50 mM acetate buffer (pH 5.6) 1 l로 column을 씻었다. ③ 50 mM acetate buffer의 pH를 5.6에서 6.1까지 各各 600 ml씩으로 勾配溶出한 다음, 50 mM

acetate buffer (pH 6.1) 750 ml로 column을 씻었다. ④各各 600 ml씩의 50 mM acetate buffer (pH 6.1)와 50 mM sodium acetate buffer (pH 7.7)로 勾配溶出한 다음, 다시 50 mM sodium acetate buffer (pH 7.7) 2 l로 column을 씻었다.

CM-Sephadex C-50 column에서 5個의 活性 分割을 얻었으며, 이 중 isozyme II와 IV를 다음 step에 의해 精製하였다.

(Step 3) DEAE-Sephadex chromatography; DEAE-Sephadex column (2.5×92 cm)에서 두가지 isozyme에 대하여 陰이온 交換

chromatography 를 행하였는데, 18 mM β -mercaptoethanol-50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 平衡化시킨 後 酵素溶液을 column 에 주입시켰다. Column 은 앞의 buffer 溶液 1 l 로 씻었으며, 溶出은 같은 buffer 에서 0부터 0.5 M 까지 NaCl 濃度を 增加시키면서 直線勾配溶出 하였다. 溶出된 두가지 isozyme 의 fraction 은 各各 따로 모아 18 mM β -mercaptoethanol-5 mM EDTA-80% ammonium sulfate 飽和溶液에 透析시켰다.

(step 4) Gel filtration; Isozyme II와 IV는 最終的으로 0.2 M NaCl-7 mM β -mercaptoethanol-0.1 M phosphate buffer (pH 6.0)로 4°C에서 平衡化시킨 Sephadex G-100 column (2.5×110 cm)을 使用한 Gel filtration 에 의해 精製하였다. 前述한 酵素沈澱物은 遠心分離에 의해 모아 平衡緩衝溶液(蛋白質 濃度 50 mg/ml)에 녹였으며, chromatography 는 同一한 緩衝溶液으로 實施하였다. 두가지 isozyme 에 대하여 반복된 實驗에서 높은 活性을 띤 fraction 들은 따로 모았으며, 回收된 溶液은 18 mM β -mercaptoethanol-5 mM EDTA-50 mM acetate buffer (pH 5.4)-80% ammonium sulfate 飽和溶液에서 透析하였다.

2) 酵素的 活性 測定

β -amylase 活性은 Bernfeld 의 方法¹⁸⁾을 약간 變形하여 測定하였다. 즉, Schoch's B fraction³⁵⁾인 amylopectin 1g을 基質로 使用, 0.1 M acetate buffer (pH 5.4) 100 ml에 녹여 37°C에서 反應시켰다. 3,5-dinitrosalicylate 를 生成하는 反應의 吸光度는 540 nm 에서 測定하였다

3) 蛋白質 含量 測定

精製中の 蛋白質 含量은 Lowry 等の 方法³⁶⁾에 따라 測定하였다. 이 때의 標準蛋白質로는 bovine serum albumin 을 使用하였다. 精製된 isozyme II와 IV의 濃度는 280 nm 에서 $17.0 \times 10^2 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 의 吸收率을 使用하여 分光光度計로 測定하였

다.

4) 電氣泳動

① Polyacrylamide gel 電氣泳動

Polyacrylamide gel 電氣泳動은 Davis 의 方法³⁷⁾에 의하여 행하였다. Polyacrylamide gel 의 濃度는 6.0%로 重合하여 buffer (pH 8.3) 중 에서 2時間 동안 泳動(80 voltage 一定壓)하였으며, 指示藥으로는 brom phenol blue (BPB)를 使用하였고, 泳動後의 蛋白質은 Coomassie Brilliant Blue R-250³⁸⁾으로 着色하여 確認하였다.

