

## L'ADENINEPHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE DES POUSSES DE TOPINAMBOUR *HELIANTHUS TUBEROSUS*

F. LE FLOC'H\* et J. LAFLEURIEL†

\*Laboratoire de Phytomorphogenèse associé au C.N.R.S., 4 rue Ledru, 63000 Clermont-Ferrand, France;

†Institut Universitaire de Technologie, Département de Biologie Appliquée, Centre Universitaire des Cèzeaux, 63170 Aubière, France

(Received 23 July 1977)

**Key Word Index**—*Helianthus tuberosus*; Compositae; Jerusalem artichoke; adeninephosphoribosyltransferase; AMP pyrophosphorylase; phosphoribosylpyrophosphate.

**Abstract**—An extract from Jerusalem artichoke shoots exhibited important adeninephosphoribosyltransferase activity. Only partial purification was possible because of the great instability of the enzyme. Phosphate ions and thiol reducing substances were necessary to stabilize it. The optimal temperature and pH were 40–45° and 5.5 to 6.5. The enzyme showed an absolute requirement for divalent cation:  $Mn^{2+} > Mg^{2+} = Co^{2+} = Zn^{2+} \gg Ca^{2+}$ . Kinetic studies gave  $K_m$  values of  $6.4 \times 10^{-5}$  M for phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) and  $5.5 \times 10^{-6}$  M for adenine. AMP exercised a strong product inhibition, competitive towards PRPP ( $K_i = 10^{-4}$  M). Inhibition by phosphate and pyrophosphate ions was also observed. The results suggested that the adeninephosphoribosyltransferase of *Helianthus tuberosus* has a key role in the purine salvage pathway.

### INTRODUCTION

La capacité des tissus de topinambour à transformer l'adénine en ATP a déjà été signalée [1]. L'étude de la régulation du 'pool' nucléotidique de pousses de topinambour, fait toujours apparaître, après traitement par l'adénine ou l'adénosine, une expansion de ce 'pool' aux différents stades du cycle végétatif de la plante [2]. Des bourgeons de tubercules, traités pendant une minute par une solution d'adénine-8- $^{14}C$ , puis transférés dans une solution d'eau distillée, incorpore cette base à une vitesse telle qu'il suffit de 20 min pour que la charge énergétique des nucléotides adényliques radioactifs devienne égale à celle des nucléotides totaux [3]. Cette rapidité d'incorporation s'expliquerait par la présence d'une adénine-phosphoribosyl-transférase (EC 2.4.2.7.) très active.

Cette enzyme a été signalée à maintes reprises, chez les microorganismes [4, 5] chez de nombreuses espèces animales [6–11] et quelques espèces végétales [12–15]. Les observations précédentes nous ont incité à entreprendre sa mise en évidence dans les tissus de topinambour; et les résultats obtenus nous ont conduit à une étude de ses propriétés pour essayer de définir son rôle dans la régulation du métabolisme des nucléotides puriques de cette espèce végétale.

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### Purification partielle

La purification des extraits a comporté deux étapes essentielles: une filtration de l'extrait brut sur Sephadex G 50, permettant de séparer de la fraction protéique une quantité considérable de phénols, et une chromatographie sur DEAE-cellulose, fractionnement grâce auquel la presque totalité des activités phosphatasiques sont éliminées de la fraction active; une étude des activités

phosphatasiques restantes, nous a montré que après une heure d'incubation, 5% au maximum de l'AMP formé est hydrolysé au pH auquel les incubations sont conduites. Cet extrait protéique, partiellement purifié, à partir duquel toutes nos études ont été réalisées, présente une activité spécifique de  $23 \times 10^{-3}$   $\mu$ M/mg de protéines/min, activité comparable à celle obtenue par différents auteurs [4, 8, 12, 13]. Nous avons essayé, sans succès, d'autres procédés de purification. Nos échecs sont dus à la trop grande instabilité de l'enzyme.

