

공유결합으로 고정화된 urokinase 칼럼의 스케일업과 solid-phase refolding에 의한 반복 사용

서창우·¹안상점·²최강선·†이은규
한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹(주)녹십자백신 QA팀, ²(주)충근당 안산연구소 발효기술실
(접수 : 2001. 9. 20., 게재승인 : 2001. 10. 25.)

Scale-up of Covalently Immobilized Urokinase Column and Repeated Use of It by Solid-Phase Refolding

Chang Woo Suh, Sang Jeom Ahn¹, Gang Sun Choi², and Eun Kyu Lee[†]

Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

¹QA Team, Greencross Vaccine Corp., Yongin, Korea

²Fermentation Technology Lab, Ansan Research Center, Chong Kun Dand Pharmaceutical Corp., Ansan, Korea

(Received : 2001. 9. 20., Accepted : 2001. 10. 25.)

We scaled up a covalent immobilization system of urokinase to the activated Sepharose and used it repeatedly to cleave a fusion protein consisting of human growth hormone and GST fragment. After scale up from 6 ml to 250 mL, the column system still demonstrated basically the same performance in terms of urokinase immobilization and fusion protein cleavage. When the column was washed with 6 M guanidine HCl after the cleavage reaction, the immobilized urokinase showed no activity probably because it was fully unfolded. However, as the denaturant was gradually removed from the column the immobilized urokinase fully regained its bioactivity, which indicated it was properly refolded into its native conformation as covalently attached to the solid matrix. After 20 cycles of this 'solid-phase unfolding/refolding', the immobilized urokinase maintained approx. 80% of the initial bioactivity. This method provides an efficient protocol to apply the solid-phase refolding technique to improve the longevity of immobilized enzyme columns.

Key Words : urokinase, fusion protein, immobilized enzyme, enzyme reuse, solid-phase refolding

서론

유전자 재조합 기술의 발전에 따라 미생물 발현체계를 이용한 여러 유용 단백질, 특히 생물의약품 단백질들이 대량생산되어 왔다. 숙주세포에 의한 발현 효율을 증대시키기 위해, 또는 안정성 및 정제 특성을 향상시키기 위해 목적 단백질을 용합 단백질의 형태로 발현시키는 방법에 대한 연구가 활발히 진행중이다(1). 이때 발현된 용합 단백질로부터 단백질 분해 효소를 이용하여 목적 단백질을 절단 분리하는 과정은 목적 단백질 생산 공정의 생산 단가 및 최종 정제되는 단백질의 순도와 수율에 영향을 미치는 가장 중요한 단계의 하나이다.

단백질 분해 효소를 이용한 절단 방법은 높은 절단수율과 단순한 공정 등의 장점에 불구하고 다음과 같은 이유로 대규모 공정에서 널리 이용되지 못하고 있다. 절단 반응을 회분식으로 수행하는 경우 효소의 회수 및 재사용이 어렵고 산업적 규모에서는 효소 비용이 과다하여 용합 단백질의 장점들을 상쇄시킬 수 있다. 또한 교반에 의한 전단 응력에 의해 효소의 불활성화(inactivation)가 일어나기 쉽고, 연속 공정이 힘들고, 효소 반응 후 생성된 생성물에 의한 효소 저해(inhibition) 작용을 일으키기도 하며, 효소 반응 후 반응물, 생성물 그리고 효소가 혼합되어 있기 때문에 목적 단백질 분리가 더욱 어려워진다. 따라서 고정화 효소 반응을 도입하여 효소를 재사용할 경우 효소 비용이 대폭 절감되고 절단 반응 후 회수 및 정제 공정이 용이하여 용합 단백질 절단 공정의 경제성이 크게 향상된다. 또한 고정화된 효소는 pH 및 온도에 대한 안정성이 향상되고, 고농도 효소 반응과 연속 반응을 통해 높은 생산성을 가질 수 있는 장점이 있다.

