

친화성 고분자 유도체의 합성 및 단백질의 분리정제에 관한 연구
- Benzoyl-AH-Sepharose 4B의 합성 및 흰느타리버섯중 단백질의 분리정제 -

민태진[§]·장흥배·최원기*

동국대학교 화학과, *전남대학교 화학과

Synthesis of Resin Derivatives and Purification of Protein
- Synthesis of Benzoyl-AH-Sepharose 4B and Purification in
Pleurotus cornucopiae(mushroom) -

Tae-Jin Min[§], Hung-Bae Chang and Won-Ki Choi*

Department of Chemistry, College of Sciences, Dongguk University, Seoul 100-715 and

*Department of Chemistry, Chun-Nam National University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT: For selective purification of protein in *Pleurotus cornucopiae* (Per.) Rolland, affinity chromatography was performed by benzoyl-AH-Sepharose 4B gel synthesized using AH-Sepharose 4B with starting materials. Ligand capacity of benzoyl group was 9.3 micromole per milliliter of gel. Total apparent molecular weight of affinity protein was 255KD, which were protein complex of 29.5, 31.5, 34.0, 71.0 and 89.0KD, respectively. The contents of nonpolar, polar, positively charged, and negatively charged amino acid were 45.68%, 26.93%, 11.81% and 15.58%, respectively. The nonpolar protein was selectively purified by hydrophobic ligand of benzoyl group of gel.

KEYWORDS: Purification of protein, *Pleurotus cornucopiae*(Per.) Rolland.

단백질의 일반적인 분리정제법으로는 황산암모늄 등을 이용한 염색법(Dixon, 1953), Sephadex 및 agarose 등을 이용한 겔 여과법(Tanford 등, 1974; Laurent 등, 1964; Kankura 등, 1974; Whitaker, 1963; Andrews, 1965; Cooper 등, 1968; Wood 등, 1970), DEAE-Sephadex 나 CM-cellulose와 같은 이온 교환수지법(Rushizky 등, 1972; Determann 등, 1967; James 등, 1964; Novotný, 1971; Smith 등, 1978; Chibita 등, 1976) 등을 이용하고 있으나 단백질의 종류와 그 성질이 다양하기 때문에 많은 시간과 경비를 소모하게 된다. 최근에는 w-aminohexyl-Sepharose 4 B(Toroya 등, 1976), benzamidoalkyl Sepharose(Dennik 등, 1976) 및 organomercurial Sepharose(Baker 등, 1975)와 같은 친화성 크로마토그래

피 재료를 이용하여 단백질 및 효소성 단백질을 선택적으로 분리 정제하고 있다. 또한 Cuatrecasas(1970)는 coupling법을 이용하여 benzylaminosuccinoyl-AH-Sepharose 4B를 합성하였고, 이 겔을 이용하여 bovine plasma중의 amine oxidase를 선택적으로 분리하였으며(Park 등, 1986), Wang 등(1982)은 heparin을 sepharose에 coupling시켜 효소성 단백질을 분리하였으며, Yoon 등(1986)은 이것으로 췌장액중의 lysozyme을 분리 정제하였다. 이처럼 지지체의 관능기에 가교물질의 길이를 조절하고 적당한 리간드를 선택하여 화학결합시키거나, 지지체의 관능기에 적당한 리간드를 직접 결합시켜 만든 친화성 겔로 크로마토그래피 하여 단백질의 크기에 따른 특정 단백질을 효과적으로 분리 정제할 수 있다.

[§] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

본 연구는 1987년도 문교부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

본 연구에서는 친화성 고분자 물질을 합성하여 흰느타리버섯중의 단백질을 선택적으로 분리할 목적으로 w-aminohexyl기를 갖는 AH-Sepharose 4B와 sodium benzoate를 출발물질로 하여 benzoyl-aminohexyl-Sepharose 4B를 합성한 다음, UV-vis, IR spectrophotometer로 확인하고, 리간드의 capacity를 측정한다. 흰느타리버섯중의 단백질을 부분정제하여 만든 시료를 이 합성 겔을 이용하여 친화성 크로마토그래피하고 여기서 얻은 친화성 단백질의 아미노산조성, 종류 및 분자량을 측정하여 리간드와 단백질과의 관계를 실험하였다.

