

## 재조합 효모를 이용한 Hirudin 발효생산조건의 최적화

이 동 훈 · 서 진 호 · \*손 정 훈 · \*최 의 성 · \*이 상 기

서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구센터

\*한국과학기술연구원 유전공학연구소 응용미생물그룹

### Optimization of Environmental Conditions for Hirudin Production from Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Dong-Hoon Lee, Jin-Ho Seo, \*Jung-Hoon Sohn, \*Eui-Sung Choi and \*Sang-Ki Rhee

Department of Food Science and Technology and Research Center for

New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*Applied Microbiology Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon 305-606, Korea

#### ABSTRACT

The research has been carried out to optimize a recombinant *S. cerevisiae* fermentation process for the production of an anticoagulant hirudin. The structural gene coding for hirudin was combined with the *GAL10* promoter for controlled expression, the *MFa1* signal sequence for hirudin secretion, and the *GAL7* terminator for transcriptional termination. Growth medium composition and environmental conditions were optimized for maximizing cell growth and final hirudin concentration. The optimized conditions included yeast extract 40g/ℓ, casamino acid 5g/ℓ, glucose 20g/ℓ, galactose 30g/ℓ, DO 50% and temperature 30°C. These conditions yielded the specific cell growth rate of 0.13 hr<sup>-1</sup>, the final cell density of 30 g cell/ℓ and the final hirudin concentration of 64mg/ℓ in the batch fermentation with a 2.5 ℓ jar fermentor.

#### 서 론

Hirudin은 흡혈거머리인 *Hirudo medicinalis*로부터 분리된 thrombin specific inhibitor로서 혈액의 응고작용에 관여하는 thrombin을 강력하면서도( $k_d = 10^{-11} \sim 10^{-14} M$ ) 특이적으로 저해함으로써 혈전증 치료 및 예방을 위한 약제로서의 가능성을 인정받고 있다(1, 2). Hirudin은 기존에 개발된 다른 혈전억제제에 비하여 동물이나 사람에게 immunogenicity가 거의 없고 bleeding 현상을 나타내지 않으며 cofactor가 요구되지 않는다는 장점을 지닌다(3). 1955년 처음 Markwardt 등에 의해 흡혈거머리의 머리로부터 분리된 이래, 1976년에는 Bagdi 등에

의해 거머리의 몸전체로부터 분리되어져 그 아미노산 서열이 밝혀졌다(4). 그 이후 다양한 분리방법의 개발로 현재까지 여러 hirudin 변종이 순수분리되었다(4-8). 또한 이미 밝혀진 아미노산 서열을 바탕으로 1986년에는 *Hirudo medicinalis*의 cDNA로부터 hirudin 유전자가 cloning되었다(9). 이후 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces lividans*, *Insect cell* 등을 숙주세포로 하여 hirudin 유전자가 발현되었으나 대부분 발현효율이 낮게 나타났다(7, 9-16). 따라서 본 연구에서는 hirudin 유전자가 cloning된 재조합 *S. cerevisiae*(16)를 사용하여 hirudin의 대량 발효생산을 위한 배지 및 환경인자의 최적화를 시도하였다.

일반적으로 재조합 미생물에 의한 단백질의 생산에서 제품 단백질의 분리정제 비용이 상대적으로 높으며 외부 단백질의 발현이 미생물의 생장을 저해할 우려가 있으므로 이 재조합 효모에서는 *MFa1* 분비 신호를 도입하여 발현된 hirudin이 세포외로 분비되도록 하였다. 또한 hirudin 유전자의 발현조절을 위해서 *GAL10* promoter를 사용하였고 *GAL7* terminator를 hirudin 구조유전자에 결합시켜 전사효율을 높였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 Plasmid

본 연구에서는 hirudin 유전자의 발현 및 분비를 위한 숙주세포로서 *S. cerevisiae* 2805 (*Mat a pep4: HIS3 prb1- $\delta$  can1 GAL2 his3 $\delta$  ura3-52*)를 사용하였다. Plasmid로는 일부의 pBR322 부위와 효모의 *URA3* (Orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자 및 *2 $\mu$ m* 유전자를 갖는 shuttle vector인 YEp352를 기본구조로 하여 재조합한 것을 사용하였다. 이 plasmid는 *GAL10* promoter, 접합인자  $\alpha$  분비신호(prepro leader sequence), hirudin 구조유전자, *GAL7* terminator로 구성되어 있으며 선별표지 유전자로서 *URA3* 유전자를 가지고 있다.

