

# Die suiwering en sommige eienskappe van protease-inhibeerders in die saad van *Erythrina zeyheri* (Ploegbreker)

Francois J. Joubert

Nasionale Chemiese Navorsingslaboratorium, WNNR, Posbus 395, Pretoria 0001

## UITTREKSEL

Vyf protease-inhibeerders (DE-1 tot DE-5) is uit *Erythrina zeyheri* (ploegbreker)-saad geïsoleer en gesuiwer deur van jelfiltrering op Sephadex G-50, gevvolg deur ionuitruilchromatografie op DEAE-cellulose en DEAE-sefarose, gebruik te maak. Die inhibeerders bevat 163 tot 164 aminosure (molekulêre massa 18 000), waaronder vier halfsitiestienresidu's, en hulle kom met die Kunitz-protease-inhibeerders ooreen. DE-1, DE-3 en DE-5 bevat kragtige inhibeerders vir varktripsien, maar 'n veel swakker inhibeerder vir bees- $\alpha$ -chimotripsien. In teenstelling hiermee inhibeer DE-2 en DE-4  $\alpha$ -chimotripsien baie sterk, maar dit het prakties geen uitwerking op tripsien nie.

## ABSTRACT

*The purification and some properties of the protease inhibitors from the seed of Erythrina zeyheri (Ploegbreker)*

*Five protease inhibitors (DE-1 to DE-5) were isolated and purified from Erythrina zeyheri seed by gel filtration on Sephadex G-50, followed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose and DEAE-sepharose. They contain 163 to 164 amino acids (molecular mass 18 000), including four half-cystine residues, and resemble the Kunitz protease inhibitors. DE-1, DE-3 and DE-5 contain a potent inhibitor for porcine trypsin but a much weaker inhibitor for bovine  $\alpha$ -chymotrypsin. In contrast, DE-2 and DE-4 inhibit  $\alpha$ -chymotrypsin strongly but have practically no action on trypsin.*

## INLEIDING

Protease-inhibeerders kom wyd versprei in die sade van peulgewasse voor.<sup>1</sup> Die genus *Erythrina* wat aan die Leguminosae-familie behoort, bestaan uit ongeveer 108 spesies bome en struiken, versprei in die tropiese en warm streke van die wêreld.<sup>2,3</sup> Die

alkaloïede,<sup>4</sup> vry aminosure<sup>4-6</sup> en lektiene<sup>7-10</sup> wat in die sade van verskeie spesies *Erythrina* voorkom, is bestudeer. Onlangs het Joubert en medewerkers bevestig dat die sade van Suid-Afrikaanse *Erythrina*-spesies, te wete *E. acanthocarpa*,<sup>11</sup> *E. caffra*,<sup>12</sup> *E. hu-meana*,<sup>13</sup> *E. latissima*<sup>14</sup> en *E. lysistemon*,<sup>15</sup> ook hoe

konsentrasies protease-inhibeerders bevat. Benewens die suiwering van verskillende inhibeerders, is sommige eienskappe van die inhibeerders nagevors. In dié verband is dit insiggewend dat inhibeerder DE-3 wat uit die sade van *E. latissima* gesuiwer is, benewens tripsien ook plasmien en 'n weefselplasminogenaktiveermiddel (geïsoleer uit menslike melanoomselle wat *in vitro* gekweek is), inhibeer. DE-3 het egter geen werking op trombien of urokinase nie. Laasgenoemde is ook 'n plasminogenaktiveermiddel. As DE-3 aan agarose gekoppel word, gee dit 'n baie nuttige derivaat om te gebruik vir die suiwering van weefselplasminogenaktiveermiddel deur affinitetschromatografie. Plasminogenaktiveermiddels is van groot geneeskundige belang.<sup>17</sup>

Die struik van *E. zeyheri* word in die koeler dele van Suid-Afrika, vernaamlik die Vrystaat, Natal en Transvaal, aangetref. Die struik word 50 to 60 cm hoog. Nog 'n kenmerk van die struik is sy groot wortelstelsel wat dikwels tot 'n meter in deursnit kan wees; vandaar die naam 'ploegbreker'.

In hierdie bydrae word die suiwering en sommige eienskappe van verskeie protease-inhibeerders van die sade van *E. zeyheri* beskryf.

## EKSPERIMENTEEL

### Materiale

Die sade van *E. zeyheri* is versamel van 'n struik wat in Pretoria groei. Tripsien (3 maal gekristalliseer) is deur Miles, Kaapstad, voorsien.  $\alpha$ -Chimotripsien (3 maal gekristalliseer) is van Worthington verkry. N- $\alpha$ -bensoïel-L-argininetielesterhidrochloried en N-asetiel-L-tirosinetielester is onderskeidelik deur BDH en Merck voorsien. Diëtielaminoëtisellulose (DEAE-sellulose) was 'n mikrokorrelige bereiding van Whatman. Sephadex G-50 (fyn) en DEAE-sefarose CL-6B is deur Pharmacia voorsien.