② Isoelectric focusing gel 電氣泳動

Isoelectric focusing gel 電氣泳動은 slab polyacrylamide gel 위에서 행하였다³⁹⁾. Pharmarite (pH 3-10)는 Pharmacia, Sweden 으로 부터 購入하였고, 2% 溶液으로 만들어 使用하였다. Acrylamide 와 bisacrylamide 의 濃度는 各各 5%와 7%로 하였으며, 大豆種子로부터의 酵素 溶液은 Morita 等⁴⁰⁾이 행한 方法에 따라 調製하였다. 各 酵素溶液 15 μ l씩을 Pharmacia Flat Bed Apparatus FBE-3000 의 slab gel 에 投入 하고, 電氣泳動을 0°C, 5 mA, 200~900 V 의 一定한 電流에서 행하였다. 活性染色은 泳動 後 gel 을 0.5 M acetate buffer (pH 5.4)의 20倍 溶液에 10分間 담근 다음, 다시 gel 을 1% soluble starch-0.2 M acetate buffer (pH 5.4)의 15倍 溶液에 室溫에서 12分間 담겨 두었다. 그 後 gel 을 0.02% iodine-4% potassium iodide 溶液에 담귀 진한 갈색으로 着色시켰고, amylase 活性은 흐릿한 band 로 檢出되었다. 한편, densitometry 는 Asuka Model OZ-700 densitometer 와 photographic film 을 使用하였으며, 蛋白質 band 는 精製된 大豆 β -amylase 의 isoelectric focusing gel 電氣泳動 後 즉시 Coomassie Brilliant Blue G-250³⁸⁾으로 着色하였다.

③ SDS polyacrylamide gel 電氣泳動

Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 電氣泳動은 Laemmli 의 方法⁴¹⁾에 의

해 행하였다. Sample 量으로는 10 μ g을 使用하였고, 蛋白質은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 着色하여 確認하였으며, 指示藥으로 使用한 BPB의 靑色 marker band가 밑부분에 올 때까지 4時間 동안 80 voltage로 泳動하였다.

III. 結果 및 考察

1. 酵素의 精製

Soybean whey로부터 精製한 大豆 β -amylase를 CM-Sephadex column으로 chromatography한 結果는 Fig. 2와 같이 i, ii, iii, iv, v의 5個 活性分劃(active frac-

tion)을 나타냈다. Isoelectric focusing gel 電氣泳動의 結果에 의하면 分劃 i에는 isozyme I', I, II를 含有하고, 分劃 ii에는 isozyme II, 分劃 iii에는 isozyme II, III, IV, 分劃 iv에는 isozyme III, IV, V, 分劃 v에는 isozyme VI를 各各 含有하는 것으로 나타났으며, 그 중에서 主된 isozyme으로 되어 있는 isozyme II와 IV는 各기 活性分劃 ii와 iv를 차지하고 있어, 이들 isozyme을 따로 모아 Morita 등³⁴⁾의 方法에 따라 各기 DEAE-Sephadex chromatography, Gel filtration through Sephadex G-100에 의하여 精製하였으며, 그 結果는 Fig. 3~4에서 보는 바와 같다.