材料 및 方法

재 료

시료는 경기도 광릉에서 채취한 야생 흰느타리버섯, *Pleurotus cornucopiae* (Per.) Rolland를 사용하였고, 실험에 사용한 w-aminohexyl-Sepharose 4B (AH-Sepharose 4B), Sephadex G-200, 1-cyclohexyl-3-(2-morpholino ethyl) carbodiimide metho-*p*-toluene sulfonate (CMC), phosphorylase b (pp), albumin(A), ovalbumin(OB), carbonic anhydrase(CA), trypsin inhibitor(TI) 및 α -lactalbumin(α -La)는 Sigma Co. 제품을 사용하였고, sodium benzoate, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 Woko Co. 제품을, 그외의 시약은 분석용 특급을 사용하였다.

Benzoyl-aminohexyl-Sepharose 4B의 합성

AH-Sepharose 4B 15g을 0.5 M NaCl 용액 120 ml에 가하여 5시간 동안 swelling 시킨 후, 증류수 (전도도: $10 \Omega \text{ cm}^{-1}$) 3l로 염소이온이 검출되지 않을 때까지 세척하였다. 이 겔 60 ml에 증류수 60 ml를 가하고 20-25°C에서 sodium benzoate 6 mmol (0.8646g)을 소량씩 첨가한 다음, 이에 CMC 9.0 mmol (3.82g)을 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 5.0에서 5.4를 유지하면서 소량씩 가한 다음, 3시간 동안 교반하여 반응시키고, 4°C에서 12시간 방치한 후 증류수 2l로 세척하였다. 미반응의 CMC와 sodium benzoate를 제거하기 위해 pH 4.0의 증류수와 pH 8.0의 증류수로 번갈아 세척하여 여액중의 CMC의 특성흡수 220 nm와 benzoate 특성흡수 224 nm의 peak가 보이지 않을 때까지 세척하여 완전히 제거하였다.

반응물질을 실험하기 위하여 Cuatrecasas(1970)

법에 따라 확인한 결과 AH-Sepharose 4B는 진한 orange색이었으나, 합성한 benzoyl-AH-Sepharose 4B는 orange색이 없어지는 것으로 보아 반응 완결을 확인하였다.

Benzoyl-AH-Sepharose 4B의 확인

Turkova법(1978)을 인용하여 UV-vis spectrophotometer (Shimadzu M-240)로 다음과 같이 확인하였다. AH-Sepharose 4B 겔 및 benzoyl-AH-Sepharose 4B 겔을 각각 0.5 ml씩 취하고, 1 N HCl 10 ml를 각각 가하여 75°C에서 5시간 동안 완전 가수분해한 다음, 각 시료 0.2 ml를 취하여 증류수로 2 ml로 만들어 UV-vis 특성흡수변화를 관찰하였다. 또한 가수분해하여 만든 각 시료를 90°C oil bath 상에서 증발 건조한 다음 각 시료 분말을 KBr pellet으로 만들어 FT-IR (Nicolet MX-S)로 각 관능기의 특성흡수를 관찰하였다.

관능기의 capacity 측정

AH-Sepharose 4B 겔중의 아미노기 capacity 측정은 Inman법(1969)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 시료 2g을 0.5 M NaCl로 팽윤시키고 Cl^- 이온이 검출되지 않을 때까지 증류수로 세척한 다음, 다시 0.05 M NaCl 100 ml로 세척하고 증류수로 중성이 될 때까지 세척하였다. 이 겔 8 ml를 0.2 M KCl 용액 30 ml에 가한 다음, 표정한 0.189 N HCl로 pH 10.0에서 8.6까지 적정하여 0.54 ml가 소모되었다. Capacity (C)는 소모된 HCl의 밀리당량에서 최종 용액중에 유리된 OH^- 이온의 밀리당량을 뺀 값으로 계산하였다.

