

β-Tyrosinase 에 관한 연구

제 1 보, β-Tyrosinase 의 酵素學的 性質에 대하여

金燦祚, 長沢 透*, 谷 吉樹*, 山田 秀明*

忠南大學校 農科大學 食品加工學科, *京都大學 農學部 農藝化學科 醱酵生理 研究室
(1979년 12월 5일 수리)

Studies on the β-Tyrosinase

Part 1. On the Enzymological Characteristics of β-Tyrosinase

Chan-Jo Kim, Toru Nagasawa*, Yoshiki Tani*, Hideaki Yamada*

Dept. of Food Sci. & Tech., Coll. of Agri., Chungnam Univ.

*Dept. of Agri. Chem., Faculty of Agri., Kyoto Univ., Japan

Summary

β-Tyrosinase was purified and crystallized from cells of *Escherichia intermedia* A-21 grown in a medium supplemented with 0.2% L-tyrosine. Molecular weight of its subunit, Km value and absorption spectra were determined. Crystallization methods were also studied to eliminate any unnecessary procedures. The results obtained were as follows:

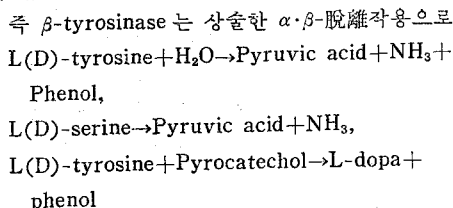
1. The purification procedure included ammonium sulfate fractionation, dialysis against potassium phosphate buffer, pH 6.0 and pH 7.0, and DEAE-Sephadex column chromatography. In the column chromatography, 11 mg of protein was applied per ml of DEAE-Sephadex for efficiency.
2. Steps of protamine sulfate treatment and Sephadex G-150 gel filtration could be eliminated for this enzyme from the known procedures.
3. The purified enzyme was dissolved in 0.01M potassium phosphate buffer containing 2-mercaptoethanol, with a concentration of 20mg/ml. Crystalline enzyme, which appears as hexagonal rods, was obtained by adding solid fine powdered ammonium sulfate to the enzyme solution.
4. Absorption maxima of the enzyme appeared at 340 and 430nm when associated with pyridoxal phosphate.
5. Km value of the enzyme for L-tyrosine was $2.31 \times 10^{-4}M$ and the molecular weight of its subunit was determined by SDS-polyacrylamide electrophoresis to be approximately 50,000.

緒 論

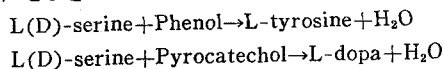
Kakihara 및 Ichihara 등은 1953년 *Bacterium*

*coli phenologenes*가 tyrosine을 분해하여 phenol을 생성하는 것을 發見하고¹⁾ 이 반응에 관여하는 酵素가 tyrosine 側鎖의 β-位置를 開裂시킴으로

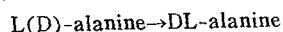
酸化酵素인 既知의 tyrosinase 와 구별하기 위하여 β -tyrosinase[tyrosine phenol lyase(deamination)(E.C. 4. 1. 99. 2)]라고 命名하였다.²⁾ 이어서 1957년 Yoshimatsu³⁾는 이 酵素가 培地中の tyrosine 으로 誘導 생성되고 또한 pyridoxal phosphate(PLP)를 補酵素로 하고 tyrosine 에 작용하여 化學量論적으로 phenol, pyruvate 및 ammonia 로 분해시킨다는 것을 밝혔다. 그후 1965년 Brot 등⁴⁾은 *Clostridium tetanomorphum* 에서 이 酵素를 부분정제하여 그 성질을 조사보고하였다. 筆者들의 한 사람인 山田^{5,6)}는 *Escherichia intermedia* A-21⁷⁾ 및 *Erwinia herbicola* AICC 21434⁸⁾에서 β -tyrosinase 를 각각 結晶狀으로 單離하여 그 分子量, 外的條件에 대한 안전성 補酵素 및 陽이온의 요구성⁹⁾, 觸媒的 성질, 그리고 작용기작등을 연구 발표하였다. 그 결과 이 酵素가 α - β -開裂반응, β -置換반응^{10,11)} 및 racemization반응¹²⁾을 촉매한다는 것을 밝히고 또한 α - β -開裂반응의 逆반응으로 tyrosine 과 3,4-dihydroxyphenol-L-alanine(L-dopa)¹³⁾ 등 tyrosine 유도체의 합성법도 발표하였다.^{14,15,16)}