### 배지 및 배양방법

전배양은 yeast nitrogen base without amino acids (YNB) 6.67g/l, casamino acid 5g/l, 포도당 20g/l가 포함된 준선택배지(semi-selective medium)를 사용하여 150rpm, 30°C의 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 사용하였다. 기초실험을 위한 플라스크 배양은 500ml baffled flask의 100ml 배지에 전배양 용액을 1% 접종한 후 150rpm의 진탕배양기에서 실시하였다. 이때 배지는 준선택배지인 경우에는 YNB 6.67g/l, casamino acid 5g/l, galactose 20g/l를, 복합배지인 경우에는 yeast extract 10g/l, casamino acid 5g/l, galactose 20g/l를 기본으로 하고 여기에 실험의 목적에 따라 다른 영양소 성분을 첨가하거나 제거한 것을 사용하였다. 회분배양은 2.5 l jar 발효조(Bioflo III, New Brunswick Scientific Co. U.S.A)를 사용하였다. 회분식 배양에서는 플라스크 배양에서 결정된 yeast extract 40g/l, casamino acid 5g/l, 포도당 20g/l, galactose 30g/l 조성의 배지에 전배양 용액을 10%로 접종한 후 30°C, 900rpm, pH 5.8, 2vvm의

조건으로 배양하였다. 배양액의 pH는 2 N HCl용액과 2 N NaOH용액을 사용하여 조절하였다.

### 분석방법

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 배율(20~200배)로 희석하여 600nm에서의 O. D. (optical density)를 분광흡도계를 사용하여 측정한다. 후 다시 다음의 O. D.와 건조균체중량과의 관계식을 이용하여 환산하였다.

$$\text{건조균체중량 (g/l)} = 0.314 \times \text{O. D.} \\ (\text{optical density at 600nm})$$

배양액 중의 포도당 농도는 배양액을 13,000rpm에서 1분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 3g/l 이하가 되도록 희석한 후 Glucose Kit(Sigma Chemical Co., U.S.A)과 Glucose & Lactate Analyzer (YSI Model 2000, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. Galactose의 양은 변형된 DNS 방법(17)을 사용하여 측정하였다. DNS 용액은 0.25g 3, 5-dinitrosalicylic acid, 75g sodium potassium tartarate (Rochelle salt)를 50ml의 2 M NaOH용액에 녹인 후 다시 물로 희석하여 최종 부피 250ml로 만들어서 사용하였다. 위에서 얻은 상등액을 galactose 농도가 1g/l 이하가 되도록 희석한 시료 1ml에 DNS 용액 1ml을 넣고 100°C에서 5분간 반응시킨 후 찬물에서 급속히 냉각하여 반응을 정지시킨 다음 550nm에서의 흡광도를 측정하고 이 값을 표준곡선과 비교하여 galactose의 양을 계산하였다.

Hirudin의 양은 여러 농도로 희석된 표준시료(Boehringer Mannheim)용액과 약 0.4 ATU/ml 정도의 농도가 되도록 희석한 시료를 thrombin (Sigma Chemical Co., U.S.A) 용액(0.6 NIH U/ml) 50  $\mu$ l가 들어 있는 microplate의 각 well에 각각 50  $\mu$ l씩 넣고 Chromozym TH(Boehringer Mannheim) 용액(200  $\mu$ M)을 100  $\mu$ l씩 넣어준 다음 405nm에서 흡광도의 증가율을 96-well plate autoreader (Molecular Devices Co., U.S.A)를 사용하여 측정하고 표준시료와 시료를 비교하여 결정하였다(16).

