Journal of the Korean Chemical Society
1995, Vol. 39, No. 6
Printed in the Republic of Korea

효모 Acetolactate Synthase의 부분 정제와 일반 특성 연구

高恩姬* · 宋秀美 · 金鮮英
덕성여자대학교 자연과학대학 화학과
(1995. 2. 17 접수)

Partial Purification and General Properties of Yeast Acetolactate Synthase

Eun-Hie Koh*, Soo-Mee Song, and Sun-Young Kim
Department of Chemistry, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea
(Received February 17, 1995)

요 약. 효모 acetolactate synthase를 분리 정제하여 기본적인 생화학적 성질에 대한 연구를 수행하였다. 효모를 0.5% glucose, 51 mM K_2HPO_4, 22 mM KH_2PO_4, 8 mM$(NH_4)_2SO_4$, 0.4 mM $MgSO_4$를 포함하는 최소 배지에서 37 ℃로 18시간 동안 배양하였다. 배양된 세포들을 원심분리법으로 수확해 0.1 mM TPP, 0.5 mM DTT, 1 μM FAD와 1 mM $MgCl_2$를 포함하는 20 mM phosphate 완충용액(pH 7.0)에 현탁시켜 하룻밤 동안 방치하였다. 효모를 파쇄한 후 이것의 10,000×g 상층액을 모아 ammonium sulfate 분별 침전법과 DEAE-Sephacel 그리고 leucine-agarose chromatography법을 이용하여 부분 정제하였다. 단백질의 농도, 시간, 온도, pH, 기질농도 등의 영향을 조사하였으며 측정한 결과 최적온도는 50 ℃이고, pH 8.0~8.5 사이에서 최고 값을 나타냈다. K_m과 V_{max}값은 각각 8.4 mM과 17.9 nmol/mg/min으로 얻어졌다. 효소의 안정성은 ethylene glycol과 glycerol의 존재하에서 크게 향상됨이 관찰되었다. Feedback inhibition 연구 결과 Val에 의해 가장 많은 영향을 받았고 Leu에는 거의 영향을 받지 않았다.

ABSTRACT. Acetolactate Synthase (ALS) was partially purified from the yeast and its basic biochemical studies were carried out. Yeast was grown in the minimum media containing 0.5% glucose, 51 mM K_2HPO_4, 22 mM KH_2PO_4, 8 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.4 mM $MgSO_4$ for 18 hours at 37 ℃. The cell was ruptured in the buffer (20 mM phosphate buffer pH 7.0, 0.1 mM TPP, 0.5 mM DTT, 1 μM FAD, and 1 mM $MgCl_2$) following an overnight suspension. The supernatant fraction was collected from 10,000×g and the enzyme was further purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel chromatography and leucine-agarose chromatography. The enzyme activity was measured under the various conditions by the function of protein concentration, time, temperature, pH, and substrate. The optimum temperature was found to be 50 ℃, optimum pH 8.0~8.5. The kinetic parameters, K_m and V_{max} were 8.4 mM and 17.9 nmol/mg/min respectively. Stability of the enzyme was studied with ethlene glycol and glycerol added to the enzyme solution. Both ethylene glycol and glycerol improved the enzyme stability up to 50%. The study of feedback inhibition showed that valine was a strong inhibitior while leucine was a weak inhibitor.

서 론

Acetolactate synthase(ALS, E. C. 4.1.3.18) 또는 acetohydroxyacid synthase(AHAS)는 고등식물과 미생물에서 2분자의 pyruvate나 1분자씩의 pyruvate와 2-ketobutyrate를 결합시켜 각각 acetolactate나 acetohydroxybutyrate를 합성하는 효소로서 Val, Leu, Ile 같은 가지를 가진 아미노산들의 생합성 과정의 초기 단계를 촉매한다.[1]