#### Stabilité

Le Tableau 1 donne une idée de la labilité de cette enzyme; une stabilité relative est obtenue en tampon phosphate; il semble que l'ion phosphate soit indispensable à cet égard, comme le sont aussi les substances réductrices à groupements thiols:  $\beta$ -mercaptoéthanol, glutathion. Nous avons utilisé le glutathion à la concentration de  $2 \times 10^{-3}$  M. Le glycérol additionné à 30%

Tableau 1. Etude de la stabilité de l'enzyme

Conditions de conservation	Demi-vie
Tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 7,5 temp. +4°	15 min
Tampon Tris-HCl 0.05 M, pH 7,5 temp. +4° + Glutathion $2 \times 10^{-3}$ M	5 hr
Tampon phosphate 0.05 M, pH 7,5 temp. +4°	15 hr
Tampon phosphate 0.05 M, pH 7,5 temp. +4° + glutathion $2 \times 10^{-3}$ M	6 jours
Tampon phosphate 0.05 M, pH 7,5 temp. +4° + glycérol 30%	10 jours
Tampon phosphate 0.05 M, pH 7,5 temp. -25° + glutathion $2 \times 10^{-3}$ M	stable plusieurs mois

aux extraits assure une stabilité comparable à celle obtenue en présence de glutathion; mais sa présence dans les mélanges réactionnels se révèle gênante pour les chromatographies sur couche mince. Cette instabilité de l'adéninephosphoribosyltransférase est signalée par différents auteurs mais à des degrés moindres [7, 8, 10]. Un traitement de 10 mn à 55°, en tampon phosphate et en présence de glutathion entraîne une perte d'activité de 50%; une observation identique a été faite par Hori *et al.* [7]. L'enzyme peut être conservée plusieurs mois, sans aucune perte d'activité, congelée à -25° en solution dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7.5, additionné de glutathion ( $2 \times 10^{-3}$  M).

#### Stoechiométrie. Influence de la température et du pH

Nous avons vérifié que, au cours de la réaction, la radioactivité de l'adénine-8- $^{14}$ C apparaît bien en totalité dans l'AMP. Les incubats ont été analysés par chromatographie sur couche mince de cellulose, dans deux systèmes de solvants; (*n*-BuOH-Me<sub>2</sub>CO-HOAc-NH<sub>4</sub>OH 5% aq-H<sub>2</sub>O, 7:5:3:3:2) ou solution saturée de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, acétate de sodium M et isopropanol, 80:18:2 [16].

L'optimum d'activité en fonction de la température est situé entre 40 et 45°; cet optimum relativement bas est lié sans doute à l'instabilité de l'enzyme. L'étude de l'activité enzymatique en fonction du pH, fait apparaître un maximum allant de 5.5 à 6.5. Les tampons utilisés étaient les suivants: tampon acétate (pH 4.5 à 6), citrate (pH 4.5 à 6.5), cacodylate (pH 5.5 à 7), phosphate (pH 6 à 8), Tris-HCl (pH 7.5 à 9), glycine-NaOH (pH 9 à 10). En tampon citrate, au pH = 5.5, l'activité représente simplement 15% de l'activité obtenue au même pH en tampon acétate et à pH 7.5 en tampon phosphate 25% de l'activité obtenue au même pH, mais en tampon Tris-HCl. De tels effets inhibiteurs de la part des ions citrate et phosphate ont été signalés par Hori *et al.* [7]. L'inhibition par le tampon citrate est sans doute liée à un effet chélateur sur les ions divalents. Si le tampon phosphate inhibe fortement la réaction, il permet cependant de stabiliser l'extrait enzymatique. Par ailleurs, puisque l'activité phosphatasique de l'extrait est faible à pH 7.5, nous avons choisi de réaliser les incubations en tampon Tris-HCl à ce pH. L'apport d'ions phosphates dans le mélange réactionnel est alors réduit à ceux contenus dans la solution enzymatique.

#### Effet de différents ions sur l'activité enzymatique

Le Tableau 2 donne une indication de l'importance de l'inhibition des ions phosphates sur la réaction enzymatique. Lors de nos études cinétiques les concentrations en phosphate étaient soit de 0.005 M, soit de 0.01 M; à ces concentrations, l'inhibition est fortement atténuée.