$$C = Nv - 0.0001V$$

N은 적정한 HCl의 농도, v는 적정한 HCl의 소모 ml수, V는 0.2 M KCl 용액 30 ml와 소모된 HCl 0.54 ml를 합한 ml수, 그리고 benzoyl-AH-Sepharose 4B 겔중의 benzoyl 리간드의 capacity는 Turkova법(1978)에 따라 시료를 1N-HCl로 가수분해 시킨 후 UV-vis로 시료중의 benzoic acid의 특성흡수 224 nm의 흡광도를 측정하고, sodium benzoate 표준용액의 검량곡선에 따라 측정하였다.

단백질의 부분정제

흰느타리버섯 1 kg을 0.1 M-phosphate 완충용액 (pH 7.0) 2 l로 균질화하여 (Homogenizer: Nihonsei Kaisha AM-77) 4,500×g에서 30분 동안 원심분리 (Dupont Sorvall OTD-75B)하여 상정액 1.5 l를 얻었다. 이를 70% 황산암모늄 포화도로 분별 침전시켜 10,000×g에서 30분 동안 원심분리하여,

침전물을 얻은 다음, 같은 완충용액중에서 2일 동안 투석하여 탈염한 후 10,000×g에서 30분 동안 원심 분리하여 상정액을 냉동건조(Labconco M-75050)하여 얻은 시료를 친화성 크로마토그래피용 단백질로 사용하였다. 위 모든 조작은 4°C에서 실시하였다.

Benzoyl-AH-Sepharose 4B 겔에 의한 친화성 크로마토그래피

위에서 얻은 단백질을 sephadex G-200으로 1차 여과(1.5×20 cm)하여 얻은 각각의 분획들을 따로 모아 합하여 냉동건조시킨 시료를 사용하였다. 친화성 겔 18 ml를 채운 column(1.3×30 cm)을 0.1 M phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 평형시킨 다음, 위에서 얻은 시료 1 ml를 가하여 같은 완충용액으로 크로마토그래피하여 비친화성 단백질들을 완전용출시킨 후, 겔에 잡힌 친화성 단백질을 1M-NaCl로 용출시켜 투석한 후 냉동건조시켰다.

시료확인을 위한 HPLC(Waters Co)는 column ; protein pak I-125, mobile phase ; 0.05M phosphate 완충용액(pH 6.8), flow rate ; 0.8 ml/min, chart speed ; 0.5 cm/min, injection ; 10 μl를 사용하여 실시하였다.

친화성 단백질의 아미노산 분석

시료 1.00 mg과 6 N HCl 3 ml를 ampoule에 넣어 질소로 치환 봉합하고 110±1°C에서 24시간 가수분해 하였다. 이를 syringe 여과한 후 90°C oil bath상에서 완전 건조한 후 0.2 M lithium citrate 완충용액(pH 2.80) 0.5 ml로 희석하여 100 μl를 ultrapac II 양이온 교환 column을 연결한 아미노산 분석기(LKB, 4150 Alpha)에 주입 분석하였다. 또한 tryptophan는 Goodwin법(1949)에 따라 UV 흡광도로 측정하였다.

친화성 단백질의 분자량 측정

3% crosslinking 된 4.5% polyacrylamide 겔(PAG)을 stacking 겔로 2% crosslinking 된 10-15% gradient zone phast PAG를 running 겔로 사용한 N-PAGE(Pharmacia co)를 이용하였다. 겔 완충용액은 0.11 M acetate-Tris 완충용액(pH 6.4), running 완충용액은 2% agarose system을 이용한 0.88 M L-alanine-0.25 M Tris 완충용액(pH 8.8)을 사용하여 다음과 같은 조건으로 전기 이동하였다.

sample apply ; down at 1.2 0 vh
up at 1.2 2vh
Step 1.1 400v 10.0 mA 2.5w 15°C 10vh