### Fisiës-chemiese metodes

Kolomme gepak met Sephadex G-50, DEAE-sellulose en DEAE-sefarose is voorberei soos deur die vervaardigers aangeveel. Die eluaat van die kolomme is by 280 nm met 'n Beckmanspektrofotometer gemonitor. Die molekulêre massas is deur jelfiltrasie bepaal, soos beskryf deur Andrews,<sup>18</sup> deur van 'n Sephadex G-50-kolom (0,9 x 150 cm) gebruik te maak. Die volgende molekulêre-massamerkers is gebruik: sojaboontjetripsieninhbeerder (20 100), mioglobien (17 800), ribonuklease (13 700) en die  $\alpha$ -neurotoksien van *Naja nivea*-slanggif (7 900). Skyf-elektroforese met 'n 15%-jel is volgens die metode van Ornstein en Davis uitgevoer.<sup>19</sup>

### Bepaling van protease-inhibeerderaktiwiteit

Hierdie bepalings berus op die metodes ontwikkel deur Schwert en Takenaka.<sup>20</sup> Die hidrolise by 30°C van N- $\alpha$ -bensoïel-L-argininetielester deur varktripsien en van N-asetiel-L-tirosinetielester deur beeschimotripsien is onderskeidelik as 'n verandering in absorpsie by 253 nm en 240 nm gevvolg. Albei die ensieme is in voorraadoplossings van 3 mg/ml in

0,001 N soutsuur gehou. Die substraatkonsentrasie van N- $\alpha$ -bensoïel-L-argininetielester en N-asetiel-L-tirosinetielester was onderskeidelik 0,001 M in 0,05 M Tris-HCl en 0,01 M kalsiumchloried (pH 8) en 0,05 M kaliumfosfaat (pH 7) met 10% metielalkohol.

Die inhibering van tripsien en chimotripsien is by 'n toenemende konsentrasie-inhibeerder bepaal deur die ensieme 5 min lank met geskikte hoeveelhede inhibeerder in 0,1 M Tris-HCl (pH 8) by kamertemperatuur te behandel, soos beskryf,<sup>21</sup> en deur daarna die oorblywende ensiemaktiwiteit te meet. Die ensiekonsentrasie is vir onaktiewe stowwe aangesuiwer, soos deur aktiewe-sentrumtitrasie bepaal.<sup>22</sup>

Een eenheid ensiemaktiwiteit word gedefinieer as die hoeveelheid ensiem wat by 30°C 'n verandering van 1  $\mu$ mol/min in die substraatkonsentrasie teweegbring. Hieruit word eenheid inhibeerderaktiwiteit weer gedefinieer as die hoeveelheid inhibeerder wat een eenheid ensiemaktiwiteit inhibeer. Die spesifieke inhibeerderaktiwiteit word uitgedruk as die getal inhibeerdereenhede per milligram inhibeerder.

### Chemiese ontleding

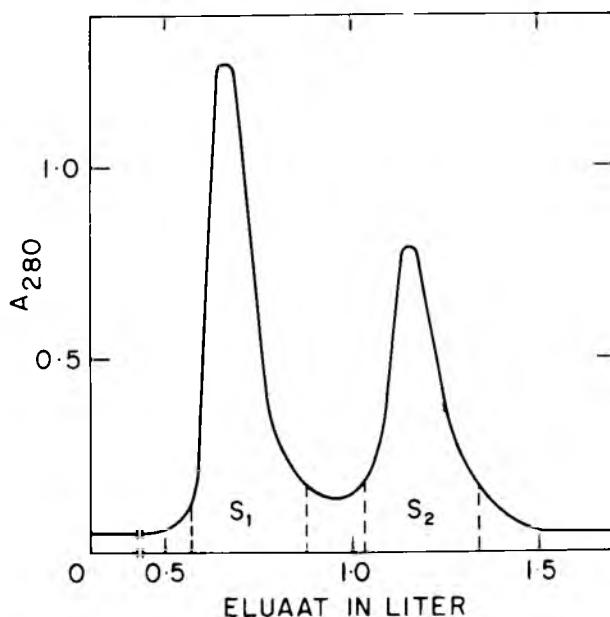
Die aminosuurontleding is met 'n outomatiese Beckmananaliseerder gedoen. Monsters van die inhibeerders is 24 h lank in verseêlde geëvakueerde glasbusies gehidroliseer met 6 N soutsuur waarby fenol gevoeg is om die vernietiging van tirosien te verhoed.<sup>23</sup> Halfsistien is volgens die metode van Hirs<sup>24</sup> as sisteniensuur bepaal. Vir die bepaling van die triptofaaninhoud is die monsters met 3 M p-tolueensulfoonsuur gehidroliseer, soos beskryf.<sup>25</sup> Vry sulfhiidrielse groepe in die protease-inhibeerdermonsters, opgelos in 6 M guanidiniumchloried, is volgens die metode van Ellman<sup>26</sup> bepaal.

