

REPARTITION ET EVOLUTION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE
ACIDE DANS QUELQUES TUBERCULES D'IGNAME DE COTE D'IVOIRE

*(Distribution and evolution of acid phosphatase in some
tubers yams of Ivory Coast)*

A. KAMENAN

Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences
04 B.P. 322 ABIDJAN 04 (Côte d'Ivoire)

RESUME

La première remarque qui ressort de cette distribution est la grande richesse en phosphatases acides des cultivars de l'espèce *D. cayenensis rotundata*, comparativement aux autres espèces étudiées.

La seconde remarque est que les taux de protéines augmentent au cours de la conservation, alors que l'activité phosphatase acide cytoplasmique diminue. Cette diminution se fait au profit d'une augmentation des phosphatases acides membranaires.

Ce comportement des phosphatases acides cytoplasmiques et membranaires fait donc penser que les phénomènes physiologiques, dans lesquels les phosphatases acides sont impliquées au cours de la conservation, pourraient être des phénomènes membranaires.

La troisième remarque est que les cultivars d'ignames, riches en phosphatases acides le sont aussi en phosphorylases, ce qui accède l'idée que les phosphatases acides pourraient être des fournisseurs de phosphate inorganiques, pour le fonctionnement des phosphorylases au cours des réactions cataboliques des glucides.

SUMMARY

First, the cultivars of D. cayenensis-rotundata species are very rich when compared to the other ones studied.

Second, the level of protein climbs during the conservation while the cytoplasmic acid phosphatase activity lowers. This lowering is at the benefit of a rising of the membran acid phosphatases : the

physiological process involving acid phosphatases during conservation could be membran process.

Third, the yams cultivars with high level of acid phosphatases hold the same for phosphorylases, which leads that acid phosphatases could be the purveyors of inorganic phosphatases in the phosphorylases functioning during the catabolic reactions of the carbohydrates.

In view of this importance of acid phosphatases, it appeared necessary to go through their purification and the definition of their properties which could enlight their physiological function.

INTRODUCTION

La Côte d'Ivoire a décidé ces dernières années de s'engager résolument dans la bataille de l'autosuffisance alimentaire.

Pour que cette noble bataille soit gagnée, il faut que le pays s'assure non seulement une meilleure maîtrise des techniques de production intensive de nos denrées alimentaires, mais aussi et surtout qu'il soit capable de proposer aux producteurs des techniques de conservation rentables.

Ceci est d'autant plus nécessaire, que le potentiel alimentaire de notre pays repose en très grande partie, sur l'utilisation des tubercules tels que le manioc et l'igname dont la production intensive a toujours été freinée par de réelles difficultés de conservation après la récolte. Ces difficultés se soldent dans le cas de l'igname par exemple, par des pertes pouvant atteindre 25 pour cent de la production totale.

Les raisons de ces pertes sont essentiellement de deux ordres : il y a d'abord le facteur environnemental qui se traduit par une agression intense des tubercules par un certain nombre de prédateurs, allant des micro-organismes (bactéries, virus, champignons) (1-3) aux rongeurs (4) ; il y a ensuite le facteur métabolique, dont l'ampleur tient au fait que ces tubercules sont presque essentiellement glucidiques (80 -85 pour cent du poids sec). La mobilisation de ces glucides lors de la germination, est un phénomène néfaste puisqu'il se traduit par une perte importante de poids des tubercules après récolte.

En ce qui concerne les facteurs de dégradation dus à l'environnement du tubercule, des efforts louables ont été faits et continuent de se faire à travers l'utilisation des pesticides et autres produits chimiques pour enrayer l'action des prédateurs animaux et végétaux.

Le facteur métabolique est par contre très peu étudié. Il est cependant aisé de penser que la maîtrise de ce facteur, à travers la connaissance des enzymes du métabo-

lisme glucidique et leur implication dans la levée de dormance, peut permettre de retarder le processus de la germination et ce faisant, de prolonger la période de conservation des tubercules.

C'est dans cet esprit que notre Laboratoire dans le cadre du programme de recherches sur la conservation de l'igname, a entrepris depuis quelques années l'étude des enzymes glycolytiques de l'igname.