Ethanol 농도는 13,000rpm에서 1분간 원심분리한 시료의 상등액을 취한 후 5% isopropanol 용액을 internal standard로 하여 gas chromatograph (Hewlett Packard Model 5890)를 이용하여 측정하였다.

Plasmid 안정도는 replica 방법을 사용하여 측정

하였다. 각 시간에 따라 채취한 배양액을 petri dish의 고상 복합배지 위에 약 200개의 colony가 생기도록 희석하여 도말한 후 약 24시간 동안 30℃의 항온기에서 배양하였다. 여기서 생기는 colony를 yeast extract 10g/l, casamino acid 5g/l, 포도당 20g/l, agar 20g/l의 조성을 가진 복합배지와 YNB 6.67g/l, casamino acid 5g/l, 포도당 20g/l, agar 20g/l의 조성인 준선택배지에 각각 전이한 후 다시 30℃의 항온기에 배양하여 생기는 colony 개수의 비율을 plasmid 안정도로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 아미노산 원의 영향

여러 가지 아미노산이 세포성장과 hirudin 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 500ml baffled flask에 아미노산 혼합물 2.5g/l와 5g/l, casamino acid, NZ-amine, casein peptone, polypeptone 5g/l를 YNB 6.67g/l, galactose 20g/l의 조성을 가진 배지에 각각 넣어준 준선택배지와 yeast extract 5g/l와 10g/l를 casamino acid 5g/l, galactose 20g/l의 배지에 첨가한 복합배지를 초기 pH만 5.4로 고정한 실험구와 succinate buffer를 사용하고 초기 pH를 5.4로 고정한 실험구로 나누어 실험하였다.

Buffer를 사용하지 않은 실험구에서는 pH의 저하에 의해 galactose가 다 소모되지도 못한 채 세포성장이 정지되었으나 yeast extract가 첨가된 실험구에서는 pH 저하도 적었으며 yeast extract의 농도가 증가할수록 세포성장속도도 증가하였다(Table 1). 이 결과로부터 yeast extract 10g/l, casamino acid 5g/l, galactose 20g/l의 조성에서 6.9g/l의 최대 건조균체농도와 10.3mg/l의 최대 hirudin 농도를 얻을 수 있었다. Succinate buffer를 사용하고 초기 pH를 5.4로 고정한 결과에서는 초기 pH를 고정하지 않았을 때와는 달리 casein peptone, polypeptone, NZ-amine을 함유한 준선택배지의 배양에서 균체농도가 상당히 증가된 양상을 보였지만 그에 따른 hirudin 농도는 향상되지 못한 것으로 나타났다(Table 1). 그러나 yeast extract가 첨가된 실험구에서는 hirudin 농도가 증가된 것으로 나타났으며 yeast extract 10g/l, casamino acid 5g/l, galactose 20g/l의 실험구에서 6.6g/l의 최대 건조균체농도와 11.6mg/l의 최대 hirudin 농도를 나타내었다.

**Table 1. Effect of amino acid sources on cell growth and hirudin production.**

Medium composition	Max. DCW (g/l)	Max. hirudin conc.(mg/l)	$\mu^l$ (hr <sup>-1</sup> )	Final pH
Only with initially fixed pH of 5.4				
AAM 0.25%	1.9	5.4	0.069	3.49
AAM 0.5 %	2.2	5.0	0.082	3.68
CA 0.5 %	2.7	5.0	0.075	4.04
NZ-A 0.5 %	3.6	7.6	0.097	3.31
CN-P 0.5 %	2.5	5.1	0.074	3.24
PP 0.5 %	2.5	4.2	0.080	3.53
YE 0.5 %	5.6	8.1	0.094	4.70
YE 1.0 %	6.9	10.3	0.101	5.95
With 0.1 M succinic acid buffer and initially fixed pH of 5.4				
AAM 0.25%	1.8	4.7	0.060	5.06
AAM 0.5 %	2.0	3.1	0.088	4.81
CA 0.5 %	2.4	4.6	0.062	4.71
NZ-A 0.5 %	3.8	6.0	0.080	5.18
CN-P 0.5 %	7.0	7.0	0.082	
PP 0.5 %	4.9	4.7	0.064	
YE 0.5 %	5.5	10.7	0.088	5.54
YE 0.1 %	6.6	11.6	0.071	5.72