### Bereiding van die ru protease-inhibeerder

Fygemaalde sade van *E. zeyheri* (27 g) is oornag met 1 / 0,5 m natriumchloriedoplossing by 10°C geékstraheer. Die suspensie is daarna 5 min lank in 'n Waringmenger fyngemaak. Die ekstrak is deur sentrifugering teen 10 000 omwentelings per minuut verhelder. Daarna is dit tot 70% met ammoniumsulfaat versadig en die presipitaat deur sentrifugering herwin. Die presipitaat is weer in 0,5 M natriumchloriedoplossings opgelos, teen gedistilleerde water gedialiseer en gevriesdroog. Die opbrengs van die preparaat was 3,8 g.

## RESULTATE

Die elueringsprofiel verkry wanneer die ru preparaat op 'n kolom van Sephadex G-50 geskei is, word in Fig. 1 getoon. Verskeie pieke is waargeneem, maar slegs piek S<sub>2</sub> het tripsien- sowel as chimotripsien-inhibeerderaktiwiteit getoon. Piek S<sub>2</sub> is derhalwe gevriesdroog en verder op DEAE-sellulose met 'n lineêre natriumchloriedgradiënt (0 – 0,2 M oor 2l) in 0,05 M Tris-HCl (pH 8) gefraksioneer. Twee hoofpieke is vir die inhibeerders waargeneem (Fig. 2). Pieke C<sub>1</sub> en C<sub>2</sub> is elkeen weer teen dieselfde gradiënt gechromatografeer; die elueringspatroon word in

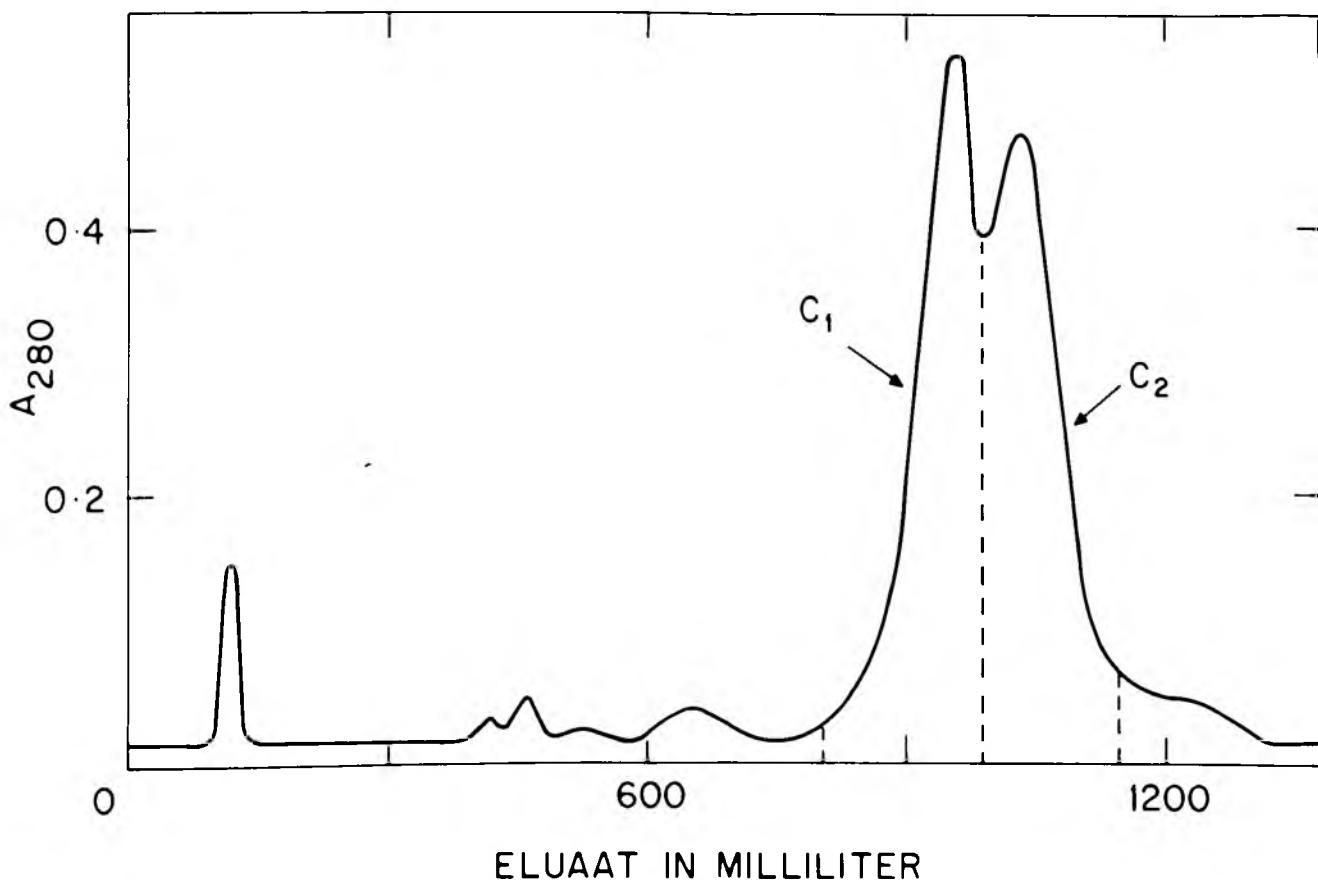


**FIGUUR 1:** Jelfiltrasie van die ru-preparaat van die saad van *E. zeyheri*. 'n Ru-preparaat (2 g) is op 'n kolom van Sephadex G-50 (3.8 x 150 cm) gelaai en met 0.2 M  $NH_4HCO_3$ -oplossing teen 'n vloeispoed van 50 ml/h geëlueer. Die kolomtemperatuur was 20°C en die eluaat is by 280 nm gemonitor.