Les données du Tableau 3 font apparaître l'effet de différents cations sur la vitesse de la réaction. L'effet catalytique du magnésium, rapporté par tous les auteurs, a été choisi comme référence. Il semble qu'en ce qui concerne les purines nucléotides pyrophosphorylases, l'ion Mn<sup>2+</sup> apporte un effet plus marqué que l'ion Mg<sup>2+</sup>. 7.17. Zn<sup>2+</sup> et Co<sup>2+</sup> ont ici un effet comparable à celui de Mg<sup>2+</sup>. Par contre, l'ion Ca<sup>2+</sup> montre une action controversée: s'il a un effet comparable à celui de Mg<sup>2+</sup> en ce qui concerne l'enzyme extraite de tumeur d'ascites d'Ehrlich [7]. La réaction n'est stimulée qu'à un taux de 15% (par rapport à celui de Mg<sup>2+</sup>) en présence de

Tableau 2. Etude de l'action des ions phosphates sur la réaction enzymatique

Concentration finale du mélange réactionnel en ions phosphates: mM/l.	Pourcentage d'activité observé par rapport au témoin sans phosphate de sodium
0	100
0 + Na <sup>+</sup> (100 mM/l.)	87.5
4.2	100
8.4	99.7
21	73
42	37
62	24
84	17

La composition du mélange réactionnel (120 µl) était la suivante: adénine-8- $^{14}$ C, 0.042 mM, PRPP 0.084 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.084 mM, 0.2 unité d'adénosine aminohydrolase, et 50 µl de solution enzymatique préalablement filtrée sur une colonne de Sephadex G 25, conditionnée en tampon Tris-HCl (0.05 M, pH 7.5). Du tampon phosphate, 0.2 M pH 7.5, était additionné aux incubats de façon à obtenir une gamme de concentrations allant de 4.2 à 84 mM/l. L'ion sodium en forte concentration entraîne par lui-même une légère inhibition

l'enzyme extraite d'*Helianthus*, résultat comparable à celui qu'observe Berlin [6] concernant l'enzyme de *Bacillus subtilis*. Par rapport au témoin, il semble donc que l'ion Ca<sup>2+</sup> ait un effet inhibiteur, du moins à la concentration étudiée.

L'enzyme nécessite pour son activité, la présence absolue d'un cation divalent; toute activité disparaît en effet lorsque les incubations sont conduites en présence d'EDTA à des concentrations appropriées ( $2 \times 10^{-3}$  M). Une légère inhibition est observée en présence de fortes concentrations en ion sodium (Tableau 2), inhibition signalée également par Berlin *et al.* [5], Hori *et al.* [7]. L'ion mercurique enfin (Tableau 3), a un effet fortement inhibiteur; un tel effet a été décrit par tous les auteurs l'ayant essayé [7, 9, 10].

#### Spécificité et Cinétique

L'hypoxanthine, la guanine, l'uracile et la cytosine ne se sont pas révélées, à l'essai, des substrats utilisables

Tableau 3. Effets de quelques ions sur l'activité adénine phosphoribosyltransférase

Ion étudié (chlorure)	Activité enzymatique (en % de l'activité mesurée en présence de Mg <sup>2+</sup> )
Mn <sup>2+</sup>	222
Mg <sup>2+</sup>	100
Zn <sup>2+</sup>	100
Co <sup>2+</sup>	88
K <sup>+</sup>	26
Na <sup>+</sup>	25
Témoin	25
Ca <sup>2+</sup>	15
Hg <sup>2+</sup>	7
EDTA ( $2.10^{-3}$ M)	-0

La composition du mélange réactionnel (50 µl) était la suivante: adénine-8- $^{14}$ C  $10^{-4}$  M, PRPP  $4.10^{-4}$  M, tampon Tris-HCl pH 7.5 0.08 M, l'ion étudié (chlorure)  $10^{-4}$  M, 0.5 unité d'adénosine aminohydrolase et 10 µl de la solution enzymatique; durée de l'incubation 30 mn à 25°. L'activité enzymatique en présence de Mg<sup>2+</sup> est prise comme référence.