Deux modes de dégradation enzymatique de l'amidon sont connus depuis longtemps chez les plantes amylacées (5-6). Il s'agit d'une part, des réactions de phosphorylyse sous l'influence des phosphorylases et d'autre part de processus d'hydrolyse faisant intervenir différents types d'amylases.

Les phosphorylases ont été détectées en quantité appréciables dans tous les cultivars de *Dioscorea cayenensis rotundata*, alors que les amylases ont été trouvées en quantités prépondérantes dans les cultivars de *Dioscorea esculenta* (7-9). Il est donc aisé d'envisager l'hypothèse que le processus enzymatique de dégradation de l'amidon, prédominant chez *Dioscorea cayenensis rotundata* est un processus phosphorylytique.

Les amylases et les phosphorylases font actuellement l'objet d'une étude approfondie dans notre Laboratoire.

En ce qui concerne l'action des phosphorylases, le problème de l'apport du phosphate inorganique indispensable est un problème fondamental, que pourrait résoudre la présence dans ces tubercules de phosphatases acides dont l'étude fera l'objet du présent travail.

L'importance et le rôle des phosphatases acides végétales (E.C.3.1.3.2.) ont été largement soulignés par plusieurs auteurs : les phosphatases acides interviendraient non seulement dans l'hydrolyse des monoesters phosphoriques (10-15), mais aussi dans le transport du groupement phosphate (16-18) et dans l'absorption des solutés au niveau des parois cellulaires (14, 17, 19-23).

Le rôle des phosphatases acides dans la germination des semences de blé a été rapporté par BIANCHETTI et SARTIRANA (24) qui observent une forte activité phosphatasique chez l'embryon. Cette augmentation de l'activité phosphatasique est régulée par la teneur en phosphate inorganique des tissus. Selon MURRAY et COLLIER (15) l'élévation passagère de l'activité phosphatasique acide des pois reflète un mécanisme d'hydrolyse des esters phosphorylés et la restitution du phosphate inorganique à l'embryon.

Pour mieux cerner quelques aspects de l'importance des phosphatases acides dans le métabolisme du phosphate au niveau des tubercules d'igname, nous avons pensé qu'une étude approfondie de ces enzymes était indispensable.

Dans ce travail, nous nous proposons de suivre la répartition et l'évolution de l'activité phosphatasique acide dans quelques tubercules d'igname cultivé en Côte d'Ivoire.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Les échantillons d'ignames proviennent du champ expérimental du Pr. TOURE BAKARY et sont conservés à la température du Laboratoire (22°C). Ce sont des tubercules d'environ 1 kg, fournis à notre Laboratoire environ 10 jours après la récolte.

Méthodes

Extraction des phosphatases acides cytoplasmiques

Pour extraire les phosphatases acides cytoplasmiques, il suffit de faire éclater les cellules, soit par broyage, soit par macération aqueuse des tissus en définissant la molarité et le pH du milieu. Se basant sur ce principe d'extraction, plusieurs auteurs ont extrait et étudié des phosphatases acides cytoplasmiques de patate douce (26-31), de racines de riz (23), de seigle (32-33), de racines et grains de maïs (34-37), de feuilles de tabac (38) etc...

Pour l'extraction des phosphatases acides cytoplasmiques des cultivars de *Dioscoréacées* étudiées, des tranches de 100 g sont prélevées sur toute la longueur du tubercule épluché puis broyées dans 100 ml de tampon acétate 0,05 M pH 5,0 pendant 2 min, dans un broyeur Turmix AG. Le broyat est ensuite centrifugé pendant 15 min à 20.000 x g à 4°C. Le surnageant est ramené à chaque fois à un volume standard de 120 ml avec le tampon acétate 0,05 M pH 5,0 et est utilisé pour la détermination des activités enzymatiques. Le culot qui contient des débris membranaires est utilisé pour l'extraction des phosphatases acides membranaires.

Extraction des phosphatases acides membranaires

L'extraction des phosphatases acides liées aux débris membranaires est effectuée selon la technique de HASEGAWA et coll. (14). Le culot est lavé trois fois avec de l'eau distillée puis mis en suspension dans le tampon acétate contenant 0,2 pour cent de Triton X-100, un détergent non ionique, pour laver les débris cellulaires. Les débris sont ensuite relavés à l'eau distillée puis remis en suspension dans environ 50 ml de NaCl 0,8 M puis incubé à 4°C pendant 12 heures et centrifugé à 4°C pendant 15 min à 20.000 x g. Le surnageant est dialysé contre le tampon acétate 0,05 M pH 5,0. Il est utilisé comme extrait brut de phosphatases acides membranaires extractibles.