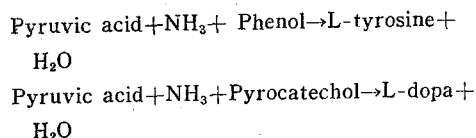
의 반응을 비롯하여 β -置換작용으로



의 반응을 하고 racemization작용으로



의 반응을 하며, 그리고 α - β -脫離작용의 逆반응으로



등의 반응을 촉매하고 vitamin B₆ 을 補酵素로 하는 효소인 것이다.

筆者 등은 *Escherichia intermedia* A-21 를 배양하여 약 300g의 균체를 얻고 이것에서 β -tyrosinase 를 結晶狀으로 單離시켰다. 그리하여 얻은 結晶酵素의 分光學的 性質과 tyrosine 에 대한 Km 값 및 電氣泳動法에 의한 이 酵素의 subunit 의

分子量을 측정하여 결과를 얻었으며 또한 이 酵素의 結晶化法에 대한 검토를 하여 약간의 知見을 얻었으므로 보고하는 바이다.

이 研究는 1978년도 文敎部 國費 國外 教授派遣 研究計劃에 의하여 日本 京都大學 農學部 農藝化學科 酸酵生理學敎室에서 이루어진 것이다.

實 驗

I. 酵素의 供試

i) 精製菌株 : *Escherichia intermedia* A-21(京都大學 農學部, AKU-0010)

ii) 菌體의 배양 : peptone 0.5%, meat ext. 0.5%, NaCl 0.2%, yeast ext. 0.05%, tyrosine 0.2%, pH7.0 으로 調製한 배지⁷⁾ 30l 를 넣은 50l 들이 jar fermentor 에 약간의 silicon 消泡劑를 가하여 殺菌하고 냉각시켜 供試菌株를 접종하여 교반과 통기(15l/min)를 하면서 28°C에서 18시간 배양한 후 9,000~10,000rpm 으로 遠沈시켜 菌體를 얻었다.

以下 酵素精製의 조작은 筆者 등의 한 사람인 山田⁷⁾에 의하여 0~5°C 下에서 하였다.

iii) 酵素의 抽出 : 얻은 洗淨菌體 305g(wet weight)를 0.005M 의 2-mercaptoethanol 를 함유하는 0.01M 磷酸카리 완충액(pH6.0)에 현탁시켜 20KC, 30분간 超音波 처리를 한 후 12,000g 에서 30분간 遠沈시켜 無細胞 추출액을 얻었다.

iv) 硫酸分劃 : 無細胞추출액에 ammonia 水로 pH 를 7.0 으로 조정하면서 硫酸을 30% 포화가 될 때까지 加하여 5°C 의 냉장실에 一夜방치후 생긴 沈澱을 20분간 12,000g 의 遠沈으로 제거하고 그 上澄액에 다시 硫酸을 60% 飽和시켜 냉장실에 一夜방치 후 생성된 침전을 遠沈으로 모아 前記한 磷酸카리 완충액으로 二일간 透析하였다. 透析에서 생긴 白濁침전은 30분간, 12,000g 의 遠沈으로 제거하였다. 그 上澄액은 0.005M 의 2-mercaptoethanol 를 함유하는 0.01M 磷酸카리 완충액(pH7.0)으로 二일간 透析하고 역시 생성된 白濁은 遠沈으로 제거하였다.