2 Pyruvate → α-acetolactate + CO_2

Pyruvate + α-ketobutyrate →

α-aceto-α-hydroxybutyrate + CO_2

따라서 동물에는 존재하지 않는 효소이기 때문에 ALS를 작용표적으로 하는 제초제를 사용할 경우 그 안정성 면에서 상당히 효과적일 것이다. 실제로 근래에 ALS가 sulfonylurea와 imidazolinone 화합물 같은 제초제의 표적효소임이 알려짐에 따라 이 효소연구가 더 큰 관심을 끌고 있다.[2] 이 효소는 enteric bacteria와 효모, 그리고 몇 고등식물에서 주로 연구되어졌는데, *E. coli*의 경우 3개의 isoenzyme이 분리되었으며 이들 모두 서로 다른 분자량을 갖는 polypeptide로 구성된 multimer로 thiamine pyrophosphate(TPP), flavin adenine dinucleotide(FAD), Mg^{2+} ion을 cofactor로 필요로 한다.[3~5] 또한 그 밖의 유전자의 발현연구에 대한 지식도 어느 정도 축적되어 있는 상태이다.[6,7] 고등식물의 경우 barley,[8] arabidopsis,[9] pea shoot,[10] chlorella[11] 등에서 부분정제 및 생화학적 연구 결과가 일부 얻어졌으나 그 중요성에 비해 낮은 효소 함량과 효소의 불안정성 때문에 분자수준에서의 자세한 연구에는 어려움이 많다.[12] 이와 관련하여 식물에서 얻어진 ALS 유전자를 이용한 ALS의 생산 여부가 검토되고 있으며 그 중 효모 효소[13]와 arabidopsis[14] 경우 *E. coli*에서 발현시킬 수 있었으나 효소의 불안정성 때문에 아직 대량정제에는 미흡한 것이 현실이다.

본 연구에서는 ALS의 효소작용 메카니즘 연구의 일환으로 자연계의 효모로부터 ALS의 정제를 시도하였으며 그 생화학적 특성을 미생물 및 식물의 ALS와 비교 분석하므로써 앞으로 herbicide resistant ALS 개발에 필요한 기초 정보를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. Acetolactate synthase(ALS)의 효소원으로 사용된 yeast는 시판되는 baker's yeast를 사용하였으며, potassium phosphate와 ammonium sulfate, magnesium chloride, sodium chloride는 덕산이화학 공업주식회사의 것을 구입하였다. Glucose는 Shimakyu 회사(Osaka, Japan)의 것을 creatine과 $MgSO_4$는 TCI 동경화성의 것을 각각 공급받아 사용하였으며, cocarboxylase(TPP), dithiothreitol (DTT), flavine adenine dinucleotide(FAD), leucine-agarose는 모두 Sigma 회사(St. Louis, U.S.A.)의 것을 사용하였다. α-Naphtol과 acetoin(3-hydroxy-2-butanone)은 Aldrich 회사의 것을 DEAE-Sephacel은 Pharmacia 회사에서 각각 구입하여 사용하였다. 분리 정제용 LC 장치와 column들은 Bio-Rad 사의 econo system을 일괄 구입하여 사용하였다. 기타 일반 시약들은 모두 일급 이상의 것을 사용하였다.

Yeast의 배양. ALS를 추출하기 위한 효소원인 baker's yeast는 minimum media(0.5% glucose, 51 mM K_2HPO_4, 22 mM KH_2PO_4, 8 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.4 mM $MgSO_4$와 0.7% yeast로 구성)에서 18시간 동안 진탕배양하여 얻었다. 배양시 온도는 37 ℃를 유지하였으며, shaking 속도는 350 rpm이었다. 배양 후 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 yeast를 수확하고 2~3배의 sonication buffer(50 mM potassium phosphate(pH 8.0), 1 mM EDTA와 1 mM DTT)에 현탁시켜 하룻밤 동안 방치하였다. 이렇게 처리한 효모 세포를 5분간 ultrasonicater를 사용하여 파쇄한 후 10,000×g로 20분간 원심 분리하여 위 말국을 효소원으로 사용하였다.