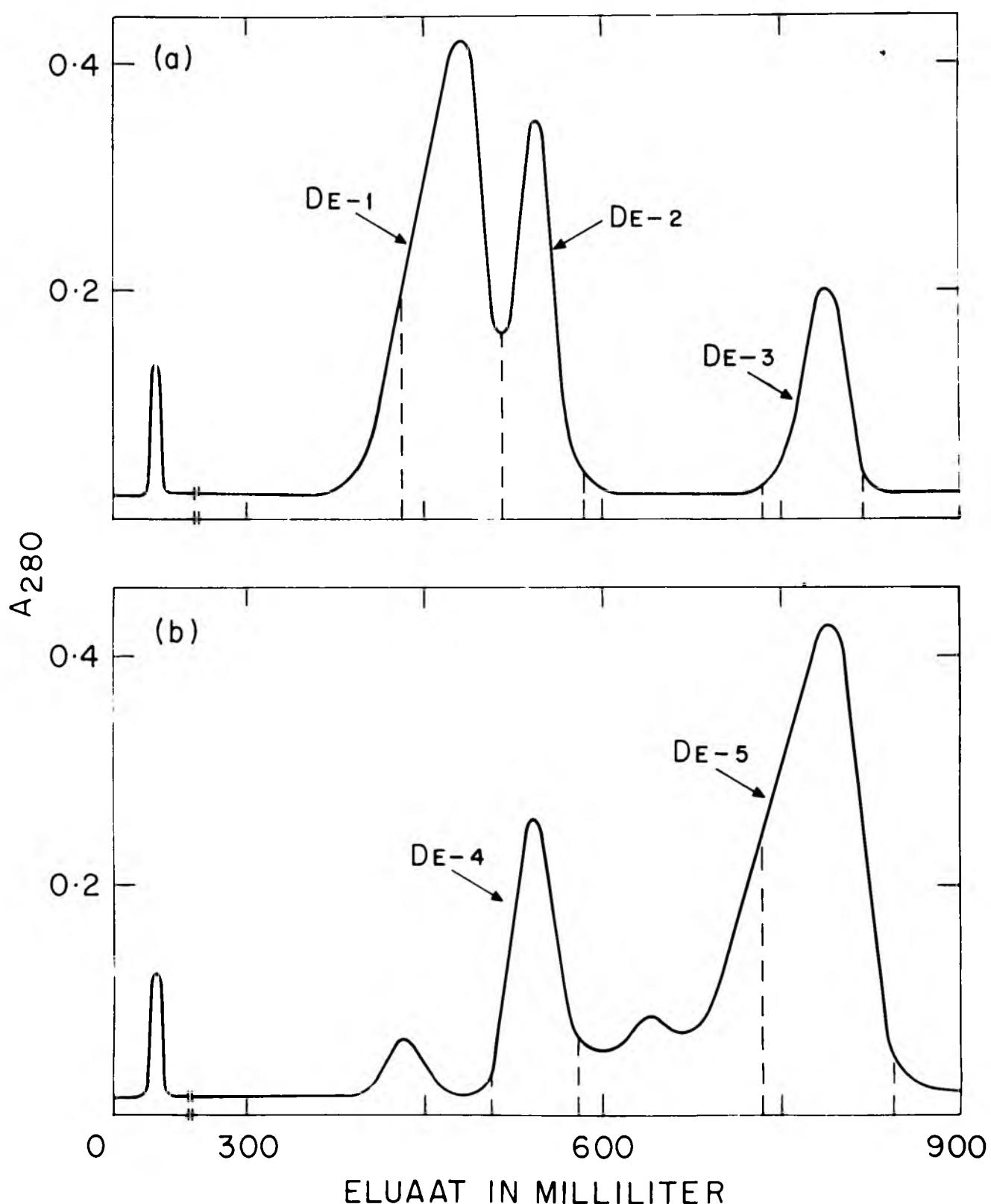
Fig. 3 getoon. Die chromatogramme toon protease-inhibeerders DE-1, DE-2, DE-3, DE-4 en DE-5. Die suiweringsstappe vir die inhibeerders is in Tabel I opgesom. Sommige van die inhibeerders se eienskappe word in Tabel II getoon. Volgens skryfelektroforese is DE-1 tot DE-5 waarskynlik suiwer. Die aminosuursamestelling van die inhibeerders word in Tabel III getoon. Die tabel sluit ook die aminosuursamestelling van die tripsieninhibeerde (Kunitz) van sojaboontjies in. Die inhibering van varktripsien en bees- $\alpha$ -chimotripsien by pH 8 met toenemende hoeveelhede inhibeerder DE-1 tot DE-5 word in Fig. 4 getoon.