v) DEAE-Sephadex column chromatography : 上記 pH7.0 의 磷酸카리 완충액으로 平衡化시킨 DEAE-Sephadex A-50 의 column(5×85 cm)에 硫酸分劃에서 얻은 上澄액을 注加하고 같은 완충액 3l 로 세척하여 그 완충액에 0.1M-KCl 를 加한 것으로 2.1ml/min 의 속도로 溶出시켜 15.3ml 씩 分取하였다. 分取액의 酵素활성을 측

정하고 활성구분을 모아 硫安을 30~60%로 飽和시켜 농축하고 pH6.0의 0.005M의 2-mercaptoethanol을 함유하는 0.01M 磷酸카리 완충액으로 透析하였다.

vi) 硫安分劃: 透析으로 얻은 酵素액에 硫安을 30% 飽和시켜 생긴 침전을 遠沈으로 제거하고 그 上澄액에 다시 硫安을 50% 飽和시키고 3시간 攪拌후 생성된 침전을 遠沈으로 모아 0.005M의 2-mercaptoethanol를 함유하는 pH 6.0의 0.01M의 磷酸카리 완충액으로 透析하였다.

vii) Hydroxylapatite column chromatography: 透析한 酵素액을 0.01M의 上記 완충액으로 平衡化한 hydroxylapatite column(4×20cm)에 吸着시켜 0.005M의 2-mercaptoethanol을 함유하는 pH 6.0의 0.1M 磷酸카리 완충액 800ml로 세척한 후 0.005M의 2-mercaptoethanol 및 0.1M의 硫安을 함유하는 pH 6.0의 0.1M 磷酸카리 완충액으로 溶出한다. 比活性이 0.7units/mg 이상의 劃分을 모아 少量의 완충액에 녹여 結晶化를 試圖하였다.

viii) 結晶化: 酵素용액을 20mg/ml의 단백질 농도가 되게끔 pH 6.0의 0.01M의 磷酸카리 완충액에 녹여 이 용액 全體에 약간의 혼탁이 생길 때까지 固體硫安을 서서히 加하여 12,000g에서 30분간 遠沈하고 그 上澄액을 냉장고에 넣어 結晶이 커 나오게끔 하였다.

ix) 酵素의 活性측정: 酵素정제중에 酵素活性的 측정은 L-tyrosine 5 μ moles, PLP 0.8 μ moles, pH 8.0의 磷酸카리 완충액 200 μ moles 및 β -tyrosinase를 함유하는 標準반응액 4.0ml를 30°C에서 20분간 반응을 시킨 다음 30% TCA 1.0ml를 加하여 반응을 정지시키고 2,500g에서 10분간 遠沈하여 除단백을 하고 上澄액 중에 생성된 pyruvic acid를 Friedemann-Haugen 법¹⁷⁾에 따라 定量하여 측정하였다.

또한 上記 반응조건하에서 생성한 phenol를 4-aminoantipyridine으로 發色시키는 방법¹⁸⁾으로도 酵素活성을 측정하였다. 즉 上記와 같이 하여 30% TCA 1ml를 加하여 반응을 中止시킨 후 그 1ml에 10% 炭酸소다액 0.2ml를 加하여 中和시키고 충분히 脫氣한 후 0.2M 炭酸소다-硼酸완충액(pH9.1) 3.0ml를 加하고 4-aminoantipyridine (20mg/ml) 100 μ l와 potassium ferricyanide (27mg/ml) 100 μ l를 加하여 나타난 赤색을 505nm에서 측정하여 定量하였다.

x) 단백질의 定量: Hitachi 101 spectrophotometer로 280nm의 吸光度를 측정하여 定量하였다.

단백질 1% 농도에서 結晶酵素의 吸光係數($E_{1cm}^{1\%}$)는 乾燥重量的 實測으로 8.37의 값이 얻어져 있으므로¹⁹⁾ 이 연구에서는 이 값에 따라 단백질을 算出하였다.

xi) Hydroxylapatite의 調製: 효소精製에 사용한 hydroxylapatite는 Bernardi 법¹⁹⁾에 의하여 조제하였다.