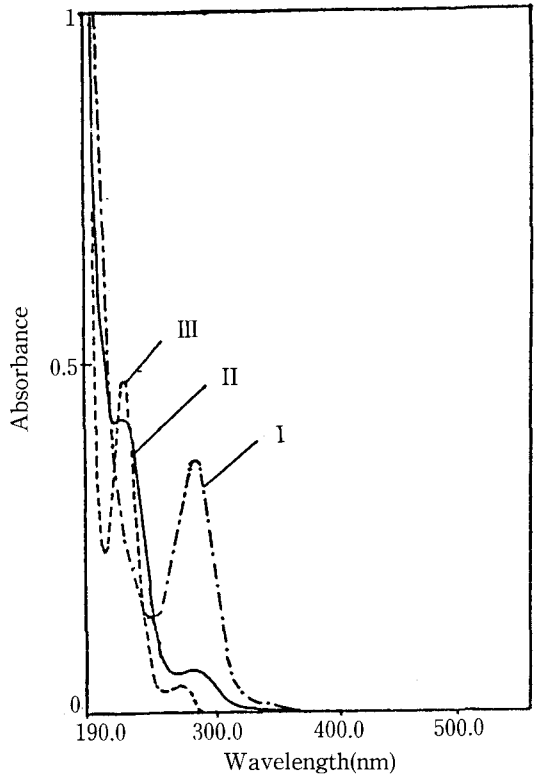


Fig.1. UV-vis spectra of w-AH-Sepharose 4B, benzoyl-AH-Sepharose 4B and benzoic acid. I; w-AH-Sepharose 4B, II; benzoyl-AH-Sepharose 4B, III; benzoic acid

Step 1.2 400v 1.0 mA 2.5w 15°C 2vh
Step 1.3 400v 10.0 mA 2.5w 15°C 268vh

結果 및 考察

Benzoyl-AH-Sepharose 4B의 합성 및 확인

앞에서 지정한 방법으로 합성한 겔을 확인하기 위하여 AH-Sepharose 4B 및 benzoyl-AH-Sepharose 4B를 Turkova 법(1978)으로 완전 가수분해하여 얻은 물질과 sodium benzoate의 UV-vis spectrum은 Fig.1과 같다. Fig.1에서 AH-Sepharose 4B의 특성흡수는 290 nm에서 단일 peak(I)를 보이고, benzoyl-AH-Sepharose 4B는 224 nm(II)와 290 nm에서 특성 흡수를 보여 224 nm에서 benzoyl기의 특성 peak 1개가 더 나타남으로서 benzoyl기가 존재함을 확인하였다. Benzoyl-AH-Sepharose 4B를 가수분해하여 만든 IR spectrum은 Fig.2와 같고, 벤젠 고리의 이중결합 신축 진동은

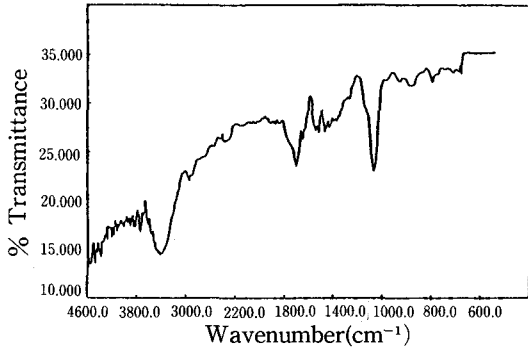


Fig.2. IR-spectrum of benzoyl-aminohexyl-Sepharose 4B.

$\nu_{C=C}$: 1, 475-1, 600 cm^{-1} 에서, carbonyl기의 신축 진동은 $\nu_{C=O}$; 1, 720 cm^{-1} 에서 확인되었으며, 1차 아민의 신축진동은 ν_{C-NH_2} ; 1, 032 cm^{-1} , 3, 000 -3, 500 cm^{-1} 에서 확인되었다.