AAM:amino acid mixture, CA:casamino acid, NZ-A: NZ-amine, CN-P:casein peptone, PP:polypeptone, YE: yeast extract

a: Specific growth rate when galactose and ethanol were utilized simultaneously

**Table 2. Effect of combination of yeast extract and different amino acid sources on cell growth and hirudin production.**

Medium composition	Max. DCW (g/l)	Max. hirudin conc.(mg/l)	Yx/s <sup>a</sup>	Yp/s <sup>b</sup>
YE 0.5%+CA 0.5%	5.4	8.5	0.36	0.56
YE 1.0%+CA 0.5%	6.2	12	0.41	0.79
YE 1.0%+NZ-A 0.5%	5.7	12	0.32	0.68
YE 1.0%+PP 0.5%	5.5	7.5	0.31	0.43

a: g cell/g substrate

b: mg hirudin/g substrate

위의 실험에서 yeast extract가 첨가된 실험구에서 더 높은 균체농도와 hirudin 농도를 나타내었으므로 yeast extract와 각 아미노산 원과의 상호작용

을 알아보기 위해 yeast extract에 casamino acid, NZ-amine, polypeptone을 각각 첨가하여 배양하였다. 그 결과 NZ-amine이 포함된 실험구에서 세포 성장속도가  $0.157\text{hr}^{-1}$ 로 가장 높게 나타났지만 균체 수율과 hirudin 수율이 casamino acid를 함유한 배지에서 각각  $0.41\text{g/g}$ ,  $0.79\text{mg/g}$ 으로 가장 높게 나타나 casamino acid를 아미노산 원으로 선별하였다. 이 조건에서  $6.2\text{g/l}$ 의 최대 건조균체농도와  $12\text{mg/l}$ 의 hirudin을 얻을 수 있었다 (Table 2).

**복합배지에서의 Plasmid 안정도**

Yeast extract가 첨가된 복합배지에서 세포성장속도, 최종 균체농도, 최종 hirudin 농도가 모두 높게 나타났지만 일반적으로 재조합 미생물의 경우 배양과 유전자의 발현에 따른 plasmid의 불안정성이 문제로 대두되기 때문에 hirudin 생산을 위한 복합배지의 사용 가능성을 살펴 보기 위하여 replica 방법으로 plasmid 안정도를 측정하였다.

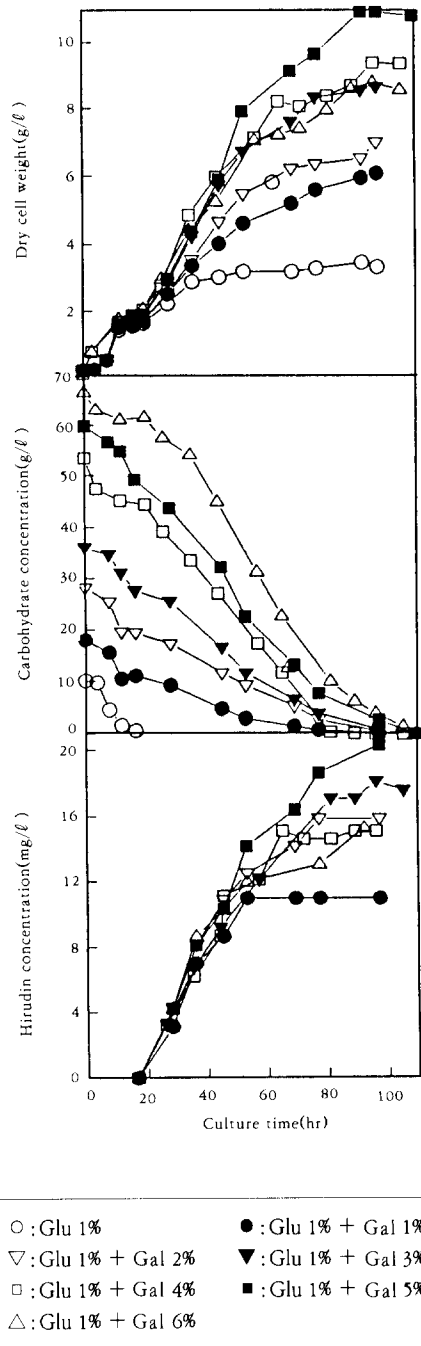
Table 3에 나타난 것처럼 yeast extract가 포함된 배지를 사용한 실험구에서 73시간의 배양을 한 후에도 plasmid 안정도가 80% 이상 높게 나타나는 것이 관찰되었으며 buffer를 사용한 실험구가 사용하지 않은 것보다 더 높게 안정도가 유지되는 것으로 나타났다. 따라서 이후의 flask 배양실험에서는 yeast extract가 함유되고 succinate buffer를 이용한 복합배지를 사용하였다.