혈전 용해제로 사용되고 있는 serine protease 계통의 urokinase (two chain urokinase type plasminogen activator)는

†Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Korea

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : ekleee@hanyang.ac.kr

enterokinase, thrombin, Factor Xa 등과 같이 절단 효소로 이용되어 왔다(2-6). Urokinase(UK)는 뇨(urine)로부터의 대량생 산공정이 이미 개발되어 있으며, 특히 대장균과 같은 원핵 세포의 발현 체계를 이용하여 활성이 있는 UK를 대량 제조 할 수 있다(7). UK를 혈전 용해제로 이용할 목적으로 담체에 고정화하는 방법이 시도되었으나, UK 절단 부위를 함유한 용합 단백질로부터 유용 단백질을 절단 분리하기 위한 목적으로 UK를 고정화하는 방법은 세계적으로도 독창성이 있으며, 이를 성공적으로 산업화할 경우 다수의 다른 유용 용합 단백질들의 경제적인 생산에 공헌할 수 있다.

본 연구에서는 기존에 본 연구팀에 의해 발표된 공유결합을 통한 고정화 UK 칼럼을(8) 스케일업하여 이를 반복적으로 사용하는 방법을 강구하는데 초점을 맞추었다. 반복 사용하는 방법으로서 절단 반응 후 강력한 변성제인 guanidine HCl을 주입하여 고정화된 상태에서 UK의 unfolding을 유도하고 이를 서서히 제거함으로써 UK가 고정화된 상태에서 refolding되어 효소 역가를 회복하는 실험을 수행하였다. 20회 이상의 반복적인 unfolding/refolding 후에도 UK 역가는 처음의 80% 이상을 유지함을 확인하였다. 고가의 UK 투입 비용의 절감할 수 있는 고정화 UK 시스템의 반복 사용은 다른 용합단백질 생산 공정에도 적용되어 파급효과가 클 것으로 기대된다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 UK는 (주)녹십자로부터 제공받았으며 352,000 IU/mL의 활성을 가지고 있다. 용합단백질은 인성장 호르몬의 C-말단기에 GST(glutathione S transferase)의 절편을 (69개의 아미노산) 용합시킨 것으로 UK 절단 부위로서 Gly-Thr-Gly-Arg의 아미노산 서열을 가진 linker로 용합되어 있다(9). Sepharose CL-6B는 Amersham Pharmacia Biotech사(Uppsala, Sweden)에서 구입하였고 gel 활성화 물질로 사용된 glycidol (2,3-epoxy-1-propanol), sodium periodate, sodium borohydride 등의 시약들은 모두 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. UK 활성 측정을 위한 기질인 ALMe(N- α -acetyl-L-lysine methyl ester hydrochloride)와 perchloric acid, chromotropic acid 등의 시약들 역시 Sigma사에서 시약급으로 구입하였다. UK 표준 물질은 (주)녹십자로부터 제공받았다.

Sepharose gel의 활성화 및 고정화 UK 칼럼에 의한 절단 반응

Sepharose 6B-CL gel(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 glycidol을 사용하여 etherification시키고 산화제인 sodium periodate(NaIO_4)을 사용하여 산화시켜 활성화시켰다. 이렇게 활성화된 gel 표면의 aldehyde기는 UK의 amine기와 공유결합 반응을 일으킨다. Sepharose gel의 활성화 반응과 UK 공유결합 고정화 반응의 상세한 절차와 분석 방법은 기존 문헌에 제시되어 있다(8,10-14).

UK 역가 분석 방법

액상과 고정화된 UK의 활성 측정은 모두 esterolytic 방법

을 사용하였다(3). 이 측정법은 넓은 범위에서 UK의 역가를 측정할 수 있는 장점이 있다. UK 역가의 단위는 CTA unit을 따랐다. UK의 1 IU는 37°C에서 1분 동안 5×10^4 μM 의 ALMe를 분해하는 것으로 정의되어진다. 고정화 및 절단 반응 후 칼럼에서 미량의 시료를 채취하여 고정화 UK의 역가를 분석하였다.