### BESPREKING

Die protease-inhibeerders van boontjies en sade wat aan die Leguminosae-familie behoort, kan volgens hul molekulêre massa en sistieninhoud in twee algemene groepe verdeel word. Die een groep, naamlik die Bowman-Birk-protease-inhibeerders het molekulêre massas van 8 000 tot 10 000 en 'n hoë sistieninhoud (gewoonlik sewe disulfiede). Die inhibeerders van sojaboontjies,<sup>27-29</sup> limabooontjies,<sup>30,31</sup> tuinboontjies<sup>32</sup> en adzukiboontjies,<sup>33</sup> en die sade van *Macrotyloma axillare*,<sup>33</sup> behoort tot hierdie groep.



**FIGUUR 2:** Chromatografie van piek  $S_2$  op DEAE-cellulose. Piek  $S_2$  (0.25 g) is op 'n kolom van DEAE-cellulose (0.9 x 15 cm) gelaai en geëlueer met 'n lineêre gradiënt van natriumchloried (0 – 0.2 M oor 2 l) in 0.05 M Tris-HCl (pH 8) teen 'n vloeispoed van 50 ml/h. Die kolomtemperatuur was 20°C en die eluaat is by 280 nm gemonitor.



**FIGUUR 3:** Die herchromatografering van pieke  $C_1$  en  $C_2$  op DEAE-sefarose, (a) Piek  $C_1$  en (b) Piek  $C_2$ . Elk van die pieke (50 mg) is op 'n kolom van DEAE-sefarose (0.9 x 50 cm) gelaai en geëlueer met 'n lineêre gradiënt van natuurchloried (0–0.2 M oor 2 ℥) in 0.05 M Tris-HCl (pH 8) teen 'n vloeispoed van 12 ml/h. Die kolomtemperatuur was 20°C en die eluaat is by 280 nm gemonitor.

Die tweede groep, naamlik die Kunitz-protease-inhibeerders, het molekulêre massas van ongeveer 20 000 en 'n lae sistieninhoud (gewoonlik twee disulfiede). Die tripsieninhibeerde (Kunitz) van sojaboontjies<sup>35-37</sup> is 'n verteenwoordigende voorbeeld van hierdie groep. Die inhibeerders van die boontjies van *Psophocarpus tetragonolobus*,<sup>21,38</sup> die sade van *Albizia julibrissin*,<sup>39</sup> verskillende spesies *Erythrina*,<sup>11-15</sup> *Acacia elata*<sup>40</sup> en *Acacia sieberana*<sup>41</sup> is verdere voorbeeld van Kunitz-inhibeerders.

Die molekulêre massas van protease-inhibeerders DE-1 tot DE-5 uit die sade van *E. zeyheri* is volgens die jelfiltrasiemetode sowat 18 000, en dus bevat die inhibeerders 163-164 aminosure, waaronder vier halfsistienresidu's. Aangesien geen sulfhidriellgroep vasgestel kon word nie, is die inhibeerders deur twee intrakettingdisulfiedbrûe kruisverbind. Die molekulêre massas en die lae disulfiedinhoud van die inhibeerders van *E. zeyheri*-saad toon dat hulle tot die Kunitz-inhibeerders behoort.

Die inhibisiekenmerke van die vyf inhibeerders van die saad van *E. zeyheri* is verskillend. DE-1, DE-3 en DE-5 bevat 'n kragtige inhibeerder vir varktripsien. Volgens die titrasiekrommes (Fig. 4(a), 4(c) en 4(e)) inhibeer DE-1, DE-3 en DE-5 tripsien stoëgiometries in 'n molêre verhouding van 1:1. Bees- $\alpha$ -chimotripsien word egter veel swakker deur die inhibeerders ge-inhibeer. Inhibeerders DE-2 en DE-3 inhibeer  $\alpha$ -chimotripsien baie sterk in 'n stoëgiometriese molêre verhouding van 1:1, maar hulle het prakties geen inhibering teenoor tripsien nie (Fig. 4(b) en 4(d)).

Die inhibergedrag van 'n aantal Kunitz-protease-inhibeerders van verskeie sade en boontjies is in Tabel IV opgesom. 'n Aantal inhibeerders reageer spesifiek teenoor  $\alpha$ -chimotripsien en het geen inhibisie teenoor tripsien nie. Sommige is sterk in-

**TABEL I**  
**Opsomming van die suiwering van protease-inhibeerders (DE-1 tot DE-5)**

Stappe	Proteïen [mg]	Totale inhibeerder-aktiwiteit [Eenhede $\times 10^3$ ]	Spesifieke inhibeerder-aktiwiteit [Eenhede/mg proteïen]	Opbrengs [%]
Ru-bereiding	2000	T 1600 C 1560	800 780	100 100
Jelfiltrasie	396	T 1320 C 1089	3330 2750	83 70
Stappe 2 en 3*				
DE-1	33	T 318 C 141	9650 4280	19,9 9,0
DE-2	23	T 0 C 181	0 7870	0 11,6
DE-3	17	T 147 C 60	8650 3520	9,2 3,8
DE-4	21	T 0 C 166	0 7916	0 10,6
DE-5	38	T 329 C 243	8650 6400	20,5 15,6