Benzoyl기의 capacity

Inman법(1969)에 따라 측정된 AH-Sepharose 4 B 중의 amino기의 capacity는 겔 1ml당 9.5 μ mole였으며 Turkova 법(1978)에 따라 측정된 benzoyl-AH-Sepharose 4B 겔 중의 benzoyl기의 capacity를 측정된 결과 겔 1ml당 9.3 μ mol로, 친화성 크로마토그래피에 사용할 수 있는 범위내에 있음을 알았다.

Benzoyl-AH-Sepharose 4B 겔에 의한 친화성 크로마토그래피

흰느타리버섯 중의 단백질을 70% 암모늄포화물 부분 정제하여 얻은 단백질을 합성한 겔에 의하여 크로마토그래피한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서

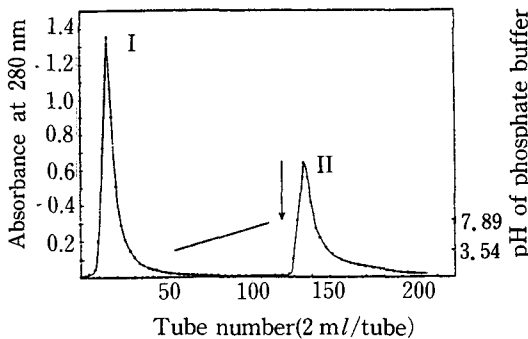


Fig.3. Affinity chromatography of partially purified protein on a column(1.3×30 cm) of benzoyl-AH-Sepharose 4B equilibrated with 0.1 M-phosphate buffer(pH 7.0). I; eluent of nonaffinity protein, II; eluent of affinity protein by 1 M-NaCl(arrow)

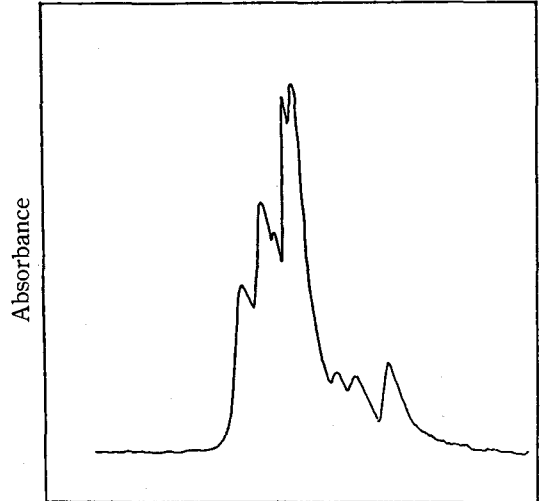


Fig.4. Chromatogram of nonaffinity protein(I) by HPLC.

Column: protein pak I-125, mobile phase: 0.05 M phosphate buffer(pH 6.8), flow rate: 1 ml/min, chart speed: 0.5 cm/min

분획 (I)은 겔중의 benzoyl기에 의하여 친화성이 없는 단백질로서, 그 분자내에 소수성 아미노산의 함량보다는 친수성 아미노산이 많은 극성 단백질이 tube No.5에서 50번 사이에서 용출되었으며, 이를 HPLC로 확인한 결과는 Fig.4와 같고, 8개의 단백질은 친화성이 없음을 알았다.

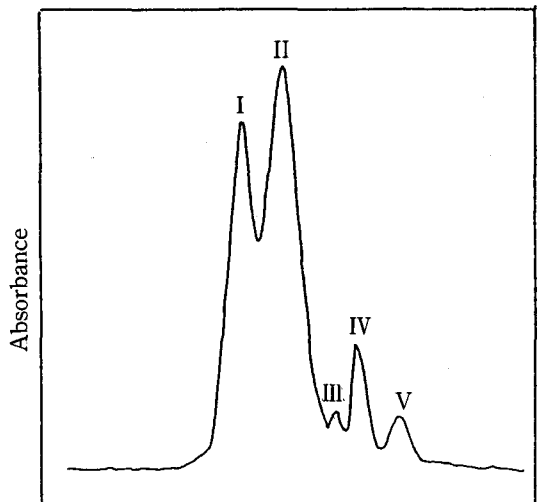


Fig.5. Chromatogram of affinity protein(II) by HPLC.