ALS의 효소활동도 측정. ALS assay는 Lee 등의 방법[10]을 따라 반응 생성물인 acetolactate가 decarboxylation되어 변한 acetoin의 양을 정량하여 측정하였다. 즉, 반응 혼합물(20 mM K-phosphate(pH 7.0), 0.5 mM TPP, 10 μM FAD, 0.5 mM $MgCl_2$, 40 mM Na-pyruvate) 500 μL에 효소용액 50 μL를 넣고 37 ℃에서 40분간 반응시켰다. 이 반응액에 6 N H_2SO_4 50 μL를 넣어 반응을 중지시킨 후에 60 ℃에서 15분간 방치시킨 다음 0.5% creatine(w/v) 500 μL와 5% 1-naphthol/2.5 N NaOH(w/v) 500 μL를 각각 넣고 다시 60 ℃에서 15분간 발색시켰다. 이 용액을 실험실 범용 원심분리기로 약 4,000 rpm으로 2분간 원심 분리한 뒤 위 용액을 취하여 526 nm에서의 흡광도 값을 읽었다.

ALS의 분리 및 정제. 효모 말국을 35~75% ammonium sulfate 침전으로 처리한 뒤, column buffer (20 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 0.1 mM TPP, 0.5 mM DTT, 1 μM FAD, 1 mM $MgCl_2$와 20% glycerol를 포함)로 포화시킨 DEAE-Sephacel ion ex-

change column(3.5 cm×20 cm)에 0.02~0.6 M NaCl 농도 기울기를 걸어서 통과시켰다. 용액의 용출속도는 0.5 mL/min으로 280 nm에서 단백질을 확인한 후 5 mL씩 분획을 받아서 효소활동도를 측정하였다. 효소활성이 확인된 분획들을 모아 PM-10 amicon ultrafiltration membrane으로 약 10배로 농축하여 Leu-agarose affinity column(0.7 cm×20 cm)을 0.2 mL/min의 속도로 3시간 동안 0.01~0.5 M leucine gradient를 걸어서 통과시켰다. 각 분획은 1 mL씩 받았으며, 역시 280 nm에서 단백질을 측정한 후 효소활성을 확인하였다. 각 단계가 끝난 뒤 모아진 분획들은 투석 과정을 거쳐 염 등을 제거하였다.

단백질 정량. 단백질 정량은 Lowry 등의 방법[15]을 따랐으며, 표준 단백질로서 BSA를 사용하였다. 표준곡선은 0~100 μg 범위에서 그렸으며, 흡광계수는 750 nm에서 읽었다.

결 과

효모 ALS의 부분 정제. 진탕 배양하여 얻은 yeast extract를 cell disrupter로 파쇄한 후 35~75% $(NH_4)_2SO_4$ 침전시킨 결과 약 1.7배 정제되었다. 투석하여 염을 제거한 후 DEAE-Sephacel ion exchange chromatography를 수행한 결과(*Fig.* 1) 효소활성은 분획 #50~#60 사이에서 비교적 높은 값으로 깨끗하게 나타났고, 수집된 분획은 약 6배 정제되었다. 여기서 얻어진 분획을 ultrafiltration으로 농축하여 leucine-agarose affinity chromatography한 결과(*Fig.* 2) 약 12배 정제되었음을 알 수 있었다. 이들 세 정제 과정 결과 약 120배 정도의 부분 정제가 이루어졌으며(*Table* 1) 효소 특성은 주로 이것을 사용하였다.

효모 ALS의 일반 특성. 효모 효소의 특성은 순수 정제를 위해서 뿐만 아니라 *E. coli*와 같은 미생물이나 식물로부터 얻은 ALS와 비교하기 위해 기본 일반 특성을 검토하였다. 단백질 영향과 시간에 따른 ALS 활동도를 검토했으며 단백질량은 50 μL까지 그리고 시간은 2시간까지는 비교적 깨끗한 직선관계가 얻어졌다. 온도변화에 따른 ALS의 활성을 조사한 결과 50 ℃가 최적 온도로 나타났다(*Fig.* 3). pH 영향 조사에서 pH 8.0~8.5일 때 가장 높은 효소활동도를 보여주었으며(*Fig.* 4), pyruvate에 대한 기질 의존성 실험에서는(*Fig.* 5) K_m값은 8.4 mM로, V_{max}값은 17.9 nmol/mg/min으로 각각 추정되었다.