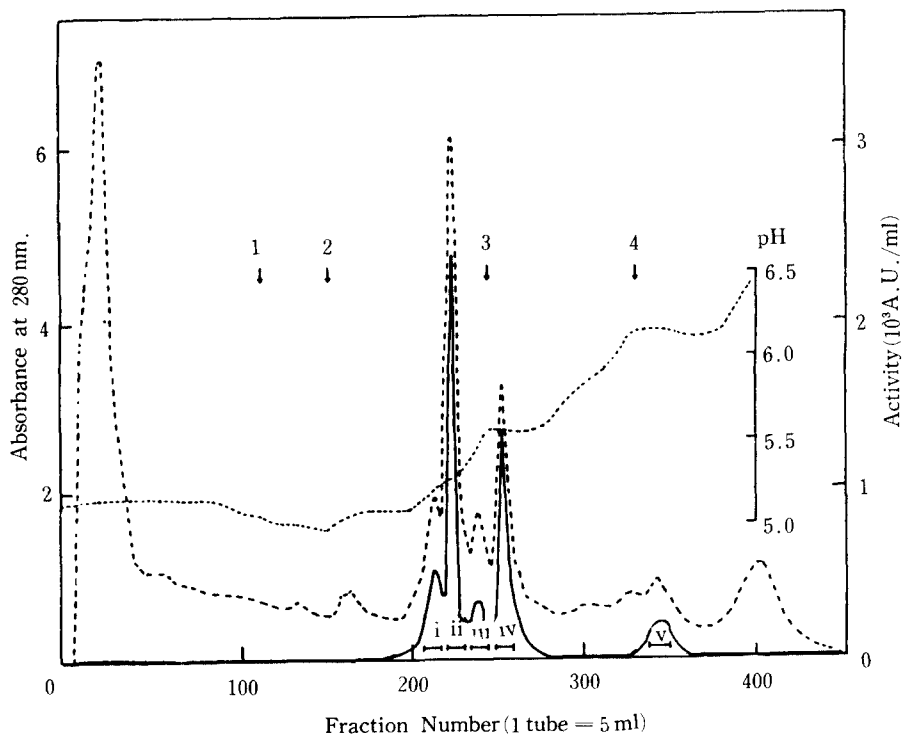


Fig. 2. Separation of soybean β -amylase isozymes on a CM-Sephadex C-50 column, 2.5 \times 90 cm. 1, 2, 3 and 4 represent the changes of the elution buffer systems. ---, absorbance at 280 nm; —, activity of β -amylase; and , pH of eluates. i, ii, iii, iv and v indicate collected fractions.

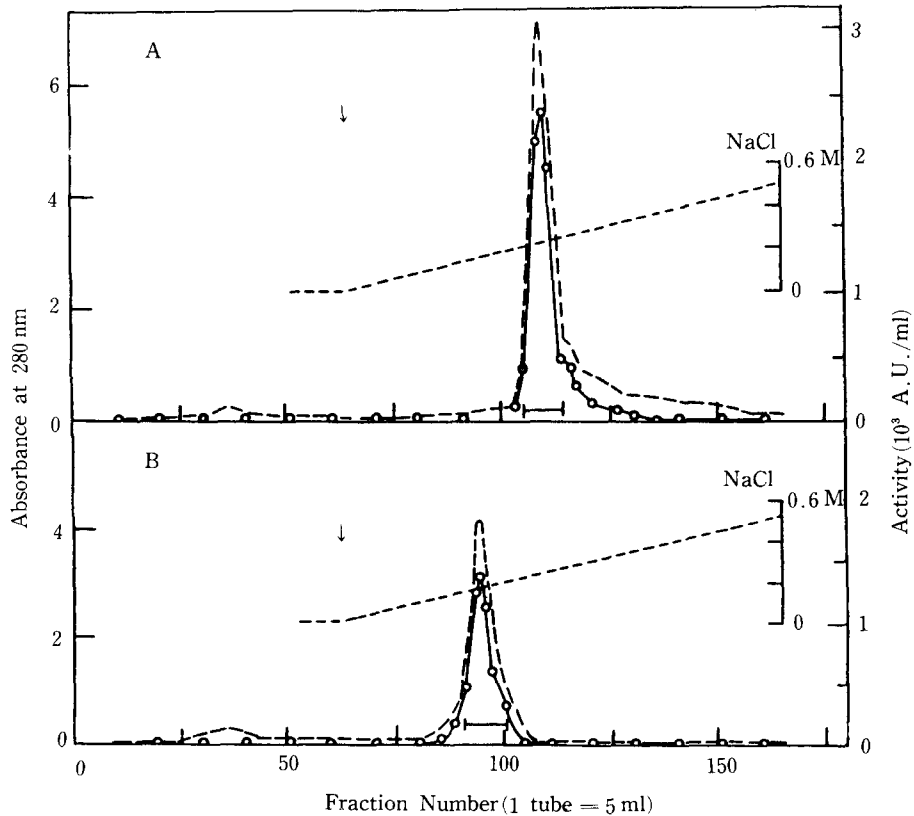


Fig. 3. Elution profiles of soybean β -amylase isozymes from DEAE-Sephadex columns, 2.5 \times 92 cm

A, Isozyme II fraction from CM-Sephadex chromatography; B, Isozyme IV fraction from CM-Sephadex chromatography. Vertical arrows represent the start of an increasing gradient of NaCl concentration:---, absorbance at 280 nm;—○—, activity of β -amylase; and-----, concentration of NaCl in the elution buffer.