T = tripsieninhivering en C =  $\alpha$ -chimotripsieninhivering

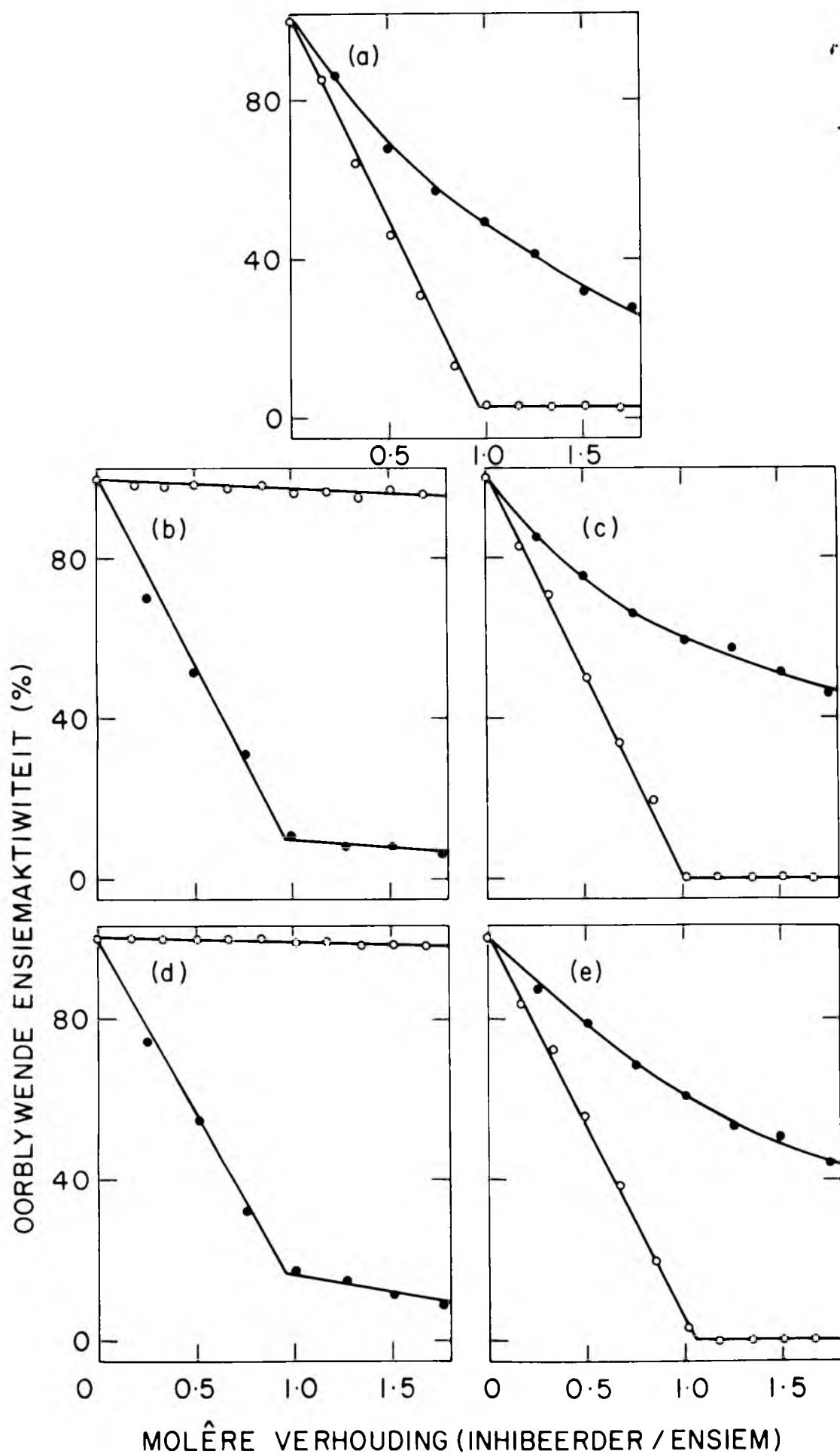
\*Chromatografie op DEAE-sellulose en DEAE-sefarose.

**TABEL II**  
**Sommige eienskappe van protease-inhibeerders (DE-1 tot DE-5)**

Eienskappe	DE-1	DE-2	DE-3	DE-4	DE-5
Skyfelektroforese (Getal bande)	Een	Een	Een	Een	Een
Molekulêre massa	17 800	17 700	16 400	18 100	16 900
Inhibeerderaktiwiteit	T	Geen	T	Geen	T
C*	C	C*	C*	C	C*
Vry-SH	Geen	Geen	Geen	Geen	Geen

T = tripsieninhivering, C =  $\alpha$ -chimotripsieninhivering.