고정화 UK의 폴림과 재점힘을 통한 반복 사용

용합단백질의 절단 반응이 끝난 고정화 UK 칼럼(6 mL 규모)에 6 M GuHCl를 1 BVH(bed volume per hour)의 유속으로 30분 간 주입하여 칼럼 내에 축적된 비용출된 반응 찌꺼기 등을 변성시켜 용출시키는 동시에 고정화된 UK를 풀린 구조로 변환시킨다. 그 후 칼럼을 0.1 M phosphate 완충액(pH7.5)을 1 BVH로 1시간 동안 세척하여 GuHCl을 서서히 제거함으로써 고정화된 상태에서 3차원적 구조를 형성하는 'solid-phase refolding' 반응을 유도하였다(15,16). 재점힘 후 미량의 고정화 UK 시료를 채취하여 역가를 분석함으로써 원래의 3차원적 구조를 얻는 것을 확인하였다. 이러한 unfolding/refolding을 통한 효소의 재생(reactivation) 과정을 반복적으로 수행함으로써 경제적인 고정화 효소 공정 구축이 가능해진다.

Expanded bed adsorption 크로마토그래피를 이용한 hGH 단량체의 분리

고정화 UK 칼럼을 이용한 용합단백질의 절단 반응 후에는 미반응 용합단백질과 목적 단백질인 hGH 단량체 그리고 GST 단편이 함께 용출된다. 이러한 혼합물에서 목적 단백질인 hGH 단량체만을 분리하는 방법으로 산 침전법을 사용하였다. 용출액의 pH를 3.5로 조정하면 hGH 단량체는 상층액으로 용합단백질과 GST 절편은 침전물로 순간적으로 분리되었다(8). 산 침전 후에 원심분리에 의해 침전물을 분리할 경우 공정이 수작업화되고 hGH가 산성 환경에 오래 노출되어 변성될 위험이 있기 때문에 침전물을 제거하고 hGH를 회수하는 방법으로 원심분리 대신 expanded bed adsorption 크로마토그래피(Streamline 25TM, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 도입하였다(17,18). Sepharose SP-XL resin이 충전된 EBA 크로마토그래피 운전조건으로 loading 완충액과 유속은 0.1 M sodium phosphate (pH3.5)와 10 mL/min, 용출용 완충액과 유속은 각각 1M NaCl과 8 mL/min이었다. 이를 통해 절단 반응 후 hGH 단량체는 EBA 칼럼내에 흡착되고 침전물은 용출되는 연속공정을 구현하고자 하였다.

결과 및 고찰

스케일업된 칼럼의 UK 고정화와 절단반응 수율

스케일업 전후의 UK 고정화와 용합단백질 절단반응 성능 비교를 Table 1에 제시하였다. 칼럼 부피를 6 mL에서 250 mL로 스케일업 후에도 UK 고정화 반응 수율은 투입된 UK 총량 대비 98% 대 99%로 거의 차이가 없었다. 이는 Sepharose 겔 표면의 -OH기를 -CHO기로 바꾸는 활성화 반응 수율이 거의 같은 수준으로 유지되기 때문인 것으로(54 대 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$) 사료된다. 이에 따라 동일한 조건을 유지할 경우 절단반응의 수율도 50-60% (5 mL 규모) 대 58%(250 mL 규모)로 거의

Table 1. UK immobilization and fusion protein cleavage before and after scale-up.

Column bed volume	6 mL	250 mL
Concentration of activated aldehyde groups on gel surface	54 $\mu\text{M}/\text{mL}$	60 $\mu\text{M}/\text{mL}$
Yield of UK immobilization reaction	98%	99%
Yield of fusion protein cleavage reaction	50 - 60%	58%

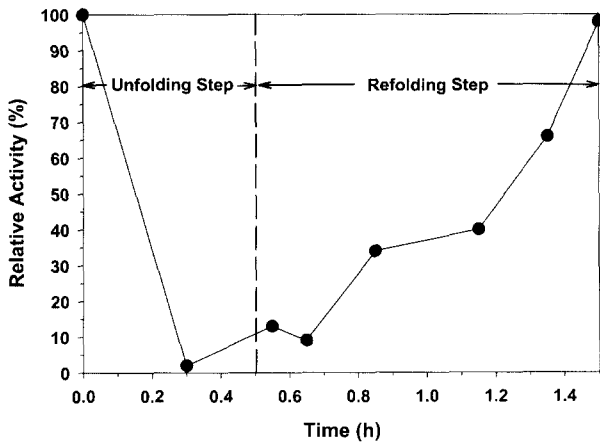


Figure 1. Reactivation profile of immobilized urokinase using solid-phase unfolding/refolding. The column was fed with 6 M GuHCl for 30 minutes, and then washed with 0.1 M phosphate buffer for 1 hour. Aliquots of resin samples were taken from the column and the UK activity was measured.