효모 ALS의 안정성. 효모 ALS의 안정성을 연

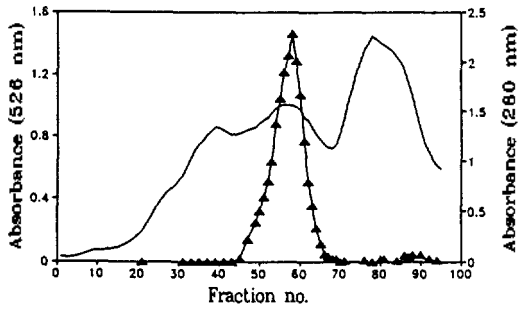

Fig. 1. Elution profile of DEAE-sephacel chromatography of yeast ALS. -▲-, ALS activity; ---, protein.

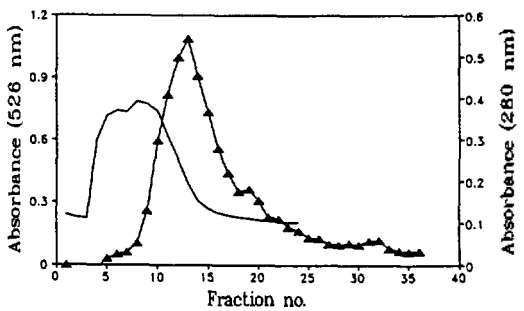

Fig. 2. Elution profile of leucine-agarose chromatography of yeast ALS, -▲-, ALS activity; ---, protein.

Table 1. Purification of yeast acetolactate synthase step

Step	Protein (mg/mL)	Specific activity (U*)	Recovery (%)	Purification fold
Crude enzyme	1.660×10^{1}	0.09852	100	1
$(NH_4)_2SO_4$ (35~75%)	7.600×10^{-2}	0.1682	45.78	1.707
DEAE-Sephacel	1.155×10^{-2}	0.9901	6.958	10.05
Leucine-agarose	7.632×10^{-4}	11.93	0.460	121.05

*1U of specific activity was defined as the absorbance at 526 nm per mg of protein per min.

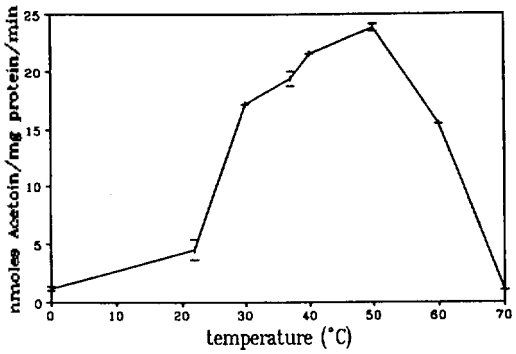

Fig. 3. Temperature dependence of the yeast ALS activity.

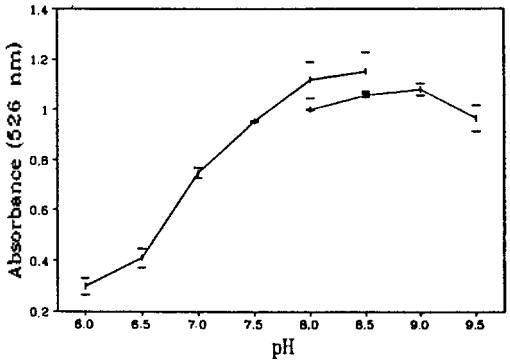

Fig. 4. Effect of pH on the activity of yeast ALS. ---, K-phosphate buffer; ——, Tris-HCl buffer.

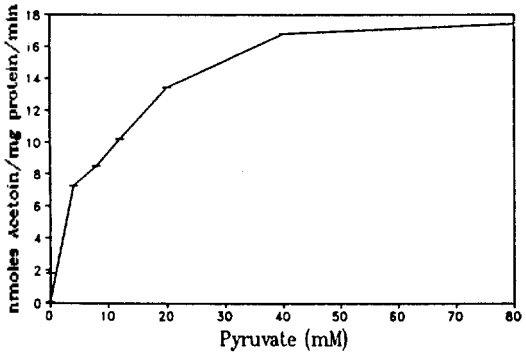

Fig. 5. Substrate dependence of the yeast ALS activity.