II. 酵素의 성질

i) 分光學的 성질: 結晶효소를 10⁻⁴M의 PLP를 함유하는 0.1M 磷酸카리 완충액(pH7.0)에 녹여 過剩의 PLP를 제거하기 위하여 sephadex G-25의 column(1×10cm)에 通過시켰다. 단백질 6.09mg를 함유하는 劃分을 취하여 Hitachi 139 分光光度計로 그 spectrum을 측정하였다.

ii) Km 값의 측정: β -tyrosinase 0.069 unit, PLP 0.4 μ mol, 磷酸카리 완충액 200 μ mol과 각종 농도의 L-tyrosine을 함유하는 반응액 4ml를 30°C에서 20분간 반응을 시켰다. 반응속도는 1분간마다 생성된 pyruvic acid의 μ mol로서 표시하였다.

iii) 효소의 subunit 分子량의 측정: 結晶化한 β -tyrosinase와 分子량既知의 phosphorylase b, albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor 및 α -lactalbumin 등의 표준 단백질을 King-Laemmli 법²⁰⁾에 따라 sodium dodecyl sulfate(SDS) 존재하에 polyacrylamide 電氣泳動을 시켜 그 Rf 값들을 비교하여 算出하였다.

電氣泳動은 slab型(12×12cm)의 裝置를 사용하여 40mA에서 5시간 泳動시켰다. 試料은 10% glycerin, 10% 2-mercaptoethanol, 20mM Tris-HCl 완충액(pH7.9) 및 1% SDS의 존재하에 95°C에서 5분간 加熱시켜 解離처리를 하였다.

分離用 gel의 組成은 10% acrylamide, 0.27% bis-acrylamide, 0.36M Tris-HCl 완충액(pH 8.8%), 0.1% SDS, 0.12% N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine, 0.07% 過黃酸 ammonium이며 濃縮用 gel의 組成은 3% acrylamide, 0.08% bis-acrylamide, 0.125M Tris-HCl 완충액(pH 6.8), 0.1% SDS, 0.25% N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine, 0.15% 過黃酸 ammonium을 사용하였다.

結果

I. 酵素의 精製

i) DEAE-sephadex column chromatography:

Escherichia intermedia A-21 을 배양하여 얻은 균체를超音波처리로 파괴시켜 효소를 추출하고 硫酸으로 分別沈澱시킨 효소활성 1,560 units 를 함유하는 단백질 18.37g/1668ml 의 活性區分을 DEAE-Sephadex column chromatography 를 하였을 때 그 column 에서 단백질과 효소활성區分の 溶出經過는 그림 1 에 표시한 바와 같다.

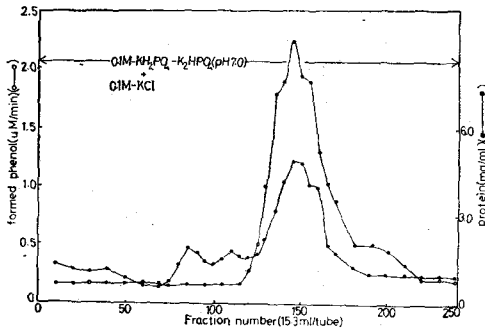


Fig. 1. Chromatography of crude β -tyrosinase on DEAE-Sephadex A-50

ii) Hydroxylapatite column chromatography:

DEAE-Sephadex column chromatography 에서 溶出되어 나온 효소활성 區分을 硫酸으로 濃縮시킨 후 pH 6.0 의 0.01M 磷酸카리 완충액으로 透析시켜 얻은 효소활성도 553 units 을 함유하는 단백질 649mg 을 hydroxylapatite column(4×20 cm)에 吸着시키고 15.2ml/r 의 속도로 溶出시키면서 9.8ml 씩 分取하였다. 各溶出劃分の 단백질과 효소활성區分은 그림 2 에 표시한 바와 같다.