되었다. 이는 고정화된 단백질의 경우 단백질간의 molecular interaction의 감소로 응집현상이 일어나지 않기 때문에 재접힘 후 높은 효소 활성을 얻었다고 생각된다(15). 이러한 고정화 단백질의 unfolding/refolding의 과정을 Guisan(15) 등이 그림으로 표현하였다(Figure 2). 또한 UK 내의 이황화결합(disulfide bond)의 수가 12개임을 감안하면(19) 이황화결합에 따른 UK의 구조적 안정성도 높은 재접힘 수율을 얻는데 기여한 것으로 유추된다.

고정화된 상태에서의 재접힘 수율이 용액상(solution phase)에서의 재접힘보다 훨씬 우수할 수 있음을 보여 준다. 이러한 현상은 동일한 용합단백질을 음이온결합에 의해 고체 담체에 부착시킨 상태에서 재접힘을 수행하여 용액상 재접힘보다 훨씬 우수한 수율을 얻은 결과와도 일치한다(20).

칼럼 용출액에서는 UK 역가가 전혀 검출되지 않은 것으로 보아 GuHCl 처리에도 불구하고 UK와 agarose 사이의 공유결합은 그대로 유지되었다. 고정화 효소 칼럼의 경제성은 몇 회까지 반복 사용할 수 있는가에 달려 있으므로, 고정화 UK 칼럼을 반복 사용하는 방법으로서 GuHCl을 이용하여 UK의

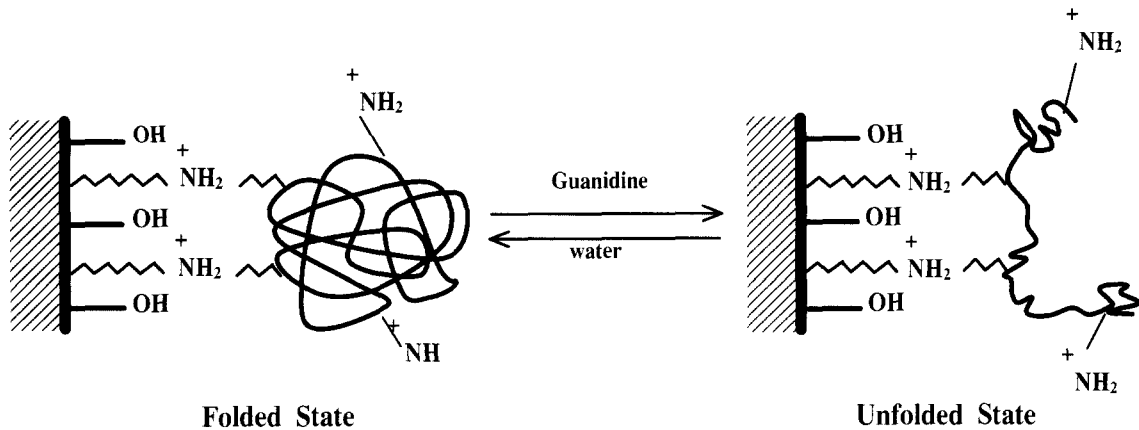


Figure 2. Unfolding and refolding scheme of immobilized enzyme. Covalent bonds with support and disulfide bonds prevent maximum unfolding of the protein (random coil is not achieved). The unfolded structures cannot undergo interactions with each other because the enzyme load is low and the molecules are dispersed on the support(15).

차이가 없었다. 이는 이 공유결합에 의한 고정화 시스템의 경우 스케일업 후에도 절단반응에 의한 물질전달이 동일하기 때문인 것으로 사료된다(4).