구하기 위하여 몇 가지 시약을 효소 추출액에 첨가하여 4℃에 보관한 결과는 다음과 같다(*Fig.* 6). 먼저 대조군으로서 시약을 첨가하지 않은 효소의 경우 그 활동도는 약 5시간 뒤 50% 정도로 감소하였으며 3일

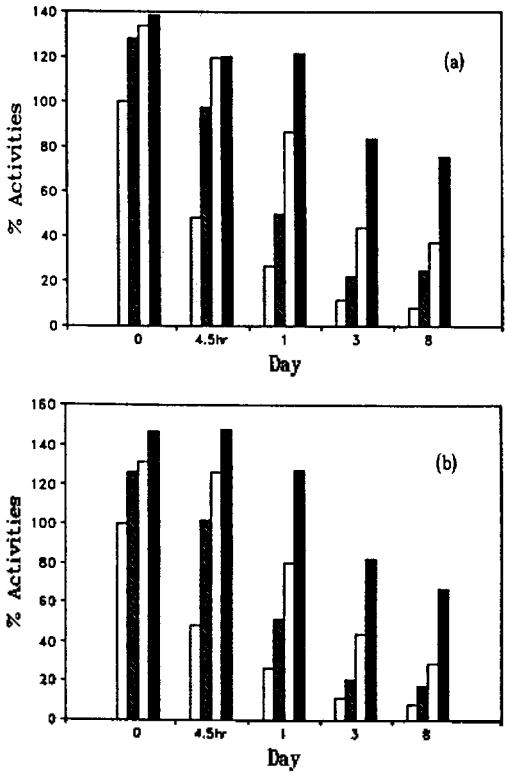

Fig. 6. (a) Effect of glycerol on the stability of yeast ALS. (b) Effect of ethylene glycol on the stability of yeast ALS. ▥, none; ▧, 10% added; □, 20% added; ■, 40% added.

뒤에는 20% 이하, 8일 뒤에는 8% 이하의 활동도만을 유지하였다. 그러나 glycerol 또는 ethylene glycol을 첨가한 효소의 경우 그 농도 증가에 따라 활동도는 물론 안정성도 크게 증가하였는데 40%의 glycerol 또는 ethylene glycol을 첨가했을 때는 24시간 경과 후까지 대조군보다 약 120~150% 가까이 활성화되는 것으로 나타났으며, 8일 경과했을 때도 40% glycerol을 첨가한 것은 75%의 활동도를 40% ethylene glycol 첨가한 것은 65% 정도의 활동도를 그대로 유지하는 것으로 나타났다(*Fig.* 6(a)와 (b)).

효모 ALS의 최종 생성물 저해. 일반적으로 ALS는 그 생성물인 Val, Ile, Leu에 의해 end product inhibition되는 것으로 알려져 있다. 효모 ALS의 경우는 *Fig.* 7(a)에서 나타났듯이 Val에 대해서는 상당한 되먹임 저해(feedback inhibition)를 나타내었으나 Ile은 상대적으로 낮게 나타났다. 그리고 흥미

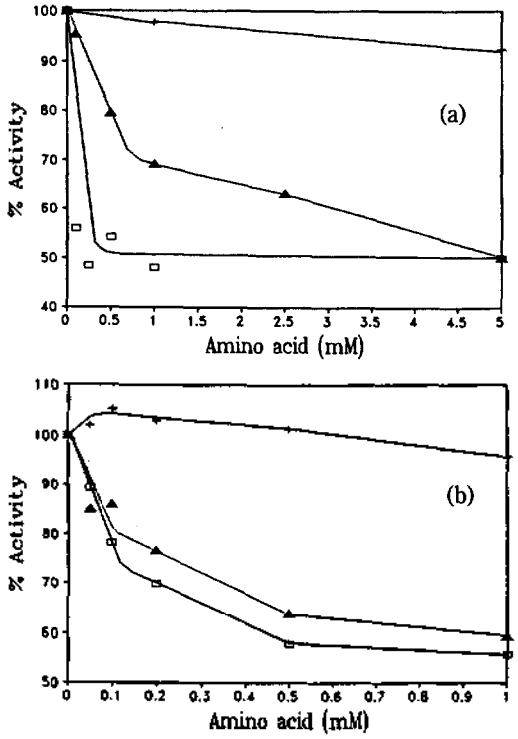

Fig. 7. (a) Effects of end product amino acids on the activity of yeast ALS at the concentration of 40 mM pyruvate. □, Val; ▲, Ile; +, Leu. (b) Effcets of combined end product inhibition on the activity of yeast ALS at the concentration of 40 mM pyruvate; □, Val+Ile; ▲, Val+Leu; +, Leu+Ile.