Column: protein pak I-125, mobile phase: 0.05 M-phosphate buffer(pH 6.8), flow rate: 1 ml/min, chart speed: 0.5 cm/min

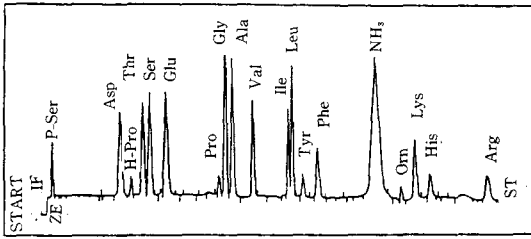


Fig.6. Chromatogram of amino acid analysis of affinity protein.

0.1 M phosphate 완충용액의 pH 3.54와 pH 7.89 완충용액으로 선형 기용기 크로마토그래피 하였으나 용출되는 단백질을 관찰할 수 없었다.

그후, 1M NaCl 수용액으로 크로마토그래피한 결과 tube No.120 이후에서 소수성 benzoyl기에 친화성이 있는 단백질 분획(II)이 용출되었다. 이를 HPLC 한 결과 Fig.5와 같이 5종의 단백질로 구성되었음을 알았다. 이로써 단백질 분획(II)는 분자내 구성 아미노산의 조성이 극성 아미노산 보다는 비극성 아미노산의 함량이 많은 비극성 단백질을 예측할 수 있었고, 이를 확인하기 위하여 아미노산 분석을 실시하였다.

친화성 단백질의 아미노산 조성

친화성 단백질(II)이 극성 단백질인지 또는 비극

Table I. Amino acid composition of affinity protein in *P. cornucopiae*(Per.) Rolland.

Amino acid	Contents(%)	Residues/Mole
Lysine	4.29	74.83
Histidine	2.31	37.96
Arginine	5.21	76.26
Aspartic acid	10.10	191.58
Threonine	6.27	134.22
Phosphoserine	2.31	31.83
Serine	6.14	143.52
Glutamic acid	5.43	94.98
Hydroxyproline	3.10	60.28
Proline	5.35	118.50
Glycine	6.40	217.39
Alanine	6.74	185.19
Valine	5.68	123.64
Isoleucine	4.95	96.23
Leucine	7.06	137.25
Tyrosine	1.98	27.86
Ornithine	0.73	14.09
Phenylalanine	5.68	87.68
Tryptophan	10.22	127.36

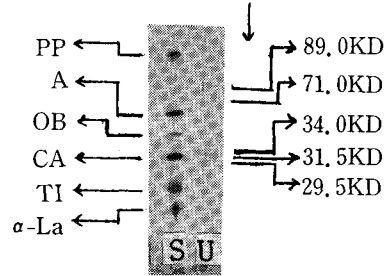


Fig.7. Patterns of affinity protein in *P. cornucopiae* by N-PAGE electrophoresis.

S: marker protein, U: sample protein

성 단백질 인지를 확인하기 위하여 아미노산 분석한 결과는 Fig.6 및 Table 1과 같다. Fig.6은 친화성 단백질을 아미노산 분석한 크로마토그램으로서 Met과 Cys은 존재하지 않았으며, 흰느타리버섯중 친화성이 있는 단백질 중에는 특이하게 극성 물질인 phosphoserine 2.31% hydroxyproline 3.10% 그리고 ornithine 0.73%가 존재함을 알았다.