한편, 大豆 β -amylase isozyme II와 IV에 대한 精製過程時의 活性, 蛋白質 含量 및 收率은 Table 1과 같다.

2. 電氣泳動에 의한 純度檢定

1) Polyacrylamide gel 電氣泳動

Polyacrylamide gel 電氣泳動에 의한 isozyme II와 IV는 Fig. 5와 같이 各各 single band로 나타났고, 2種類 isozyme의 서로 다른

移動性이 明確하게 分離되었으며, 이것은 Morita 등³⁴⁾의 報告와 一致하였다.

2) Isoelectric focusing gel 電氣泳動

精製한 大豆 β -amylase isozyme의 均一性을 알아보기 위하여, β -amylase 抽出液 및 精製한 isozyme을 isoelectric focusing gel 電氣泳動에 의하여 分析하였다. Amylase의 活性은 I₂-KI 溶液으로 gel을 着色하여 알아 보았고, 그 結果

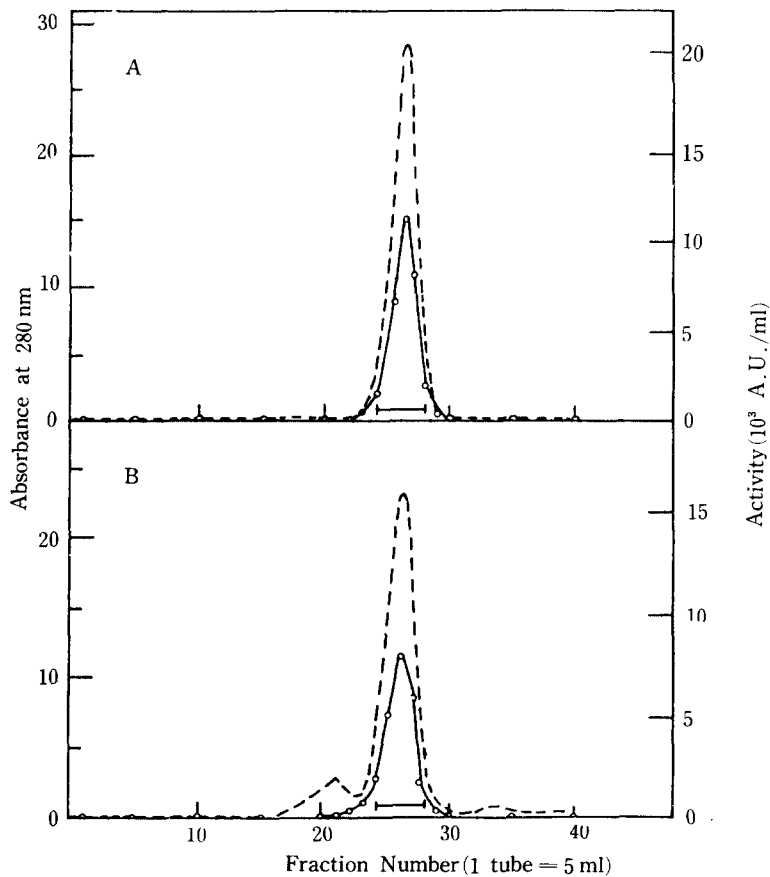


Fig. 4. Gel filtration chromatography of soybean β -amylase on a Sephadex G-100 column, 2.5 \times 110 cm

A, Isozyme II fraction from DEAE-Sephadex chromatography; B, Isozyme IV fraction from DEAE-Sephadex chromatography. ---, absorbance at 280 nm; \circ — \circ , activity of β -amylase