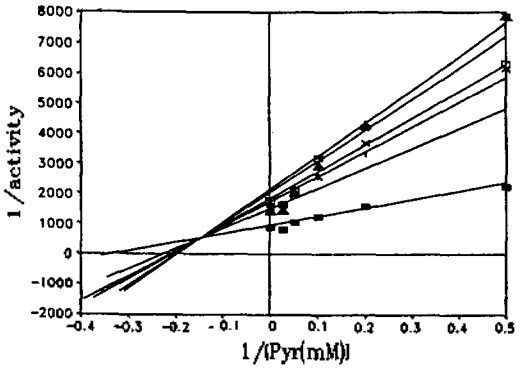

Fig. 8. Kinetics of valine inhibition of the activity of yeast ALS at various pyruvate concentration. ■, 0 mM; ■, 0.1 mM; ×, 0.25 mM; ▲, 0.5 mM; □, 1.0 mM; −, 5.0 mM.

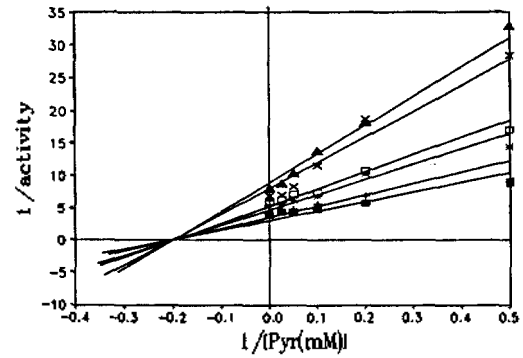

Fig. 9. Kinetics of isoleucine inhibition on the activity of yeast ALS at various pyruvate concentration. ■, 0 mM; +, 0.1 mM; *, 0.5 mM; □, 1.0 mM; ×, 2.5 mM; ▲, 5.0 mM.

룸게도 Leu은 거의 ALS kinetics에 영향을 미치지 못했다. 이 현상을 더 확실히 검토하기 위해 두 개의 ALS 생성 물질을 함께 섞어 검토했으며 Val이 섞인 경우는 항상 상당한 되먹임 저해를 나타내는 것으로 확인되었다(*Fig.* 7(b)). 물론 control로 ALS의 생성물질이 아닌 다른 아미노산을 넣어 검토하였었으며 기대한대로 아무런 저해 현상도 나타나지 않았다. *Fig.* 8과 9에는 되먹임 저해가 확인된 Val과 Ile의 inhibition kinetics를 각각 자세히 검토하였다. Val의 경우 mixed-type inhibition처럼 보였으며 이때 Ki는 3.93 mM이었다(*Fig.* 8). Ile의 경우 noncompetitive inhibition의 양상을 띄었으며 Ki는 4.62 mM이었다 (*Fig.* 9). 이들 관찰로부터 지금까지 알려진 ALS의 end product inhibition도 생성물의 종류에 따라 차이가 있는 것처럼 보여 이의 상세한 규명이 매우 흥미롭게 대두되고 있다.