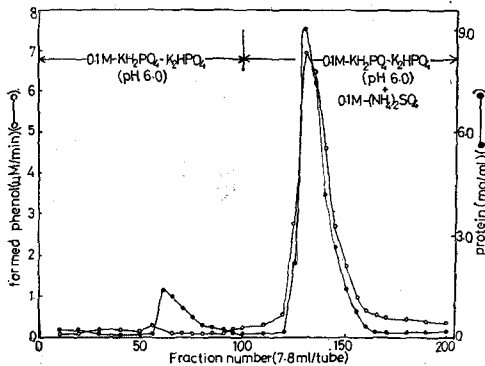


Fig. 2. Chromatography of β -tyrosinase on hydroxylapatite.

그림 2'에서의 같이 이 효소는 hydroxylapatite 의 chromatography 로 比活性도가 相當히 增大됨을 알 수 있다.

iii) 酵素의 結晶化: β -tyrosinase 結晶化과정에서 그 各 단계의 結果를 표 1 에 綜合하여 표시하였다.

Table 1. Purification of β -tyrosinase from *Escherichia intermedia* A-21.

Step	Total protein (mg)	Total units	Specific activity	Yield (%)
Cell extract	222,400	2,150	0.010	100
Ammonium sulfate	18,370	1,560	0.085	72.6
DEAE-Sephadex	1,038	670	0.645	31.2
Ammonium sulfate	649	553	0.852	25.7
Hydroxylapatite	541	510	0.943	23.7
Crystallization	194	363	1.870	16.9
Recrystallization	179	338	1.890	15.7

한편 固體硫酸의 添加로 析出되기 始作하여 冷藏下에서 충분히 生長된 酵素結晶을 顯微鏡寫眞 1 에 표시하였다. 이 寫眞에서의 같이 β -tyrosinase 는 無色の 六角棒狀임을 알 수 있다.

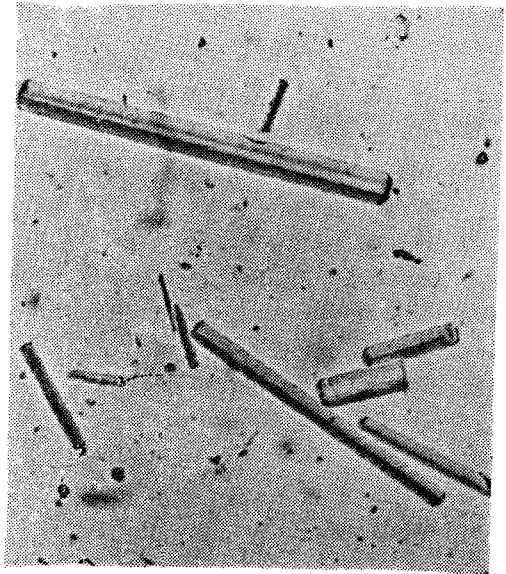


Photo. 1. Crystal of β -tyrosinase

II. 酵素의 性質

i) 補酵素 및 分光學性質: 結晶 β -tyrosinase 는 모두 apo型의 효소이며 PLP 를 첨가하지 않는 상태에서는 활성을 보이지 않는다. 또한 結晶酵素는 可視光線에 吸收部를 가지지 않는 apo-

효소이지만 그림 3에 표시한 바와 같이 PLP의 첨가로 340nm와 430nm에서 最大吸收를 나타낸다. 이것은 apo型에서 holo型으로 變換된 것을 말하는 것이며 PLP와 효소의 lysine 殘基가 水素結合 azomethin 結合에 의한 것이라고 생각되며 이것은 vit. B₆ 효소에서 공통적인 현상이다.