Fig. 6 A 에서와 같은 isoelectric focusing pattern 과 β -amylase isozyme 에 대한 pI 値를 얻었다. 즉, 7 가지 active band 가 檢出되었고, 그 等電點(I'에서 VI까지)은 5.07, 5.15, 5.25, 5.40, 5.55, 5.70, 5.93 을 各各 나타냈다. 한편, 精製한 isozyme II와 IV는 Fig. 6 B 에서와 같이 모두 均一하게 나타나 그 純度가 確認되었으며, 等電點은 5.25와 5.55로 各各 나타났다.

3) SDS polyacrylamide gel 電氣泳動

大豆 β -amylase isozyme II와 IV를 SDS polyacrylamide gel 電氣泳動으로 分析한 結果는 Fig. 7 과 같다. 各各의 isozyme 은 같은 移動度를 나타냄과 동시에 그 純度가 確認되었으며, 分子量은 56,000 dalton 으로써 Gertler 等⁶⁾이 報告한 61,700 dalton 과는 상당한 差異를 보였고, Morita 等¹²⁾이 報告한 57,000 dalton 보다는 약간 작았다.

Table 1. Summary of purification of soybean β -amylase isozyme II and IV

Fraction	Volume(ml)	Total activity (10^3 A.U.)	Total protein(g)	specific activity (A.U./mg protein)	Yield(%)
Soybean whey	63,000	6,020	484.0	12.4	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 25-60% satn.	2,160	5,280	110.0	48.0	88.0
Dialysis	1,590	4,100	47.0	87.2	68.1
CM-Sephadex	II 1,500	1,480	1.77	836	24.6
C-50	IV 1,020	662	1.16	571	11.0
DEAE- Sephadex	II 210	1,110	1.27	870	18.4
	IV 220	430	0.538	800	7.1
Gel filtration	II 150	890	1.02	875	14.8
	IV 80	370	0.435	850	6.1

The yields of the other isozymes in this step were as follow ;

Isozyme I + I' (fraction i) : 5.4%

Isozyme II + III + VI (fraction iii) : 2.2%

Isozyme IV (fraction v) : 2.5%

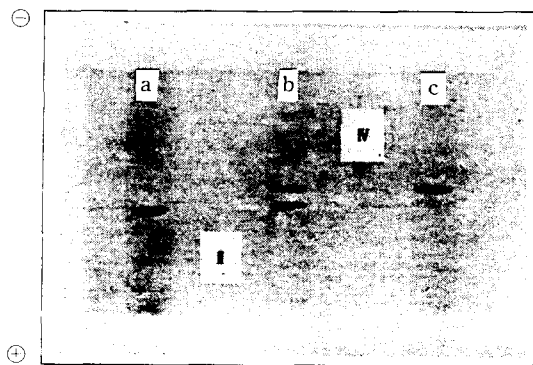


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of soybean β -amylase. The protein bands were detected by Coomassie Brilliant Blue R-250. (a) Isozyme II, (b) Isozyme II & IV, (c) Isozyme IV

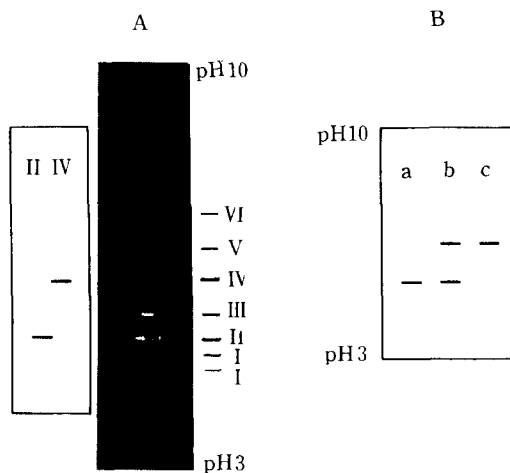


Fig. 6. A : Isoelectric focusing patterns of purified soybean β -amylase isozyme II & IV and commercial defatted

soybean meal. The gels were stained by activity

B : Gel isoelectric focusing of β -amylase isozyme II and IV. The gel was stained by Coomassie Brilliant Blue G-250 (a : Isozyme II, b : Isozyme II & IV, c : Isozyme IV)