고 찰

ALS의 분자수준에서의 연구는 구조적으로 연관성이 없는 sulfonylureas, imidazolinones, triazolopyrimidines 등의 몇 제초제들의 표적 효소로써 알려지면서 많은 생리 활성 분자 연구자들과 무공해 신농약 개발 연구팀들의 관심을 끌기 시작했다.[2] 이들 연구의 가장 핵심은 농작 대상 식물로부터 순수한 ALS를 분리하고 이들의 반응 메카니즘과 제초제와의 상관관계를 밝힘으로써 신농약 개발의 근거를 마련하려는 것이다. 그러나 불행히도 대부분의 식물 ALS는 불안정하여 현재 체계적인 메커니즘 연구에 많은 어려움이 따르고 있다.[12] 이의 한 방편으로 효모의 ALS을 이용하기 위해 효모유전자를 *E. coli*의

ALS 유전자 정보를 이용하여 분리했으며,[16] 이를 기초로 효모 ALS를 *E. coli*에서 클로닝하여 발현시키는데 Poulsen과 Stouggard가 1989년 성공했으나 대량 생산의 길은 열리지 못했다.[13] 현재 본 실험에서는 자연계의 효모로부터 ALS의 정제를 직접 시도해 3단계 정제과정에서 120배까지 달성하였으나 순수한 ALS 분리에는 아직 성공하지 못하고 있다. 현 단계의 자연계 효모 ALS의 정제 정도로는 위의 클로닝된 ALS의 분자량인 75 kDa과 직접 비교 확인할 수는 없으나 효소의 일반 특성을 서로 비교할 수 있다. 즉 자연계의 ALS는 최적 pH가 8.0~8.5(*Fig.* 4)인 반면 클로닝된 것은 6.5로 상당한 차이를 보였으며 기질 pyruvate에 대한 K_m값은 8.4 mM대 3.9 mM로 자연계가 약 2배 가량 큰 값을 보이고 있다. 본 실험의 8.4 mM 값은 효모 세포를 단순히 파괴한 값 8 mM과 거의 동일하다.[17] 따라서 클로닝 효모 ALS의 특성이 자연계의 것과 상이한 특성이 있을 가능성이 있다. 다른 식물 ALS의 최적 pH는 barley의 경우 6.5와 8.5 사이의 폭넓은 활성을 갖고 있으며,[8] pea shoots인 경우 pH 8.0으로 밝혀졌다.[10]

ALS 연구의 주요 관심사 중의 하나는 생성물에 의한 되먹임 저해에 대한 실험으로 ALS 제초제의 효능점검과 함께 광범위하게 검토되고 있다. 효모 ALS의 경우 생성물인 Val, Ile, Leu에 대한 저해효과가 각각 다르게 나타났다(*Fig.* 7(a)). 즉 아미노산의 농도가 1 mM일 때 Val은 50% 이상의 저해 효과를 보여주었으나, Ile은 30% 정도, Leu은 2~3% 정도의 아주 적은 저해 효과만을 보여주었다. 따라서 효모 ALS는 생성물질의 종류에 따른 다른 되먹임 저해 현상을 보여주었으며, 이는 pea shoots의 경우 Leu이 가장 많이 저해한 것과 매우 대조적이다.[10] 두 아미노산을 연합해서 되먹임 저해 현상을 검토하면 효모 ALS의 경우는 *Fig.* 7(b)에서 드러난 것과 같이 Val이 포함된 것은 확실히 Val 단독의 경우와 엇비슷한 저해 효과가 있었으나, Ile과 Leu의 경우는 Ile의 저해 효과마저 상쇄되고 오히려 활성화의 경향이 나타났다. 이는 barley나 pea shoots의 경우 두 아미노산이 함께 시너지적 효과를 나타내 더 큰 저해 효과를 보인 것과 상이하다.[8,10] 따라서 ALS는 그 효소원에 따라 생성 물질에 대한 되먹임 저해 현상의 특수성이 다를 뿐 아니라 그 방법에 있어서도 co-operativity가 서로 다를 수 있음을 나타내 주고 있다. 식물은 아니지만 *serratia marcescens*의 ALS는 Val에 민감한 것으로 보고되어 있어 효모 ALS와 유사한 점이 있다.[18] 그러나 Leu의 경우 효모와 달리 40% 정도 저해시켜 효모와는 다른 측면도 있음을 보여주고 있다.