Table 1에서 보는 바와 같이 친화성 단백질중의 Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe 및 Trp과 같은 비극성 아미노산 잔기의 총합량은 45.68%, Gly, Ser, Thr 및 Tyr과 같은 극성 아미노산 잔기의 총합량은 26.93%, Lys, Arg 및 His과 같은 양성 아미노산 잔기의 총합량은 11.81% 그리고 Asp, Glu과 같은 음성 아미노산 잔기의 총합량은 15.58%임

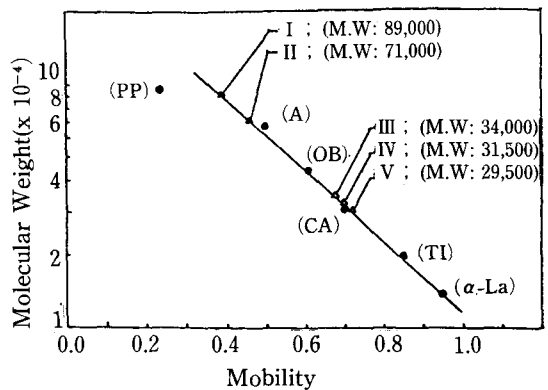


Fig.8. Apparent molecular weights of affinity protein(II) by N-PAGE.

PP: Phosphorylase b(M.W: 94,000), A: albumin(M.W: 67,000), OB: ovalbumin(M.W: 43,000), CA: carbonic anhydrase(M.W: 30,000), TI: trypsin inhibitor(M.W: 20,100), α -La; α -lactalbumin(M.W: 14,000)

을 알았다.

이로써 합성 겔중의 리간드인 benzoyl기가 비극성이기 때문에 이것에 친화성이 있는 단백질 중에는 비극성 아미노산의 함량이 45.68%로 비극성이 지배적인 단백질이 선택적으로 분리됨을 확인하였다.

친화성 단백질의 분자량

친화성 단백질(II)를 N-PAGE로 겔보기 분자량을 측정한 결과는 Fig. 7 및 Fig. 8과 같다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 친화성 단백질(II)은 5개의 단백질로 구성되어 있었고, 이들 각각의 겔보기 분자량은 Fig. 8과 같이 29,500, 31,500, 34,000, 71,000 및 89,000돌톤이었으며, 이들 분자량의 합(친화성 단백질)은 255,000돌톤이었다.

摘 要

흰느타리버섯(*Pleurotus cornucopiae*(Per.) Roland)중의 단백질을 선택적으로 분리정제하기 위하여 AH-Sepharose 4B를 출발 물질로 하여 benzoyl-AH-Sepharose 4B를 합성하여 친화성 크로마토그래피하였다.

1) AH-Sepharose 4B 중의 amino기의 capacity는 겔 1ml당 $9.5 \mu\text{mol}$ 이었으며 합성겔의 리간드인 benzoyl기의 capacity는 겔 1ml당 $9.3 \mu\text{mol}$ 이었다.

2) 친화성이 있는 단백질의 총 겔보기 분자량은 255,000 돌톤 이었으며, 이는 29,500, 31,500, 34,000, 71,000 및 89,000돌톤 단백질의 복합체였다.

3) 친화성 단백질 중의 아미노산 함량은 비극성 아미노산이 45.68%, 극성 아미노산이 26.93%, 양성 아미노산이 11.81%, 그리고 음성 아미노산이 15.58%였다.

4) 소수성 benzoyl기에 친화성이 있는 단백질은 비극성이기 선택적으로 분리되었다.

參考文獻

Ackers, G.K.(1968): Molecular sieve studies of interacting protein systems and determination of molecular size distributions. *J. Biol. Chem.* **243**: 2056-2064.
Andrews, P.(1965): The gel filtration behaviour of