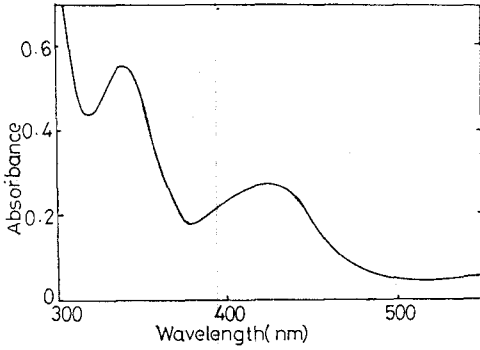


Fig. 3. Absorption spectrum of the holo β -tyrosinase.

ii) 藥學化學的 性質: β -tyrosinase는 tyrosine을 開裂하여 phenol, pyruvic acid 및 NH_3 을 생성한다. 이 β -tyrosinase의 L-tyrosine에 대한 Km 값은 그림 4에 표시한 바와 같이 $2.31 \times 10^{-4} \text{M}$ 이었다. 이 결과는 이미 발표된 山田等^{5,7)}의 결과와 잘 一致되었다.

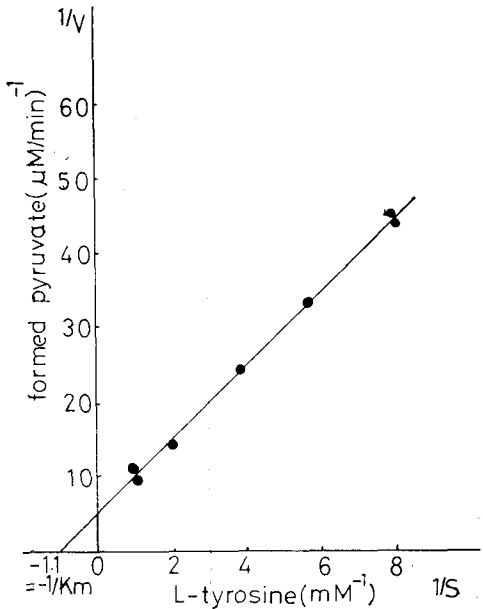


Fig. 4. Effect of substrate concentration on β -tyrosinase activity.

iii) 효소의 subunit 分子量的 측정: 結晶 β -tyrosinase를 King-Laemmli法²⁰⁾에 따라 SDS의 존재하에서 polyacryl amide 電氣泳動을 한 결과 寫眞 2에서와 같이 單一한 band가 얻어졌다. 寫眞 2에서 가운데의 band가 β -tyrosinase이며 兩쪽의 band들이 標準단백질들의 band이다.

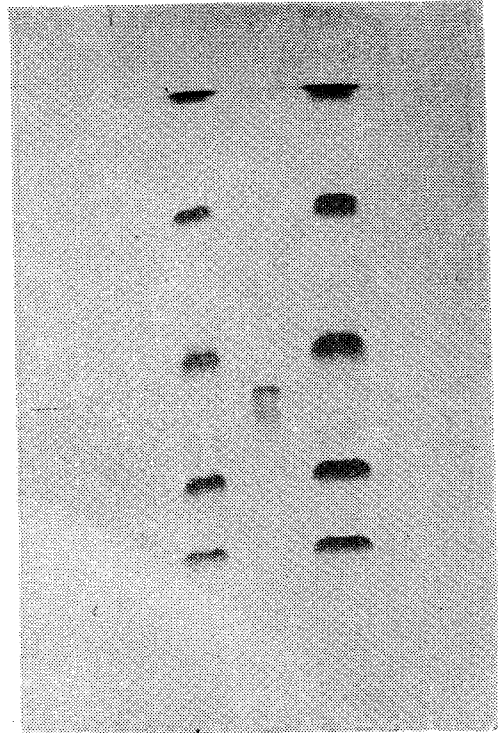


Photo. 2. The band of β -tyrosinase and standard proteins by polyacryl amide electrophoresis.