**Galactose 농도가 Hirudin 발현유도에 미치는 영향**

본 실험에서 사용한 재조합 효모는 GAL10 promoter를 가지고 있어서 포도당이 존재하면 발현이

**Table 3. Plasmid stability during cultivation in semi-selective and complex media.**

Medium	Plasmid stability(%)			
	Culture time(hr)	15	40	73
Only with initially fixed pH of 5.4				
YNB 0.67%		84	85	74
YE 0.5 %		82	78	80
YE 1.0 %		81	80	82
With 0.1M succinic acid buffer and initially fixed pH of 5.4				
YNB 0.67%		83	87	84
YE 0.5 %		84	89	88
YE 1.0 %		80	82	87



**Fig 1. Effect of galactose concentration on the cell growth and hirudin gene expression in batch induction.**

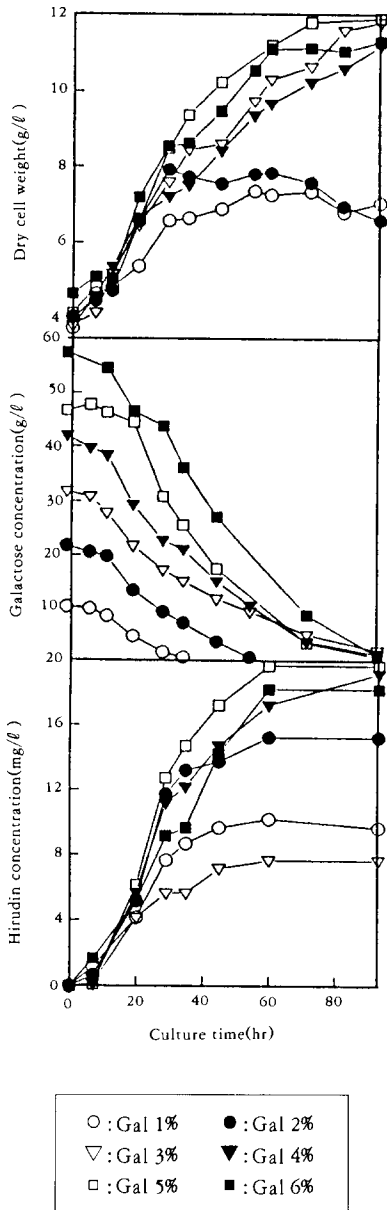


Fig 2. Effect of galactose concentration on the cell growth and hirudin gene expression in induction by medium transition.

억제되고 포도당이 없으면 galactose에 의해 hirudin 발현이 유도된다. 따라서 galactose의 농도가 GAL10 promoter의 발현에 미치는 영향을 조사하기

위하여 yeast extract 10g/l, casamino acid 5g/l로 구성된 배지에 다른 농도의 galactose를 첨가하고 세포성장속도와 hirudin의 발현속도를 조사하였다. Galactose의 농도가 hirudin 유도발현에 미치는 영향은 포도당이 10g/l 존재하는 배지에 galactose를 10~60g/l 첨가하여 포도당이 모두 소모된 후 galactose를 탄소원으로 이용하는 시기에서의 세포성장속도와 hirudin의 생성을 조사하는 방법과 포도당만 존재하는 배지에서 배양한 세포를 원심분리하여 탄소원으로 galactose만을 10~60g/l 포함한 배지에 재현탁시킨 후 배양하여 세포성장과 hirudin의 생산을 관찰하는 방법을 사용하였다.