proteins related to their molecular weights over a wide range. *J. Biochem.* **96**: 595-606.
Baker, S.P. and Hemsworth, B.A.(1975): Some studies on the purification of monoamine oxidase by affinity chromatography. *Brit. J. Pharmacol.* **54**: 274-275.
Chark, P.I., Kostuk, W.J. and Henderson, A.R. (1976): A simple and rapid procedure for the preparation of human LDH-I and LDH-t, using an ion-exchange mini-column. *Clin. Chim. Acta.* **69**: 361-366.
Chibita, I., Tosa, T. and Sato, T.(1976): Production of L-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. *Meth. Enzymol.* **44**: 746-759.
Cooper, P.F. and Wood, G.C.(1968): Protein-binding of small molecules. New gel filtration method. *J. Pharm. Pharmacol.* **20**(suppl): 150S-156S.
Cuatrecasas, P.(1970): Protein purification by affinity chromatography; *J. Biol. Chem.* **245**: 3059-3065.
Dennik, R.G. and Mayer, R.J.(1976): Partial purification of monoamine oxidase from rat liver by chromatography on diazo-coupled tyramine-Sepharose. *Biochem. Soc. Trans.* **4**: 344-346.
Determarn, H., Meyer, N. and Wieland, T.(1969): Ion exchanger from pearl-shaped cellulose gel. *Nature* **223**: 499-500.
Dixon, M.A.(1953): A nomogram for ammonium sulphate solutions *J. Biochem.* **54**: 457-458.
Goodwin, T.W. and Morton, R.A.(1946): The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *J. Biochem.* **40**: 628-632.
Inman, J.K.(1969): The derivatization of cross-linked polyacrylamide beads. *Biochemistry* **8**: 4074-4082.
James, K. and Stanworth, D.R.(1964): Studies on the chromatography of human serum proteins on diethylaminoethyl(DEAE)-cellulose I. The effect of the chemical and physical nature of the exchanger. *J. Chromatogr.* **15**: 324-335.
Kankura, T., Kurashina, S.I., and Nakao, M.(1974): A gel filtration technique for separation of erythrocytes from human blood. *J. Lab. Clin. Med.* **83**: 840-844.
Laurent, T., C. and Killander, J.(1964): A theory of gel filtration and its experimental verification. *J. Chromatogr.* **14**: 317-330.

- Novotný, J.(1971): Chromatography of proteins and peptides on sephadex ion-exchangers; dependence of the resolution on the elution schedule. *FEBS. Lett.* **14**: 7-10.
- Okada, G.(1975): Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma Viride*, II, purification and properties of two cellulases. *J. Biochem.* **77**: 33-42.
- Park, I.K. and Huh, K.(1986): A partial purification of bovine plasma amine oxidase by an chromatography. *J. Dongguk.* **25**: 363-370.
- Rushizhy, G. W.I., Bartos, E.M. and Sober, H.A. (1972): Chromatography of protein on ion-exchange adsorbents. *Meth. Enzymol.* **22**: 273-286.
- Smith, S. S. and Braun, R.(1978): A new method for the purification of RNA polymerase II(or B) from the lower eukaryote *physarum polycephalum*. The presence of subforms. *Eur. J. Biochem.* **82**: 309-320.
- Soholtan, W.(1964): Comparative quantitative determination of protein binding of chemotherapeutic agents by sephadex and dialysis(Article in German). *Arzneimittel-Forsch.* **14**: 146-149.
- Tanford, C., Nozaki, Y. and Reynolds, J.A.(1974): Molecular characterization of proteins in detergent solution. *Biochem.* **13**: 2369-2376.
- Toraya, T., Fujimura, M., Ikeda, S., Fukui, S., Yamada, H. and Kumagai, H.(1976): Affinity chromatography of amine oxidase from *aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Acta.* **420**: 316-322.
- Turkova(1978): Characterization of supports and immobilized affinity ligands. *J. Chromatogr.* **13**: 203-223.
- Wang, C.S., Weiser, D., Alaupovic, P. and Mcconathy, W.J.(1982): Studies on the degradation of human very low density lipoproteins by human milk lipoprotein lipase. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**: 26-34.
- Whitaker, J.R.(1963): Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. *Anal. Chem.* **35**: 1950-1953.
- Wood, G.C. and Cooper, P.F.(1970): The application of gel filtration to the study of protein-binding of small molecules. *Chromatogr. Rev.* **12**: 88-107.
- Yoon, J.O. and Ock, C.W.(1986): Purification of lysozyme from bovine pancreatic juice. *J. Dongguk.* **25**: 419-426.

Accepted for Publication 7 July