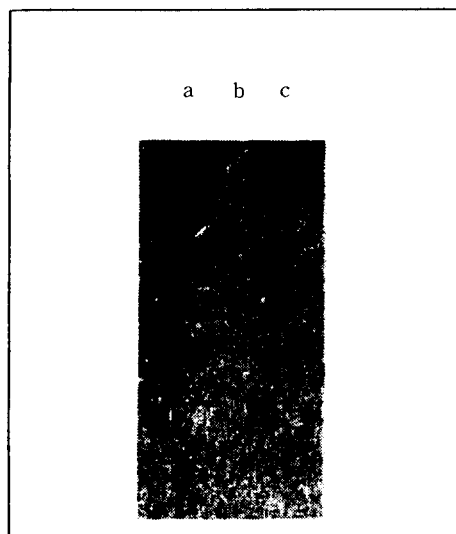


Fig. 7. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of soybean β -amylase isozymes
a : Isozyme II, b : Isozyme II and IV,
c : Isozyme IV

以上の結果를綜合해서 大豆 β -amylase에 있어서 主成分인 isozyme II와 IV를 比較하여 Table 2에 나타냈으며, 이 때의 amylopectin에 대한 Km値는 isozyme II와 IV 모두 2.25 mg/ml로써 β -amylase로서의 機能은 같은 것으로 確認되었다.

IV. 要 約

大豆 β -amylase [α -1,4-glucan maltohydrolase, EC. 3.2.1.2]는 7가지 (I', I, II, III, IV, V, VI)의 isozyme을 갖으며, 그 중

isozyme II와 IV가 主成分으로 되어 있다. 大豆 β -amylase의 精製를 위하여 soybean whey로부터 黃酸암모늄분劃, CM-Sephadex C-50 column chromatography, DEAE-Sephadex chromatography 및 Gel filtration을 행하고, 電氣泳動으로 그 純度を 確認한 後, 等電點, 分子量 測定 등을 행한 結果는 다음과 같다.

1. CM-Sephadex C-50 column chromatography로부터 大豆 β -amylase의 5個 活性分劃을 얻었다.

2. Isoelectric focusing gel 電氣泳動에 의해 β -amylase isozyme의 7개 活性 band를 檢出하였으며, 그들의 等電點(I'에서 VI까지)은 5.07, 5.15, 5.25, 5.40, 5.55, 5.70, 5.93으로 各各 나타났다.

3. 大豆 β -amylase의 主成分은 isozyme II와 IV로 나타났다.

4. SDS polyacrylamide gel 電氣泳動의 結果, isozyme II와 IV는 모두 分子量이 56,000 dalton으로 나타나 동일하였다.

5. Amylopectin에 대한 Km値는 isozyme II와 IV 모두 2.25 mg/ml로써 β -amylase로서의 機能이 같은 것으로 確認되었다.

VI 參考文獻

1. shukla, J.P.; *J. Indian chem. Soc.*, **21**, 223(1944)
2. Marshall, J.J. and Whelan, W.J.; *Anal. Biochem.*, **52**, 642-646 (1973)
3. Kuhn, R.; *Ber.*, 57 B, 1965 (1924)
4. Piguet, A. and Fischer, E.H.; *Helv.*