UK의 고정상 폴리머 재접힘을 통한 반복사용

GuHCl(6 M)에 의한 폴리머 이 변성제의 세척에 의한 재접힘으로 구성된 1 cycle에서의 고정화된 UK의 활성 변화 profile을 Figure 1에 제시하였다. GuHCl의 주입에 의해 UK 활성은 거의 모두 손실되었으나 1시간 동안 GuHCl을 세척하여 재접힘을 유도한 결과 UK 활성은 초기의 98%까지 회복

solid-phase unfolding 및 refolding을 인위적으로 유도하였다. Figure 3에서 보듯이 22회까지 반복 사용하여도 초기 역가의 약 80% 수준을 유지함을 확인하였다. 이는 고정화 UK 칼럼의 공정 경제성을 획기적으로 향상시키는 방법이 될 것으로 기대되며 고가의 기타 절단효소들에 의한 절단 반응에도 이용될 수 있을 것이다.

EBA 칼럼을 이용한 hGH 단량체의 분리회수

고정화 UK 칼럼에 의한 절단 반응에서의 용출액을 pH 3.5로 조정된 후 EBA 칼럼에 통과시킴으로써 hGH 단량체를 높

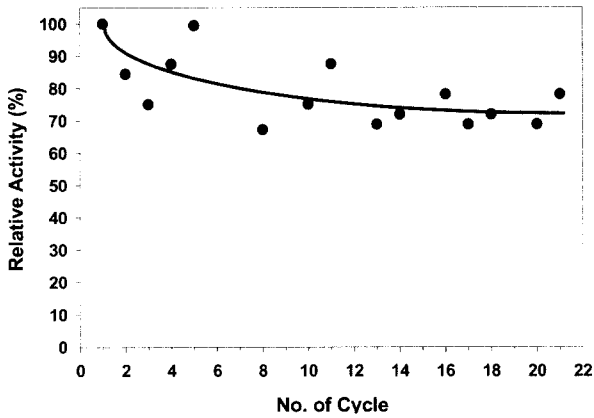


Figure 3. Stability of the immobilized UK activity upon repeated solid-phase unfolding and refolding up to 22 cycles. For each cycle, the column was fed with 6 M GuHCl for 1 hour(2 bed volume/hour) for unfolding, and then the denaturant was washed with 0.1 M phosphate buffer for 2 hours(2 bed volume /hour) for refolding. The UK activity of the resin was measured after the refolding step and compared with the initial activity.

은 수율과 순도로 회수하고 동시에 침전 이물질들을 칼럼 외부로 용출 제거할 수 있었다. Figure 4은 각 단계에서의 SDS-PAGE를 보여 주고 있다. hGH 단량체는 Streamline SP-XL resin에 양이온 교환작용에 의해 높은 수율로 흡착되었고 이는 Wright(17)와 Frej(18)의 연구결과와 흡사하였다. 흡착된 단량체는 NaCl에 의해 높은 순도로 용출되었고 (lane 5), loading 때 flow through에 의한 손실은 거의 없었다 (lane 6). 즉 컬럼 주입 후 미흡착된 용출액을 원심분리하였을 때 상층액에는 아무런 단백질도 검출되지 않았다. 따라서 고정화 UK 칼럼에 의한 융합단백질의 절단, pH stat을 이용한 산 침전에 의한 이물질 침전, EBA 크로마토그래피를 이용한 침전물 제거와 단량체 흡착 정제를 연속 공정으로 수행할 수 있

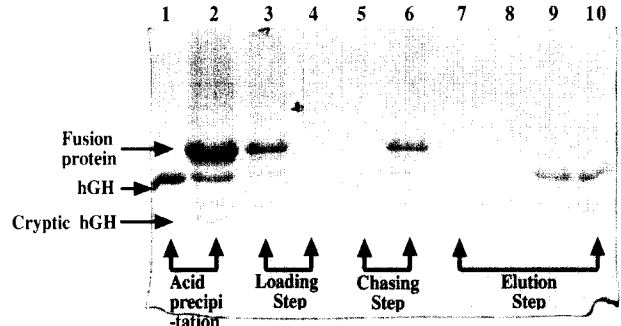


Figure 4. Purification of hGH monomer from the cleaved fusion protein by using Streamline25 column equipped with Streamline SP-XL(50 mL) (Streamline25 operating conditions were: loading buffer of 0.1 M sodium phosphate (pH 3.5) at 10 mL/min, elution buffer of 1 M NaCl at 8 mL/min). Lane 1: hGH, lane 2: resolved pellet after acid precipitate, lane 3: resolved pellet of elute at loading step, lane 4: sup. of elute at loading step, lane 5: sup. of elute at chasing step, lane 6: resolved pellet of elute at chasing step, lane 7-10: elute at elution step.