Fig. 1과 2에 나타난 바와 같이 위의 두 방법을 사용해서 hirudin의 유도발현을 조사한 결과 galactose 50g/l를 포함한 실험구에서 모두 가장 높은 균체농도와 hirudin 농도를 나타내었다. 초기부터 포도당과 galactose를 같이 첨가한 실험구에서는 11g/l의 건조균체농도와 20mg/l의 hirudin 농도를 얻을 수 있었고 galactose만 포함된 새 배지에 원심분리한 균체를 재현탁시킨 실험에서는 각각 12g/l, 20mg/l의 건조균체농도와 hirudin을 생산할 수 있었다.

Yeast extract 농도의 영향

위에서 결정된 galactose 50g/l, casamino acid 5g/l의 조성에 각기 다른 농도의 yeast extract를 첨가하여 배양하면서 세포성장과 hirudin의 발현을 관찰한 결과 Table 4에 나타난 바와 같이 yeast extract 40g/l에서 각각 0.54g/g과 1.32mg/g의 세포와 hirudin 수율을 얻을 수 있었으며 이때 최대 건조균체농도는 27g/l, 최대 hirudin 농도는 66mg/l였다.

Table 4. Effect of yeast extract concentration on cell growth and hirudin production.

Yeast extract conc.(g/l)	Max. DCW (g/l)	Max. hirudin conc.(mg/l)	Yx/s <sup>a</sup>	Yp/s <sup>b</sup>
10	20	61	0.40	1.22
30	18	56	0.36	1.12
40	27	66	0.54	1.32
50	22	64	0.44	1.28
60	24	61	0.48	1.22

a : g cell/g substrate

b : mg hirudin/g substrate

**용존산소(DO) 농도의 영향**

배지 내의 용존산소 농도가 세포의 증식과 hirudin의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 발효조에 내장된 DO 조절기를 이용하여 각각 10%, 50%, 80%로 DO를 유지시키면서 발효형태를 관찰하였다. DO 조절을 위해서 10%, 50%는 공기만을, 80%는 공기와 산소를 혼합하여 사용하였다. Table 5에서 보면 DO 10%를 제외하면 DO 값을 조절하는 것에서 균체수율과 hirudin 수율이 단순히 2vvm로 공기를 공급할 때의 0.43g/g, 0.96mg/g에 비해 각각 0.59g/g, 1.19mg/g과 0.55g/g, 1.25mg/g으로 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한 DO 농도가 10%에서 80%로 증가함에 따라 hirudin 수율은 0.91mg/g에서 1.25mg/g으로, 세포성장속도는 0.12hr<sup>-1</sup>에서 0.14hr<sup>-1</sup>로 높아지지만 균체수율은 오히려 0.65g/g에서 0.55g/g으로 감소하는 것으로 나타났다. 또 주목해야 할 사항으로 DO 값을 10%로 유지시켰을 때에는 hirudin 수율이 0.91mg/g으로 매우 낮게 나타나므로 hirudin의 생산을 위해서는 DO 값을 10% 이상으로 유지시키는 것이 중요함을 알 수 있다. 따라서 이후의 회분식 배양에서는 DO 농도를 50%로 유지하였다.