Détermination de l'activité enzymatique

Elle est déterminée selon la méthode de GAREN et LEVINTHAL (39) en présence de p-nitrophenyl phosphate. Le p-nitrophenol libéré est dosé colorimétriquement. L'enzyme est ajouté à 2,0 ml de substrat 0,005 M dans du tampon acétate 0,05 M pH 5,0 et incubé à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 2,0 ml de NaOH 1N. L'activité des phosphatases acides non extractibles du résidu est déterminée selon la méthode de Stafford et Bravinder-Bree (40), qui consiste à mettre en suspension une quantité déterminée du résidu dans le tampon de dosage (tampon acétate 0,1 M pH 5.0), puis de doser l'activité enzymatique de la façon habituelle.

Sauf indication contraire, une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse un mole de substrat par minute à 37°C dans des conditions expérimentales précisées

Dosage des protéines

Les protéines sont dosées suivant le stade de la purification par la méthode du biuret (41) ou par la méthode de LOWRY et coll. (42) avec comme protéine étalon, la sérum-albumine bovine.

RESULTATS

La distribution des phosphatases acide cytoplasmiques dans quelques *Dioscoréacées* de Côte d'Ivoire est présentée dans le Tableau I. Les teneurs des activités phosphatasiques des extraits cytoplasmiques (Tableau I) montrent bien que tous les cultivars étudiés contiennent des phosphatases acides cytoplasmiques mais que leurs taux sont très variables d'une espèce à une autre. Ainsi, l'espèce *D. cayenensis-rotundata* contient 3 à 4 fois plus d'enzymes cytoplasmiques de *Dioscorea alata* et 4 à 5 fois plus que *Dioscorea esculenta*

Les 8 cultivars de *D. cayenensis rotundata* étudiés ont en effet des teneurs en phosphatases acides cytoplasmiques allant de 26 à 48 unités par millilitre d'extrait, alors que chez les cultivars de *D. alata*, on trouve des valeurs de 10 à 12 unités par millilitre d'extrait. En ce qui concerne les cultivars de *D. esculenta*, il présentent les taux d'activités phosphatasiques les plus faibles mais uniformément répartis.

Contrairement à ce qui se passe chez d'autres enzymes de tubercules amyliacés (7,43), les activités phosphatasiques cytoplasmiques diminuent avec le temps de conservation dans tous les cultivars d'igname étudiés (tableau II).

Cette diminution observée chez toutes les espèces varie d'un cultivar à un autre. On note une diminution de l'activité enzymatique après 2 mois de conservation d'environ 10 % et une diminution d'activité encore plus importante après

TABLEAU I : TENEUR EN PHOSPHATES ACIDES CYTOPLASMIQUES

(U = Unités enzymatiques)

	U/ml	Protéines (mg/ml)	Activité spécifique (U/mg)
<i>Dioscorea cayenensis-rotundata</i>			
Kponan	48	2,4	20
Gnanrio	32	2	16
Kroupa	30	2	15,3
* Desoplé	28	1,9	15,1
Tinguéré	27	1,9	14,6
Dangarigué	26,8	1,9	14,2
Dicahi	26,5	1,8	14,2
Siara	26	1,8	14,1
<i>Dioscorea alata</i>			
Florido	12	1,8	6,5
Brazo-Fuerté	11,6	1,9	6,10
* Douokokoré	10	1,6	6,3
Namassou	10	1,6	6,2
Ticangangbo	10	1,6	6,2
<i>Dioscorea esculenta</i>			
N° 2	8,4	1,8	4,5
N° 3	8,8	2,0	4,4
N° 5	8,2	1,9	4,3
N° 6	8,2	1,8	4,5
N° 7	8,1	2,1	4,2
N° 8	8,1	2,3	4,1
N° 9	8,0	2,1	4,0

* Noms locaux de cultivars d'ignames

TABLEAU II : EVOLUTION DES ACTIVITES PHOSPHATASIQUES CYTOPLASMIQUES AU COURS DE 5 MOIS DE CONSERVATION.