는 가능성을 제시하였다.

고정화 UK 칼럼의 경제성 분석

고정화 효소반응의 스케일업에서 절단수율은 스케일업 전 후에 동일함을 얻었다. 또한 고정화 효소반응의 장점인 반복 사용 실험에서는 20회까지 반복사용을 통해 효소의 역가가 유지됨을 알았다. 이러한 실험결과를 토대로 고정화 효소반응 시스템을 사용하였을 경우 기존의 공정 대비 경제성을 비교하였다(Table 2). 경제성 분석을 위해 두 공정의 주요한 장치비와 운전비의 차이만을 계산하였다. 이 결과로부터 절단반응을 250 mL 규모에서 20회 수행할 경우 고정화 UK 시스템은 자유(free) UK 시스템과 비교시 약 70%의 비용절감효

Table 2. Comparison of cost estimate between conventional process and new process.

	Conventional Process	New Process
Fixed Cost		
o Cleavage Reactor	10,000 won/batch ^{*1}	
- 20 L capacity/ss316/agitator		
o Centrifuge	80,000 won/batch ^{*2}	
- High-speed		
o Cleavage Column	-	
- 200ml		
o w/Peristaltic Pump	-	10,000 won/batch ^{*4}
o EBA(w/pump+detector)	-	60,000 won/batch ^{*5}
Operating Cost		
o UK(soluble)	1,000,000 won/batch	-
o Electronic cost	10,000 won/batch ^{*3}	-
o UK(immob.)	-	156,000 won/batch
o Buffer	-	20,000 won/batch
Product yield per batch	11.6 g-hGH/batch	9.1 g-hGH/batch
Total Cost	95,000 won/g-hGH	27,500 won/g-hGH

*1 Installed cost: 5000,000 won/20 year/25 batch/year operation, *2 Installed cost: 20,000,000 won/10 year/25 batch/year operation, *3 2 hours operation: max 5A × 220V × 2h = 2.2 kWh, *4 Peristaltic pump cost: 2,000,000 won/10 year/25 batch, *5 EBA installed cost: 15,000,000 won/10 year/25 batch/year

과가 있었다. 많은 융합단백질 생산공정에서 절단반응에서 차지하는 효소의 비용이 높기 때문에 이러한 고정화 효소를 이용한 공정은 경제적인 공정개선에 많은 효과를 가져올 것으로 기대된다.