Table 2. Comparison of properties of soybean β -amylase isozymes

Isozyme	pI	Mw	Km (mg/ml amylopectin)
II	5.25	56,000	2.25
IV	5.55	56,000	2.25

- Chem. Acta.*, **35**, 257-262 (1952)
5. Fukumoto, J. and Tsujisaka, Y.; *Kagaku to Kogyo*, Osaka (in Japanese), **29**, 124-129 (1955)
 6. Gertler, A. and Birk, Y.; *Biochem. J.*, **95**, 621-627 (1965)
 7. Botes, D.P., Joubert, F.J. and Novellie, L.; *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 415-419 (1967)
 8. Morita, Y. and Wadano, A.; *Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, **37**, 19-27 (1974)
 9. Aibara, S. and Morita, Y.; *Tampakushitsu Kakusan Koso*, **4**, 434-437 (1976)
 10. Fogarty, W.M. and Griffin, P.J.; *J. Applied Chem. Biotech.*, **25**, 229-238 (1975)
 11. Takasaki, Y.; *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1515-1522 (1976)
 12. Morita, Y., Yagi, F., Aibara, S. and Yamashita, H.; *J. Biochem.*, **79**, 591-603 (1976)
 13. Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y.; *J. Biochem.*, **88**, 103-111 (1980)
 14. Mikami, B., Aibara, S. and Morita, Y.; *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 943-953 (1982)
 15. Mikami, B. and Morita, Y.; *J. Biochem.*, **93**, 777-786 (1983)
 16. Mikami, B., Nomura, K. and Morita, Y.; *J. Biochem.*, **94**, 107-113 (1983)
 17. Balls, A.K., Thompson, R.R. and Walden, M.K.; *J. Biol. Chem.*, **163**, 571-572 (1946)
 18. Bernfeld, P.; *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.) Vol. I, Academic Press, New York, 149-158 (1955)
 19. Roy, F. and Hegde, M.V.; *J. Chromatogr.*, **324**, 489-494 (1985)
 20. Flachuk, T. and Tipples, K.H.; *Cereal Chem.*, **43**, 62-79 (1966)
 21. Niku-Paavola, M.-L., Nummi, M., Kachkin, A., Daussant, J. and Enari, T.-M.; *Cereal Chem.*, **49**, 580-585 (1972)
 22. Shinke, R. and Mugibayashi, N.; *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1381-1390 (1971)
 23. Nummi, M., Niku-Paavola, M.-L. and Enari, T.-M.; *Acta. Chem. Scand.*, **26**, 1731-1732 (1972)
 24. Matsui, H., Chiba, S., Shimomura, T. and Takahashi, N.; *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2239-2240 (1975)
 25. Matsui, H., Chiba, S. and Shimomura, T.; *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 841-847 (1977)
 26. Chao, S.E. and Scandalios, J.G.; *Biochem. Genetics*, **3**, 537-547 (1969)
 27. Yoma, H. and Varner, J.E.; *Plant Physiol.*, **51**, 7781 (1972)
 28. Englard, S. and Singer, T.P.; *J. Biol. Chem.*, **187**, 213-219 (1950)
 29. Thoma, J.A., Spradlin, J. and Dygert, D.; *The Enzymes* 3rd ed. (Boyer, P.D. ed.) Vol. 5, Academic Press, New York, 115-189 (1972)
 30. Nummi, M., Daussant, J., Niku-Paavola, M.-L., Kalsta, H. and Enari, T.-M.; *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 258-260 (1970)
 31. Scandalios, J.G.; *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 225-258 (1974)
 32. Murao, S., Ohyama, K. and Arai, M.; *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 719-726

- (1979)
33. Spradlin, J. and Thoma, J.A.; *J. Biol. Chem.*, **245**, 117-127 (1970)
34. Morita, Y., Aibara, S., Yamashita, H., Yagi, F., Suganuma, T. and Hiromi, K.; *J. Biochem.*, **77**, 343-351 (1975)
35. Schoch, T.J.; *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds.) Vol. III, Academic Press, New York, 5-17 (1957)
36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J.; *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
37. Davis, B.J.; *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964)
38. Blakesley, R.W. and Boezi, J.A.; *Anal. Biochem.*, **82**, 580-582 (1977)
39. Vesterberg, O.; *Biochim. Biophys. Acta.*, **257**, 11-19 (1972)
40. Morita, Y. and Yagi, F.; *Plant and Cell Physiol.*, **20**, 797-802 (1979)
41. Laemmli, U.K.; *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970)
-

(1990년 9월 7일 수리)