(U = Unités enzymatiques)

(a.sp. = activités spécifiques)

CULTIVARS	A la récolte			après 2 mois			après 5 mois		
	U/ml	Protéines (mg/ml)	a.sp U/mg	U/ml	Protéines (mg/ml)	a.sp U/mg	U/ml	Protéines (mg/ml)	a.sp U/mg
<i>Dioscorea cayensis rotundata</i>									
Kponan	48	2,4	20,1	43	2,7	15,9	35	2,9	12
Gnanrio	32	2	16,0	28	2,5	11,2	25	3	8,3
* Kroupa	30	2	15,0	27	2,7	10,0	23	2,8	8,2
Desoplê	28	1,9	14,7	25,2	2,4	10,5	22	2,7	8,1
Tinguéré	27	1,9	13,9	23	2,1	10,9	20	2,6	7,7
Dangarigué	26,8	1,9	14,0	22	2,1	10,4	19	2,4	7,9
Dicahi	26,5	1,8	14,3	21	2,0	10,5	19	2,4	7,9
Siara	26	1,8	14,1	20	2,1	9,5	15	2,2	6,8

* Noms locaux de cultivars d'ignames.

5 mois de conservation. On remarque dans le tableau II, que le cultivar *D. cayenensis* var *Kponan* par exemple, passe de 48 unités/ml d'activités phosphatasiques à la récolte à 43 unités/ml après 2 mois et 35 unités/ml après 5 mois de conservation, et que le cultivar *D. cayenensis* var *Siara* perd plus de 40 pour cent de l'activité phosphatasique cytoplasmique après 5 mois, alors que *D. cayenensis* var *Desoplé* ne perd qu'environ 20 pour cent de ses activités phosphatasiques cytoplasmiques.

Cette diminution de l'activité phosphatasique cytoplasmique semble être compensée par une augmentation des activités phosphatasiques liées aux débris membranaires.

En effet, ainsi que l'indique le tableau III, l'activité phosphatasique membranaire extractible, passe de 14 unités à la récolte à 20 unités après 2 mois de conservation et 25 unités après 5 mois de conservation. L'activité phosphatasique membranaire non extractible augmente également avec le temps de conservation, en passant de 31 unités à la récolte à 34 unités après 2 mois et 36 unités après 5 mois.

DISCUSSION

Les phosphatases acides sont distribuées en quantités plus ou moins importantes selon les espèces de Dioscoréacées étudiées.

Toutefois les cultivars qui contiennent les taux de phosphatases acides les plus importants, semblent être ceux de l'espèce *D. cayenensis rotundata*, espèce qui est la plus appréciée en Côte d'Ivoire.

Alors que d'une façon générale, le taux de protéine augmente avec le temps de conservation des tubercules, on remarque ici une diminution de l'activité phosphatasique acide cytoplasmique. Cette diminution se fait au profit d'une augmentation des phosphatases acides membranaires, confirmant ainsi l'hypothèse déjà émise par DIOPOH et KAMENAN (7). On peut penser en conséquence, que les phénomènes métaboliques dans lesquels les phosphatases acides sont impliquées au cours de la période de conservation, et plus particulièrement au moment de la levée de dormance seront essentiellement des phénomènes membranaires.

Il faut noter que les différents cultivars dans lesquels le taux de phosphatases acides est élevé, sont ceux dans lesquels une importante activité phosphorylasique est aussi décelée (7). Cette situation serait en faveur de l'hypothèse, que les phosphatases pourraient être des fournisseurs de phosphate inorganique, pour le fonctionnement des phosphorylases au cours des réactions cataboliques des glucides.

TABLEAU III : REPARTITION ET EVOLUTION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE ACIDE DANS LE TUBERCULE DE *D. CAYENENSIS* ROTUNDATA VAR KPONAN AU COURS DE 5 MOIS DE CONSERVATION.