요 약

Sepharose CL-6B의 기능기를 aldehyde기로 활성화시킨 후 urokinase와 공유결합 시켜 고정화하는 방법을 6 mL 규모에서 250 mL 규모로 스케일업한 결과 고정화 수율 및 고정화된 UK에 의한 절단반응 수율 등에서 스케일업 전후의 결과에 차이가 없었다. 따라서 위의 고정화 방법의 scale-up 효능은 매우 우수한 것으로 나타났다. hGH와 GST 절편으로 구성된 융합 단백질의 고정화 UK 칼럼에 의한 절단 반응 후 용출액의 pH를 3.5로 낮춤으로써 이물질들을 침전시키고 이를 expanded bed chromatography 칼럼에 통과시킨 결과, 이물질들의 제거와 hGH 단량체의 흡착분리가 동시에 이루어졌다. 흡착된 단량체는 NaCl에 의해 용출되었으며 이 단계의 수율은 거의 100%이었다. 따라서 칼럼에 의한 절단 반응과 산 침전에 의한 이물질 침전 반응, EBA에 의한 이물질 제거 및 단량체 회수 반응을 연속적으로 진행할 수 있는 기초를 제시하였다. 또한 고정화된 UK는 guanidine HCl(6 M)을 이용하여 unfolding시키고 이를 세척하여 refolding 시킨 결과 20회의 반복적인 처리 후에도 초기 활성의 약 80% 수준을 유지하였다. 이는 UK가 공유결합된 상태에서 solid-phase refolding이 가능하다는 증거이며, 고정화 효소 칼럼의 수명을 크게 향상시켜 경제성을 확보하는 방안으로 이용될 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 산업자원의 1998년도 산업기반기술개발사업(공고번호: 981-34-04) 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다. 또한 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 연구비 지원에도 감사 드립니다. 서창우 연구원은 교육부지정 국책대학원인 한양대학교 신소재공정공학원의 장학금 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Pryor, K. D and B. Leighting (1997), High level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His-tag and maltose-binding double affinity fusion system, *Protein Expr. Purif.*, **10**, 309-319.
- Harris, Y. J. (1987), Second-generation plasminogen activators, *Protein Engineering*, **1**(6), 449-458.
- Barlow, G. H. (1976), Urinary and kidney cell plasminogen activator (urokinase), *Methods in Enzymology*, **45**, 239-244.
- Sticha, K. R., C. A. Sieg, C. P. Bergstorm, P. E. Hanna, and C. R. Wagner (1997), Overexpression and large-scale purification of recombinant hamster polymorphic arylamine N-acetyltransferase as dihydroforate reductase fusion protein, *Protein Expr. Purif.*, **10**, 141-153.
- Wang, Z. M., H. Rubin, and N. M. Schechter (1995), Production of active recombinant human chymase from a construct containing the enterokinase cleavage site of trypsinogen in place of the native propeptide sequence, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, **376**, 681-682.
- Kakonen, S. M., J. Hellan, K. Pettersson, T. Lovgren, and M. Karp (1996), Purification and characterization of recombinant osteocalcin fusion protein expressed in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, **8**, 137-144.
- Tang, W., Z. Y. Sun, R. Pannell, V. Gurewich, and J. N. Liu (1997), An Efficient system for production of recombinant urokinase-type plasminogen activator, *Protein Expr. Purif.*, **11**, 279-283.
- Suh, C. W., K. Y. Kang, H. Lee, S. J. Ahn, and E. K. Lee (2000), Fusion protein cleavage by urokinase covalently immobilized to activated Sepharose gels, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**(1), 42-48.
- Cooke, N. E., J. Ray, J. G. Emery, and S. A. Libhaber (1988), Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins, *J. Biol. Chem.*, **263**(18), 9001-9006.
- Guisan, J. M. (1988), Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 375-382.
- Guisan, J. M., A. Bastida, C. Cuesta, R. Fernandez-Lafuente, and C. M. Rosell (1991), Immobilization-stabilization of α -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels, *Biotech. Bioeng.*, **38**, 1144-1152.
- Blanco, R. M. and J. M. Guisan (1988), Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachments: trypsin (amine)-agarose(aldehyde) system, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 227-232.
- Blanco, R. M., J. J. Calvete, and J. M. Guisan (1989), Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin(amine)-agarose(aldehyde) multipoint attachment, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 353-359.
- Shainoff, J. R. (1980), Zonal immobilization of proteins, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **95**(2), 690-695.
- Soler, G., A. Bastida, R. M. Blanco, R. Fernandez-Lafuente, and J. M. Guisan (1997), Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1339**, 167-175.
- Nohara, D., H. Sakakibara, E. Kurimoto, T. Hayashi, and T. Sakai (1996), A new method of media selection for protease refolding by application of immobilized Subtilisin preparation, *J. Ferm. Bioeng.*, **82**(3), 315-318.
- Wright, P. R., F. J. Muzzio, and B. J. Glasser (1999), Effect of resin characteristics on fluidized bed adsorption of proteins, *Biotechnol. Prog.*, **15**, 932-940.
- Frej, A. B., R. Hjorth, and A. Hammarstrom (1994), Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption, *Biotech. Bioeng.*, **44**, 922-929.
- Porter, W. R., H. Staack, K. Brandt, and M. C. Manning (1993), Thermal stability of low molecular weight urokinase during heat treatment. I: Effects of protein concentration, pH and ionic strength, *Thromb. Res.*, **714**, 265-279.
- Kim, C. S and E. K. Lee (2000), Effects of operating parameters in in vitro renaturation of a fusion protein of human growth hormone and glutathione S transferase from inclusion body, *Process Biochemistry*, **36**, 111-117.