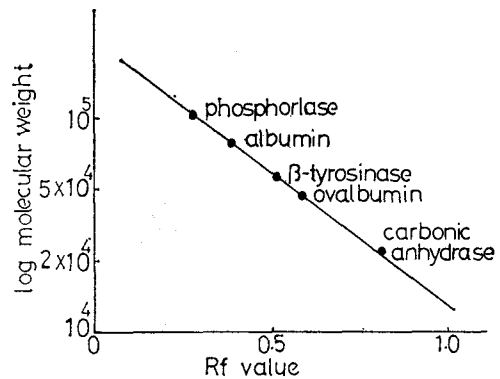


Fig. 5. Determination of subunit molecular weight of β -tyrosinase by SDS-polyacryl amide gel electrophoresis.

또한 그림 5에 표시한 바와 같이 phosphorylase-b(subunit molecular weight : 94,000), albumin(subunit m.w. : 67,000), ovalbumin(subunit m.w. : 43,000), carbonic anhydrase(subunit m.w. : 30,000), trypsin inhibitor(subunits m.w. : 20,100) 및 α -lactalbumin(subunit m.w. : 14,400)를 표준단백질로 하여 β -tyrosinase의 subunit의 분자량을 그 R_f값의 비에 의하여 계산하바 약 50,000이었다.

그림 5에서는 표준단백질의 相對的移動도를 분자량의 對數에 대하여 plot한 것이다.

考 察

β -tyrosinase는 1970年筆者들의 한 사람인 山田 등에 의하여 최초로 結晶狀으로 單離된 것이다.⁷⁾ 本實驗에서는 먼저 β -tyrosinase精製법의 簡略化를 검토하여 보고된 바 있는⁷⁾ protamine 黃酸處理법을 省略하고 또 Sephadex G-150의 gel 여과를 생략하여도 比活性 약 2units/mg 단백질의 β -tyrosinase의 結晶을 얻을 수가 있었다.

또한 pH 6.0 및 7.0의 0.01M 磷酸카리 완충액으로 透析를 각각 48시간 충분히 함으로써 不溶性의 침전을 제거할 수가 있어 比活性을 높이는 데 효과가 있었다.

DEAE-Sephadex column chromatography에서는 山田⁷⁾ 등의 보고보다 약 4배량의 DEAE-Sephadex를 즉 11mg protein/ml DEAE-Sephadex 정도로 단백질에 대하여 多量 사용하는 것이 本酵素 精製에 有効하였다.

그리고 β -tyrosinase의 結晶化에서는 단백질을 20mg/ml, 30mg/ml 및 40mg/ml의 농도가 되게끔 0.005M 2-mercaptoethanol을 함유하는 0.01M 磷酸카리 완충액에 녹여 固體硫酸을 서서히 加해서 結晶化를 시켜본 결과 20mg/ml의 농도에서 가장 큰 六角棒狀의 結晶을 얻을 수 있었으며 40mg/ml의 농도에서는 비교적 소형의 結晶이 생성되었다.

精製한 효소는 apo형이나 PLP 존재하에서 透析시킴으로 340nm와 430nm 부근에 最大吸收를 나타내는 holo형의 효소로 變換하였다.

Tris-glycine 완충액系를 사용하고 또 濃縮用 gel를 쓰는 Laemmli의 방법²⁰⁾에 의하여 0.1%의 SDS 존재하에 polyacrylamide의 電氣泳動을 한 바 분자량 50,000에 相當하는 곳에 單一한 band를 나타내었다. 이 결과는 山田 등이 검토한 磷酸소다 완충액을 쓰고 濃縮用 gel을 쓰지 않은

Weber-Osborn²¹⁾에 의한 SDS-polyacryl amide 電氣泳動의 결과와 잘 一致하였다.