이들 아미노산의 저해 현상은 기질인 pyruvate 농도에 따라 차이가 있으며 이를 체계적으로 검토한 결과(*Fig.* 8), Val과 Ile의 농도에 따라 모두 기질에 대한 K_m과 V_{max}값이 영향을 받아 혼합형 저해로 이들 생성 물질들이 함께 free enzyme과 enzyme-substrate complex에 결합됨을 암시하고 있다. 이 현상은 barley[8]나 pea shoots[10]에서도 관찰되는 현상으로 효모 ALS에는 이들 아미노산의 결합 장소가 한 곳 이상일 것으로 추정된다. 그러나 시너지 효과가 없는 것으로 미루어 보아 다른 식물 효소와는 다른 co-operativity가 작용할 것으로 짐작된다. 최근 ALS 제초제 연구와 관련하여 제초제의 결합 장소와 생성물의 되먹임 저해와의 상관관계 여부가 큰 관심사가 되고 있다.[11,19,20] 인위적이거나 자연적으로 얻어진 제초제 저항 돌연변이체 연구결과 제초제 결합 장소가 생성물 되먹임 저해와 다양한 상관관계가 있는 것으로 발견되고 있다. 즉 Val 되먹임 저해에 저항하는 담배 잎의 *csr*-1 mutant의 경우 chlorsulfuron에 대한 저항력도 상당히 증가되었으나,[20] sulfometuron에 저항력이 있는 chlorella ALS의 경우는 되먹임 저해에는 별 영향을 미치지 못하고 있다.[11] 따라서 이런 식의 접근법은 여러 종류의 제초제가 어떤 형태로 ALS의 조절과 반응에 영향을 미치는가를 확인하는데 좋은 방법을 제공해 주며 아울러 새로운 형태의 제초제 설계에 도움이 될 것이다. 이런 관점에서 효모 ALS의 특징적 되먹임 저해 현상이 앞으로 ALS 계통 농약개발연구에 크게 기여할 것으로 기대된다.

이 연구는 한국과학재단 특정기초협력 연구비(92-46-00-01)에 의해 수행되었습니다. 본 논문 작성과정에서 유익한 의견을 주신 서울대 자연대 화학과 최명언 교수에게 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Umbarger, H. E. *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 533.
2. Beyer, E. M. Jr.; Duffy, M. J.; Hay, J. V.; Schlueter, D. D. *Sulfonylureas*; Marcel Dekker: New York, U. S. A., 1987; Vol. III.
3. Eoyang, L; Silverman, P. M. *J. Bacteriol.* **1984**, *157*, 184.
4. Schloss, J. V.; Van Dyk, D. E.; Vasta, J. F.; Kutny, R. M. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4952.
5. Lago, C. T.; Sannia, G.; Marino, G.; Squires, C. H.; Calvo, J. M.; De Felice, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *824*, 74.
6. Wek, R. C.; Hauser, C. A.; Hatfield, G. W. *Nucl. Acids Res.* **1985**, *13*, 3995.
7. Ricca, E.; Limauro, D.; Lago, C. T.; De Felice, M. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 5197.
8. Durner, J.; Boger, P. *Z. Naturforsch* **1988**, *43c*, 850.
9. Haughn, G. W.; Somerville, C. R. *Plant Physiol.* **1990**, *92*, 1081.
10. Lee, E. H.; Ahn, T. W.; Choi, J. D. *Korean Biochem. J.* **1991**, *24*, 285.
11. Landstein, D.; Arad, S.; Barak. Z.; Chipman, D. M. *Planta.* **1993**, *191*, 1.
12. Bekkaoui, F.; Schorr, P.; Crosby, W. L. *Physiol. Planta.* **1993**, *88*, 475.
13. Poulsen, C.; Strougaard, P. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *185*, 433.
14. Jo, K. *Master thesis*; Seoul National University, 1995; p 51.
15. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randal, R. J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *193*, 265.
16. Falco, S. C.; Dumas, K. S. *Genetics.* **1985**, *109*, 21.
17. Magee, P. T.; de Robichon-Szulmajster, H. *Eur. J. Biochem.* **1968**, *3*, 507.
18. Yang, J. H.; Kim, S. S. *Biochim. Biophys Acta.* **1993**, *1157*, 178.
19. Rathinasabapathi, B.; King, J. *Plant Physiol.* **1991**, *96*, 255.
20. Tourneur, C.; Jouanin, L.; Vaucheret, H. *Plant Sci.* **1993**, *88*, 159.