par l'adéninephosphoribosyltransférase de *Helianthus tuberosus* étudiée ici; cette enzyme semble donc spécifique de l'adénine. L'étude des courbes en coordonnées inverses, selon la méthode de Lineweaver et Burk, montre que la cinétique de la réaction est du type michaelien. Les déterminations de  $K_m$  ont donné les résultats suivants: pour une concentration du mélange réactionnel en adénine de  $10^{-5}$  M, la valeur de  $K_m$  vis à vis du PRPP est de  $6.4 \times 10^{-5}$  M; pour une concentration en PRPP de  $4 \times 10^{-6}$  M, la valeur de  $K_m$  vis à vis de l'adénine est de  $5.5 \times 10^{-6}$  M. A saturation de l'enzyme en PRPP et en adénine, (respectivement  $2 \times 10^{-4}$  M et  $10^{-5}$  M), la valeur de  $K_m$  vis à vis de l'ion  $Mg^{2+}$  est de  $2.2 \times 10^{-5}$  M. Ces valeurs traduisent une grande affinité de l'enzyme pour ses substrats; affinité légèrement plus importante cependant pour l'adénine. Tous les résultats rapportés par les auteurs vont dans ce sens, et particulièrement ceux observés par Nicholls *et al.* [12], Sadorge *et al.* [13] chez les végétaux supérieurs.

#### Mécanisme réactionnel

Une série d'études cinétiques, fait apparaître que lorsqu'on fait varier la concentration en adénine, lors des déterminations de  $K_m$  vis à vis du PRPP, la vitesse maximale de la réaction demeure constante, et par conséquent indépendante de la concentration en adénine (Tableau 4). Par contre  $V_{max}$  varie considérablement si l'on fait varier la concentration en PRPP: lors des déterminations de  $K_m$  vis à vis de l'adénine, Tableau 4. Ces résultats permettent de penser que le premier substrat à se fixer sur l'enzyme serait le PRPP. La séquence ordonnée, comporterait donc la fixation du PRPP, puis de l'adénine, et la libération du pyrophosphate puis de l'AMP. La très légère réversibilité de la réaction, obtenue en présence de pyrophosphate et d'AMP, mais non en présence d'AMP seul, appuie cette hypothèse. Ce mécanisme a déjà été proposé par Berlin [5] dans le cas de l'enzyme de *Bacillus subtilis* et admis par d'autres auteurs étudiant des enzymes d'origine animale [18]; le mécanisme réactionnel serait donc du même type chez végétaux supérieurs.

#### Action des réactifs des thiols

Ni l'acide iodoacétique ( $10^{-3}$  M), ni le parachloromercuribenzoate ( $10^{-3}$  M) n'ont d'influence sur l'activité adéninephosphoribosyltransférase de Topinambour,

Tableau 4. Détermination de  $V_{max}$  pour différentes concentrations en PRPP et en adénine

Partie A. Détermination de  $V_{max}$  pour différentes concentrations en adénine

Concentrations en adénine	$4 \times 10^{-5}$ M	$10^{-5}$ M	$5 \times 10^{-6}$ M
$V_{max}$ en nM d'AMP/sec (déterminé graphiquement)	1.7	1.7	1.7

Partie B. Déterminations de  $V_{max}$  pour différentes concentrations en PRPP

Concentrations en PRPP	$2 \times 10^{-4}$ M	$2 \times 10^{-5}$ M	$4 \times 10^{-6}$ M
$V_{max}$ en nM d'AMP/sec (déterminé graphiquement)	13.8	4.8	1.2

alors que Berlin [5] mentionne une inhibition par l'iodoacétate, et Gadd *et al.* [19] une inhibition par le *p*-CMB, des enzymes extraites de *Bacillus subtilis* et des cellules tumorales d'ascites d'Ehrlich respectivement.

#### Inhibition par l'AMP et le pyrophosphate

L'AMP inhibe fortement la réaction catalysée par l'adéninephosphoribosyltransférase. Cette inhibition est du type non compétitif vis à vis de l'adénine et du type compétitif vis à vis du PRPP. La détermination de la valeur de  $K_i$  vis à vis du PRPP, par la méthode de Dixon, donne une valeur de  $10^{-4}$  M. Il est donc probable que, *in situ*, une inhibition de ce type puisse se manifester, surtout dans les conditions de faible charge énergétique des nucléotides adényliques; la proportion d'AMP est alors beaucoup plus élevée que si la charge énergétique est élevée. Cette inhibition éviterait donc une expansion du 'pool' des nucléotides adényliques, inutile dans les conditions de faible charge énergétique. Cette inhibition typique par le produit de la réaction a été rapportée par Hori *et al.* [20], Berlin *et al.* [5], et chez les végétaux supérieurs par Nicholls *et al.* [12].