		A la récolte		après 2 mois		après 5 mois	
		Activité (U)	a.sp (U/mg)	Activité (U)	a.sp (U/mg)	Activité (U)	a.sp (U/mg)
<u>Phosphatase acide cytoplasmique</u>		48	20±0,5	43	15,9±0,4	35	12±0,2
<u>Phosphatase acide membranaire</u>	{ extractible	14	25±0,2	20	20±0,2	25	17±0,2
	{ non extractible	31	17±0,3	34	16±0,2	36	16±0,3

U = Unités enzymatiques

a.sp = Activités spécifiques

REFERENCES

- 1 FOUA-BI K. (1979) Effet de piqûres de *Aspidiella hartii* sur la levée, le développement de l'appareil végétatif et la productivité de l'igname. International Seminar, yams BUEA 1978. Report n°3 325-338.
- 2 MEHAUD T.M. (1974). Contribution à l'étude des parasites de l'igname. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (Travaux non publiés), Laboratoire de Zoologie.
- 3 FOUA-BI K. (1982). Etude de *Aspidiella Hartii* CKLL, déprédateur des ignames en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences n° d'ordre 67 ABIDJAN.
- 4 FOUA-BI K., DEMAUX M. et BABACAUH K.D. (1979). Pertes sur les ignames au cours du stockage : cause et méthodes de lutte. Culture et Technologie. Actes sur le 1er Colloque International de Technologie - YAOUNDE AUPELF (Association des Universités Partiellement ou entièrement de Langue Française).
- 5 ARREGUIN-LOZANO B. et BONNER J. (1949). Experiments on sucrose formation by potato tubers as influenced by temperature. *Plant. Physiology* 24, 720-738.
- 6 SCHWIMMER S. (1953). Enzyme systems of the white potato. *Journal of agriculture Food chemistry* 1, 1963-1069.
- 7 DIOPOH J. et KAMENAN A. (1981). Distribution de l'amylase, de la phosphorylase et de la phosphatase acide dans quelques Dioscoréacées de Côte d'Ivoire. *Physiologie Végétale* 19, 401-405.
- 8 HOUVET D., DIOPOH J., KETEKOU F.S. et MARCHIS-MOUREN G. (1982) Effets de la température sur les activités amylasiques des tubercules d'igname (*Dioscorea esculenta*). *Physiologie végétale* 20, 443-450.
- 9 HOUVET D., DIOPOH J., KETEKOU F.S. et MARCHIS-MOUREN (1982). Caractérisation et évolution des activités amylasiques des tubercules germés et non germés d'igname (*Dioscorea esculenta*) *Physiologie végétale* 20, 451-457.
- 10 SPENCER D. (1954). Effet of molybdate on the activity of tomato acid phosphatase. *Australian Journal of Biological Science.* 7, 151-160.
- 11 JOYCE B.K. and GRISOLIA S. (1960). Purification and properties of a nonspecific acid phosphatase from wheat germ. *Journal of Biological chemistry.* 235, 2278-2281.
- 12 ALVAREZ E.F. (1962). The kinetics and mechanism of the hydrolysis of phosphoric acid esters by potato acid phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* 59, 663-672.

- 13 HSU R.Y., CLELAND W.W. and ANDERSON L. (1966). Mechanism of action of the nonspecific phosphomonoesterase from potatoes. *Biochemistry* 5, 799-807.
- 14 HASEGAWA Y., LYNN K.R. and BROCKBANK W.J. (1976). Isolation and partial characterization of cytoplasmic and wall-bound acid phosphatases from wheat roots. *Canadian Journal of Botany* 54, 1163-1169.
- 15 MURRAY D.R. and COLLIER (1977). Acid phosphatase activities in developing seeds of *Pisum sativum* L. *Australian Journal of Plant Physiology* 4, 843-848.
- 16 WOOLHOUSE H.W. (1969). Differences in the properties of the acid phosphatase of plant root and their significance in the evolution of edaphic ecotypes. In *Ecological aspects of the mineral nutrition of plants*. R.H. RORISON, ed. Symposium of British and ecological society 9, 357-380 Blackwell Oxford.
- 17 BIELESKI R.L. and JOHNSON P.N. (1972). The external location of phosphatase activity in phosphorus-deficient *Spirodela oligorrhiza*. *Australian Journal of Biological Science* 25, 707-720.
- 18 BIELESKI R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annual Review of Plant Physiology*. 24, 225-252.
- 19 LAMPORT D.T.A. et NORTHCOTE D.H. (1960). The use of tissue cultures for the study of plant cell walls. *Biochemistry journal* 76, 52.
- 20 LAMPORT D.T.A. (1960). Cell wall metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*. 21, 235-270.
- 21 KUBICZ A., MORAWIECKA B. and KRUZEL N. (1974). Heterogeneity of acid phosphatase from potato tubers. *Acta Biochimica Polonica*. 21, 113-117.