\*Swak



FIGUUR 4: Die inhibering van varktripsien en bees- $\alpha$ -chimotripsien deur toenemende hoeveelhede Kunitz-protease-inhibeer uit die saad van *E. zeyheri*, (a) DE-1, (b) DE-2, (c) DE-3, (d) DE-4 en (e) DE-5. (Die inhibering van tripsien ○ — ○ en van  $\alpha$ -chimotrypsin ● — ●.)

**TABEL III**  
**Die aminosuursamesetting van die protease-inhibeerders (DE-1 tot DE-5). (In mol aminosuurresidu per mol protease-inhibeerder)**

Aminosuur	DE-1	DE-2	DE-3	DE-4	DE-5	Sojaboontjie-tripsien-inhibeerder (Kunitz)
Aspartiensuur	16,4(16)	15,5(16)	14,7(15)	17,1(17)	14,7(14)	26
Treonien	7,2(7)	9,7(10)	7,8(8)	9,2(9)	7,9(8)	7
Serien	13,9(14)	13,0(13)	16,3(16)	13,2(13)	15,7(16)	11
Glutamiensiur	23,0(23)	18,6(19)	19,2(19)	19,5(20)	19,2(19)	18
Prolien	9,7(10)	13,7(14)	10,4(10)	11,7(12)	10,4(10)	10
Glisien	13,6(14)	12,7(13)	16,2(16)	12,7(13)	15,8(16)	16
Alanien	7,1(7)	11,7(12)	3,9(4)	11,4(11)	4,3(4)	8
½-Sistien	3,5(4)	3,4(4)	3,6(4)	3,5(4)	3,6(4)	4
Valien	12,5(13)	11,4(11)	12,2(12)	11,4(11)	12,5(13)	14
Metionien	0	0	1,0(1)	0,6(1)	1,1(1)	2
Isoleusien	5,6(6)	6,1(6)	8,5(9)	6,0(6)	9,5(9)	14
Leusien	15,6(16)	15,3(15)	12,7(13)	15,6(16)	12,9(13)	15
Tirosien	6,7(7)	6,7(7)	9,6(10)	6,3(6)	9,3(9)	4
Fenielalanien	4,8(5)	6,3(6)	5,5(6)	5,2(5)	5,4(5)	9
Lisien	12,4(12)	7,1(7)	10,1(10)	7,4(7)	10,1(10)	10
Histidien	1,8(2)	1,8(2)	1,2(1)	2,0(2)	1,3(1)	2
Arginien	6,4(6)	7,4(7)	7,6(8)	7,7(8)	7,8(8)	9
Triptofaan	1,6(2)	1,5(2)	1,7(2)	1,6(2)	1,7(2)	2
Totaal	164	164	164	163	164	181

**TABEL IV**  
**Die inhibeergedrag van 'n aantal Kunitz-protease-inhibeerders**

Saad of boontjie	Inhibeerder	Inhibeerderaktiwiteit Tripsien	Inhibeerderaktiwiteit Chimotripsien	Verwysing
<i>Acacia elata</i>	2	Sterk	Sterk	40
<i>Acacia sieberana</i>	DE-1	Sterk	Sterk	41
	DE-2	Sterk	Sterk	41
<i>Albizzia julibrissin</i>	All	Sterk	Sterk	39
	AIII	Sterk	Sterk	39
	BI	Geen	Sterk	39
	BII	Geen	Sterk	39
<i>Erythrina acanthocarpa</i>	DE-1	Sterk	Swak	11
	DE-2	Geen	Sterk	11
<i>Erythrina caffra</i>	DE-1	Sterk	Sterk	12
	DE-2	Baie swak	Sterk	12
	DE-3	Sterk	Sterk	12
	DE-4	Sterk	Swak	12
<i>Erythrina humeana</i>	DE-3	Sterk	Sterk	13
<i>Erythrina latissima</i>	DE-1	Swak	Sterk	14
	DE-3	Sterk	Swak	14
<i>Erythrina lysistemon</i>	DE-1	Geen	Sterk	15
	DE-2	Sterk	Swak	15
	DE-3	Sterk	Sterk	15
	DE-4	Sterk	Swak	15
<i>Erythrina zeyheri</i>	DE-1	Sterk	Swak	*
	DE-2	Geen	Sterk	*
	DE-3	Sterk	Swak	*
	DE-4	Geen	Sterk	*
	DE-5	Sterk	Swak	*
<i>Peltophoram africanum</i>	DE-1	Sterk	Sterk	42
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	2	Sterk	Swak	38
	3	Sterk	Swak	38
	B	Geen	Sterk	21
Sojaboon		Sterk	Swak	43

\*Hierdie referaat.

hibeerders ten opsigte van tripsien sowel as  $\alpha$ -chimotripsien. Daar is ook inhibeerders wat 'n sterk werking teenoor tripsien het, maar hulle inhibeer  $\alpha$ -chimotripsien ook effens, hoewel in 'n wisselende mate. Oor die algemeen kom die inhibeergedrag van protease-inhibeerders uit *E. zeyheri*-saad baie ooreen met dié van ander Kunitz-protease-inhibeerders.