L'autre produit de la réaction, le pyrophosphate, exerce un effet inhibiteur de la réaction, mais à des concentrations relativement fortes; les taux d'inhibition obtenus sont de 15 % pour une concentration de  $10^{-4}$  M en pyrophosphate, et de 65 % pour une concentration de  $10^{-3}$  M. Kornberg [4], Flacks [6] et Berlin [5] citent des taux d'inhibition sensiblement du même ordre. Compte tenu de la faible teneur des tissus en pyrophosphate, il semble peu probable que *in vivo* il puisse inhiber la réaction enzymatique.

#### Conclusion

Cette étude fait apparaître l'instabilité de l'adéninephosphoribosyltransférase de Topinambour, instabilité qui ne semble pas particulière au domaine végétal. La nécessité absolue d'un cation divalent, la grande affinité de l'enzyme pour ses substrats et le mécanisme réactionnel font que l'adéninephosphoribosyltransférase de Topinambour présente des propriétés très comparables à celles qui ont été décrites chez d'autres espèces végétales ou animales et chez les microorganismes.

La rapidité de l'incorporation dans les nucléotides adényliques, de l'adénine-8- $^{14}C$  fournie aux bourgeons de Topinambour [3], s'explique facilement, puisque une adéninephosphoribosyltransférase est présente dans les pousses de cette espèce et qu'elle manifeste les propriétés cinétiques requises pour assurer le rôle proposé dans notre introduction.

Puisque tout traitement des pousses de topinambour par l'adénosine [2], fait apparaître une expansion rapide du 'pool' des nucléotides adényliques, on peut penser que la transformation de l'adénosine exogène entraîne l'intervention successive de deux enzymes, l'adénosine nucléosidase et l'adéninephosphoribosyltransférase. L'existence de la première a été signalée à plusieurs reprises chez les végétaux supérieurs [21-25] et les tissus de Topinambour en contiennent une quantité considérable, ainsi que nous le montrerons dans une prochaine publication. Aucune activité adénosine kinase, par contre, n'a été mise en évidence dans leurs tissus. La forte activité adéninephosphoribosyltransférase des extraits de Topinambour, s'expliquerait par son rôle probable dans la récupération de l'adénine. La dégradation des nucléotides adényliques passerait par l'adénine,

qui étant donné l'affinité de l'enzyme pour ce substrat, se trouverait aussitôt recyclée.

### PARTIE EXPERIMENTALE

**Obtention du matériel biologique.** Les tubercules de Topinambour non dormants (*Helianthus tuberosus* L. var. D 19) brossés et lavés, sont placés dans de la vermiculite, en étuve à 28° et à l'obscurité. Après quelques jours, les pousses, longues de 2 à 8 cm sont récoltées et pesées.

**Extraction.** Les pousses sont broyées à raison de 1 g/10 ml dans un mortier en présence de sable dans le milieu d'extraction suivant : tampon phosphate 0,2 M, pH 7,5 additionné de borate de sodium  $10^{-3}$  M et de glutathion  $2 \times 10^{-3}$  M. L'homogénat est centrifugé 1 min à 7000 g. Le surnageant est filtré sur verre fritté N° 2 puis déposé sur une colonne de Sephadex G 50 conditionnée en tampon phosphate 0,05 M, pH 7,5. La fraction protéique recueillie constitue l'extrait brut.

**Chromatographie sur DEAE-Cellulose.** L'extrait brut est chromatographié sur colonne de DEAE-cellulose Whatman DE-32 ( $2,5 \times 5$  cm) conditionnée en tampon phosphate 0,05 M pH 7,5. Le rinçage de la colonne par ce même tampon, permet l'élimination d'une fraction protéique contenant une forte activité phosphatase. L'élution de la colonne est réalisée par un gradient de concentration en NaCl de forme linéaire (0 à 0,8 M). Le volume total de l'éluant est de 100 ml. Les fractions les plus actives sont regroupées et constituent la fraction protéique à partir de laquelle tous nos essais enzymatiques ont été réalisés.

**Conservation.** La solution enzymatique précédente additionnée de glutathion ( $2 \times 10^{-3}$  M) est répartie en petites fractions (0,4 ml) et placée au congélateur à -25°.

**Dosage des protéines.** Il est exécuté selon la méthode de Lowry *et al.* [26] en utilisant l'albumine du sérum de boeuf comme référence.