- 22 KUBICZ A. (1973)
Acid phosphatase III from potato tubers, molecular weight and submit structure.
Acta Biochimica Polonica 3, 223-229.
- 23 IGAUE I., WATABE H., TAKAHASHI K., TAKEOKOSHI M. and MOROTA A. (1976)
Agricultural and Biological chemistry 40, 823-825.
- 24 BIANCHETTI R. et SARTIRANA M.L. (1967)
The mechanism of the repression by inorganic phosphate of phytate synthesis in the germinating wheat embryo.
Biochimica et Biophysica Acta, 145, 485-490.
- 25 ASHFORD A.E. et MCCULLY M.E. (1970)
Cytochemical localization of acid phosphatase in isolated aleurone. *Protoplasma* 70, 441-456.
- 26 CATESSON A.M., GOLDBERG R. et WINNY M.C. (1971)
Etudes d'activités phosphatasiques acides dans les cellules d'acer *pseudoplatanus* cultivées en suspension. *Comptes rendus de l'académie des Sciences de Paris* 272, Série D 2078-2081.
- 27 HOLCOMB G.E., HILDEBAND A.C. et EVERT R.F. (1967)
Evidence for the intervention of cell wall phosphatase in adenosine mono-phosphate utilization by acer *pseudoplatonus* cells.
American Journal of Botany 54, 1224-1229.
- 28 UEHARA K., FUJIMOTO S., TANIGUCHI T. and NAKAI K. (1974)
Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato enzymatic properties and amino acid composition.
Journal of Biochemistry 75, 639-649.
- 29 UEHARA K. FUJIMOTO S. and TANIGUCHI T. (1971)
Violet-colored acid phosphatase of sweet potato.
Journal of Biochemistry 70, 183-186.
- 30 UEHARA K., SUGENO K., KOMETANI Y. and YAMAMOTO H. (1961)
Purification of acid phosphatase of sweet potato
Seikagaku 33, 769-772.
- 31 UEHARA K., FUJIMOTO S. and TANIGUCHI T. (1974)
studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato I Purification and some physical properties.
Journal of Biochemistry 75, 627-638.
- 32 HALL J.L. and BUTT V.S. (1968)
Localization and kinetic properties of B-glycerophosphate in Barley roots.
Journal of experimental botany 19, 276-287.

- 33 HALL J.L. and BOTT V.S. (1969)
Atpase activity in cell wall preparations and excised roots of barley.
Journal of Experimental Botany 20, 751-762.
- 34 GALLACHER S.R. and LEONARD R.T. (1982)
Effect of vanadate, Molybdate, and azide on membrane-associated Atpase and soluble phosphatase activities of corn roots.
Plant Physiology 70, 1335-1340.
- 35 COUPE M. et D'AUZAC J. (1979)
Phosphatases et Atpases liées aux parois squeletiques.
Physiologie végétale 17, 801-815.
- 36 CHANG C.N. et BANDURSKI R.S. (1961)
Exocellular enzymes of corn roots.
Plant Physiology 39, 60-64.
- 37 KIVILAAN A., BEANAN T.C. et BANDURSKI R.S. (1961)
Enzymatic activities associated with cell wall preparations from corn coleoptiles.
Plant Physiology 36, 605-610.
- 38 SUZ KI T. and SATO S. (1973)
Properties of acid phosphatase in the cell wall of tobacco cells cultured in vitro.
Plant and cell physiology 14, 585-596.
- 39 GARENN A. and LEVINTHAL C. (1960)
A fine structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli*.
Biochimica et Biophysica Acta 38, 470-483.
- 40 STAFFORD H.D. and BRAVINDER-BREE (1972)
Peroxidase isozymes of first internodes of sorghum. Tissue and intracellular localization and multiple peaks of activity isolated by gel filtration chromatography.
Plant Physiology 49, 950-956.
- 41 GORNALL A.G., BARDAWILL C.J. and DAVID M.M. (1949)
Journal of Biological Chemistry 177, 751-766.
- 42 LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDAL R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
- 43 UGOCHUKWU E.N., ANOSIKE E.O. and AGOGBUA I.O.S. (1977)
Changes in enzyme activity of white yam tubers after prolonged storage.
Phytochemistry 16, 1159-1162.