要 約

Escherichia intermedia A-21의 균체에서 β -tyrosinase를 結晶狀으로 單離하여 그 酵素의 subunit의 분자량과 Km값 및 分光學的性質를 조사하고 아울러 이 酵素의 結晶化法을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 酵素의 精製과정에서 硫酸分別沈澱을 한 粗 酵素를 pH 6.0 및 7.0의 磷酸鹽완충액으로 48시간 이상의 충분한 透析를 시키고 DEAE-Sephadex column chromatography에서는 11mg protein/ml DEAE-Sephadex 정도의 DEAE-Sephadex를 사용하는 것이 효과적이었다.

2. 酵素의 精製過程에서 이미 알려진 protamine 黃酸 처리와 Sephadex G-150의 gel 여과는 생략하여도 무방하였다.

3. 酵素의 結晶化에서는 단백질을 20mg/ml의 농도가 되게끔 2-mercaptoethanol을 함유하는 0.01M 磷酸카리 완충액에 녹여 固體硫酸을 添加함으로써 結晶시키는 것이 가장 큰 六角棒狀의 結晶이 얻어졌다.

4. Pyridoxal phosphate와 結合한 holo형 β -tyrosinase는 340nm와 430nm의 波長에서 각각 最大吸收를 나타내었다.

5. β -tyrosinase의 L-tyrosine에 대한 Km값은 $2.31 \times 10^{-4}M$ 이었으며 SDS-polyacrylamide 電氣泳動法에 의한 이 酵素의 subunit의 분자량은 약 5,000이었다.

參 考 文 獻

- 1) Y. Kakihara and K. Ichihara: *Med. J. Osaka Univ.*, **3**, 497(1953)
- 2) M. Uchida, Y. Taketomo, Y. Kakihara and K. Ichihara: *Med. J. Osaka Univ.*, **3**, 509(1953)
- 3) H. Yoshimatsu: *Med. J. Osaka Univ.*, **9**, 727(1957)
- 4) N. Brot, Z. Smith, and H. Weissbach: *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 1(1965)
- 5) H. Yamada and H. Kumagai: *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 19, p.249~288, (Academic Press, INC. New York, San Francisco, London. 1975)
- 6) 日本生化學會編(山田 秀明, 熊谷 英彦 著) 生化學實驗講座(Ⅱ) アミノ酸代謝と生體アミン

- (中)東京化学同人 1976, p.612.
- 7) H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi and K. Ogata: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1767(1970)
 - 8) H. Kumagai, H. Kashima, H. Yamada, H. Enei and S. Okumura: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 472(1972)
 - 9) H. Kumagai, H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi and K. Ogata: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1773(1970)
 - 10) H. Kumagai, H. Matsui, H. Ohkishi, K. Ogata, T. Ueno and H. Fukami: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 266(1969)
 - 11) T. Ueno, H. Fukami, H. Ohkishi, H. Kumagai and H. Yamada: *Biochem. Biophys. Acta.*, **206**, 476(1970)
 - 12) H. Kumagai, N. Kashima and H. Yamada: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 796 (1970)
 - 13) H. Yamada, H. Kumagai, N. Kashima, H. Torii, H. Enei and S. Okumura: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 796(1972)
 - 14) H. Enei, H. Matsui, S. Okumura and H. Yamada: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1345(1971)
 - 15) H. Enli, H. Nakazawa, H. Matsui, S. Okumura and H. Yamada: *FEBS Letters*, **21**, 39(1972).
 - 16) H. Yamada, H. Kumagai, H. Enei, H. Matsui and S. Okumura: "Proceedings of the 7th International Fermentation Symposium, Fermentation Technology Today, Kyoto, p. 445(1972)
 - 17) Friedemann, T.E. and Haugen, G.E.: *J. Biol. Chem.*, **147**, 415(1943)
 - 18) Trinder, P.: *Ann. Clin. Biochem.*, **6**, 24. (1969)
 - 19) G. Bernardi: "Methods in Enzymology" ed. by W.B. Jakoby, Academic Press, New York, Vol. 22, p.325(1971)
 - 20) King, J. and Laemmli, U.K.: *J. Mol. Biol.*, **62**, 465, (1971)
 - 21) Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol.Chem.*, **244**, 4406(1969)