**Mesure de l'activité enzymatique.** Les conditions d'incubation sont les suivantes : 25°, pH 7,5, durée 10 ou 15 min. Le milieu d'incubation (50 µl) est constitué de la façon suivante : tampon Tris-HCl 0,08 M pH 7,5, adénine-8- $^{14}$ C  $10^{-4}$  M, PRPP  $4 \times 10^{-4}$  M,  $MgCl_2$   $4 \times 10^{-4}$  M et 5 ou 10 µl de solution enzymatique. La concentration en phosphate de l'incubation est alors soit de  $5 \times 10^{-3}$  M, soit de  $10^{-2}$  M. Lors d'incubations plus longues, 30 mm ou 1 hr, 0,5 unité d'adénosine aminohydrolase était incorporée au mélange réactionnel, pour éviter que l'adénosine provenant de l'activité phosphatase résiduelle de l'extrait sur l'AMP formé, ne soit hydrolysée par l'adénosine nucléosidase, elle aussi présente. En mesurant la radioactivité de l'inosine, il est alors possible d'apprécier le degré d'hydrolyse de l'AMP. Au terme du temps d'incubation, une fraction aliquote, 10 µl est déposée sur une plaque de cellulose ( $25 \times 100$  mm, épaisseur de la couche, 0,1 mm) sous forme de bande (10 mm); la réaction est bloquée par séchage immédiat à

l'air chaud, un mélange traceur ayant au préalable été déposé. Le développement ascendant des plaques est effectué dans l'eau distillée. La séparation est nette et rapide. adénine  $R_f$  0,33, adénosine  $R_f$  0,55, inosine  $R_f$  0,78, AMP  $R_f$  1. Les traceurs sont repérés en lumière UV ( $\lambda$  254 nm) et recueillis par grattage de la cellulose dans un mélange scintillant (5 g de PPO et 0,3 g de diméthyl-POPOP en solution dans le toluène); la radioactivité est déterminée au compteur à scintillation liquide Intertechnique S.L.40.

### REFERENCES

- Guern, N. (1969) *Compt. Rend.* **269**, 580.
- Gendraud, M. (1977) *Physiol. Vég.* **15**, 121.
- Gendraud, M. et Prevot, J.-C. (1973) *Physiol. Vég.* **11**, 417.
- Kornberg, A., Lieberman, I. and Simms, E. S. (1955) *J. Biol. Chem.* **215**, 417.
- Berlin, R. D. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 120.
- Flaks, J. G., Erwin, M. J. and Buchanan, J. M. (1957) *J. Biol. Chem.* **228**, 201.
- Hori, M. and Henderson, J. F. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 1406.
- Murray, A. W. (1967) *Biochem. J.* **103**, 271.
- Krenitsky, T. A., Neil, S. M., Elion, G. B. and Hitchings, G. H. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4779.
- Kenimer, J. G., Young, L. G. and Groth, D. P. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **834**, 87.
- Cartier, M. P. et Hamet, M. (1974) *Compt. Rend.* **279**, 883.
- Nicholls, P. B. and Murray, A. W. (1968) *Plant Physiol.* **43**, 645.
- Sadorge, P., Doree, M., Terrine, C. et Guern, J. (1970) *Physiol. Vég.* **8**, 499.
- Clark, M. C. (1974) *J. Exp. Botany* **25**, 309.
- Nguyen, J. (1973) *Physiol. Vég.* **12**, 311.
- Randerath, K. (1963) *Thin-Layer Chromatography*. Academic Press, New York.
- Nakagawa, S., Hasegawa, R. and Robayashi, M. (1975) *Nihon Univ. J. Med.* **17**, 45.
- Groth, D. P. and Young, L. G. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 82.
- Gadd, R. E. A. and Henderson, J. F. (1970) *Can. J. Biochem.* **48**, 302.
- Hori, M., Gadd, R. E. A. and Henderson, J. F. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 616.
- Mazelis, M. and Creveling, R. K. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 3358.
- Mazelis, M. (1959) *Plant Physiol.* **34**, 153.
- Shaw, J. G. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 627.
- Clark, M. C., Page, O. T. and Fisher, M. C. (1972) *Phytochemistry* **11**, 3413.
- Poulton, J. E. and Butt, V. S. (1976) *Planta* **131**, 179.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **220**, 265.