## BEDANKINGS

Die outeur bedank dr. D.F. Louw, Inligtings- en Navorsingsdienste, WNNR, vir redaksionele verbeterings.

## LITERATUURVERWYSINGS

1. Tschesche, H. (1974). *Angew. Chem. Int. Edit.*, 13, 10.
2. Krukoff, B.A. & Barneby, R.C. (1974). *Lloydia*, 37, 332.
3. Raven, P.H. (1974). *Lloydia*, 37, 321.
4. Romeo, J.T. & Bell, E.A. (1974). *Lloydia*, 37, 543.
5. Hargreaves, K.D., Johnson, D.S., Millington, D.S., Mondal, W.H., Beavers, W., Becker, L., Young, C. & Rinehard, K.L., Jr (1974). *Lloydia*, 37, 569.
6. Games, D.E., Jackson, A.H., Khan, N.A. & Millington, D.S. (1974). *Lloydia*, 37, 581.
7. Hořejší, V., Ticha, M., Novotny, J. & Kocourek, J. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, 623, 439.
8. Gilboa-Garber, W. & Mizrahi, L. (1981). *Can. J. Biochem.*, 59, 315.
9. Bhattacharyya, L., Das, P.K. & Sen, A. (1981). *Arch. Biochem. Biophys.*, 211, 459.
10. Iglesias, J.L., Lis, H. & Sharon, W. (1982). *Eur. J. Biochem.*, 123, 247.
11. Joubert, F.J. (1982). *Jour. Natural Products* 45, 427.
12. Joubert, F.J. (1982). *Int. J. Biochem.*, 14, 187.
13. Joubert, F.J. (1982). *S.-Afr. Tydskr. Chem.*, 35, 67.
14. Joubert, F.J., Carlsson, F.H.H. & Haylett, T. (1981). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, 531.
15. Joubert, F.J. (1982). *Phytochem.*, 21, 1213.
16. Heussen, C., Joubert, F.J. & Dowdle, E.B.D. (Ongepubliseerde resultate).
17. Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennet, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Hegneker, H.L., Goebbel, D.V. & Collen, D. (1983). *Nature*, 301, 214.
18. Andrews, P. (1970). *Methods Biochem. Anal.*, 18, 1.
19. Ornstein, L. & Davis, B.J. "Disc electrophoresis", afdruk gemaak deur Distillation Products Industries, Rochester, New York.
20. Schwert, G.W. & Takenaka, Y. (1955). *Biochim. Biophys. Acta*, 16, 570.
21. Kortt, A.A. (1980). *Biochim. Biophys. Acta*, 624, 237.
22. Kezdy, F.J. & Kaiser, E.T. (1970) *Methods Enzymol.*, 19, 3.
23. Sanger, F. & Thompson, E.O.P. (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, 71, 488.
24. Hirs, C.H.W. (1971). *Methods Enzymol.*, 11, 59.
25. Liu, T.Y. & Chang, Y.H. (1971). *J. Biol. Chem.*, 246, 2842.
26. Ellman, G.L. (1959). *Arch Biochem. Biophys.*, 82, 70.
27. Odani, S. & Ikenaka, T. (1972). *J. Biochem.*, (Tokyo), 71, 839.
28. Odani, S. & Ikenaka, T. (1977). *J. Biochem.*, (Tokyo), 82, 1523.
29. Odani, S. & Ikenaka, T. (1978). *J. Biochem.*, (Tokyo), 83, 737.
30. Tan, C.G.L. & Stevens, F.C. (1971). *Eur. J. Biochem.*, 18, 503.
31. Stevens, F.C., Wuerz, S. & Krahn, J. (1974). *Bayer-Symp.*, 5, 344.
32. Wilson, K.A. & Laskowski, M. Sr. (1975). *J. Biol. Chem.*, 250, 4261.
33. Ishikawa, C., Nakamure, S., Watanabe, K. & Takahashi, K. (1979). *Febs. Lett.*, 99, 97.
34. Joubert, F.J., Kruger, H., Townshend, G.S. & Botes, D.P. (1979). *Eur. J. Biochem.*, 97, 85.
35. Koide, T. & Ikenaka, T. (1973). *Eur. J. Biochem.*, 32, 401.
36. Koide, T. & Ikenaka, T. (1973). *Eur. J. Biochem.*, 32, 417.
37. Koide, T., Tsunashima, S. & Ikenaka, T. (1973). *Eur. J. Biochem.*, 32, 408.
38. Kortt, A.A. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, 577, 371.
39. Odani, S., Odani, S., Ono, T. & Ikenaka, T. (1975). *J. Biochem.*, (Tokyo), 86, 1795.
40. Kortt, A.A. & Jermyn, M.A. (1981). *Eur. J. Biochem.*, 115, 551.
41. Joubert, F.J. (1983). *Phytochem.*, 22, 53.
42. Joubert, F.J. (1981). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, 1515.
43. Bosterling, B. & Quast, U. (1981). *Biochim. Biophys. Acta*, 657, 58.