**온도의 영향**

Galactose를 세포 내로 이동시키는데 관련된 효소

들이나 hirudin 유전자의 발현에 관계된 효소들이 온도에 따른 활성이 달라질 수 있으므로 galactose를 탄소원으로 하여 성장하기 시작할 때 발효기의 온도를 각각 25℃와 35℃로 전이하여 세포성장과 hirudin의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Table 6에 나타난 것처럼 온도를 25℃로 전이하였을 경우에는 30℃로 유지시켰을 때에 비해 세포성장속도는 0.128hr<sup>-1</sup>에서 0.086hr<sup>-1</sup>으로 감소하지만 균체수율은 0.59g/g에서 0.63g/g으로, hirudin 수율은 1.19mg/g에서 1.28mg/g으로 증가되는 경향을 나타내었다. 온도를 35℃로 전이하였을 경우에는 세포 성장속도는 0.128hr<sup>-1</sup>에서 0.134hr<sup>-1</sup>로 증가하였으나 균체수율과 hirudin 수율은 각각 0.59g/g에서 0.45g/g으로, 1.19mg/g에서 0.82mg/g으로 낮아졌다. 결론적으로 25℃와 30℃에서 생성된 균체와 hirudin의 양이 30g/l와 64mg/l로 같게 나타나므로 최적 hirudin 발현온도는 30℃로 고정하였다.

이상의 실험에서 최적화된 조건(yeast extract 40g/l, casamino acid 5g/l, 포도당 20g/l, galactose 30g/l, DO 50%, 온도 30℃)으로 2.5 l 발효조에서 회분식배양을 수행한 결과 세포비성장속도는 0.13hr<sup>-1</sup>, 최종 건조균체농도는 30g cell/l, 최종 hirudin 농도는 64mg/l로 나타났다(Fig. 3).

**Table 5. Effect of dissolved oxygen concentration on cell growth and hirudin production in a medium with 2% glucose and 3% galactose.**

Concentration of Dissolved oxygen	Max. DCW(g/l)	Max. hirudin conc.(mg/l)	$\mu^a$	$Y_{x/s}^b$	$Y_{p/s}^c$
2VVM	22	50	0.12	0.43	0.96
10%	32	46	0.12	0.65	0.91
50%	30	64	0.13	0.59	1.19
80%	28	65	0.14	0.55	1.25

a : Specific growth rate when galactose and ethanol were utilized simultaneously

b : g cell/g substrate

c : mg hirudin/g substrate

**Table 6. Effect of temperature shift on cell growth and hirudin production.**

Temperature shift(℃)	Max. DCW(g/l)	Max. hirudin conc.(mg/l)	$\mu^a$	$Y_{x/s}^b$	$Y_{p/s}^c$
25	30	64	0.086	0.63	1.28
30	30	64	0.128	0.59	1.19
35	22	41	0.134	0.45	0.82

a : Specific growth rate when galactose and ethanol were utilized simultaneously

b : g cell/g substrate

c : mg hirudin/g substrate

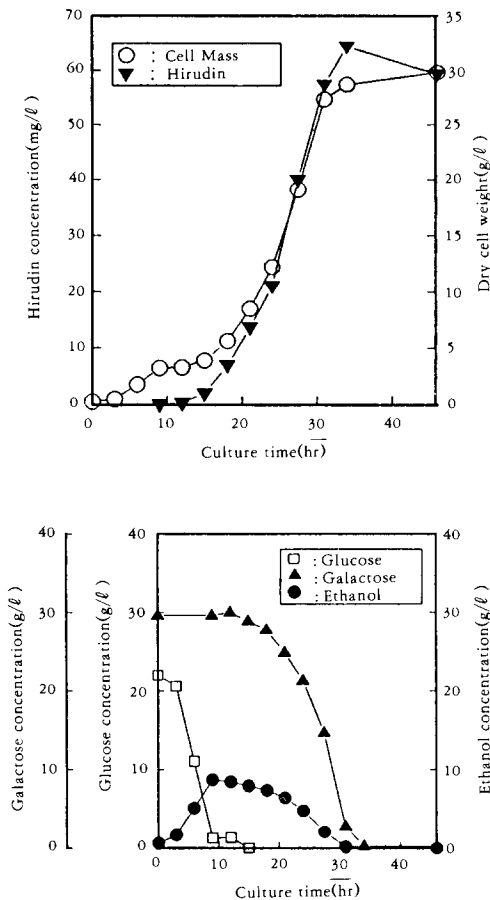


Fig. 3. Batch fermentation profiles under the optimized conditions (yeast extract 40g/l, casamino acid 5g/l, glucose 20g/l, galactose 30g/l, DO 50%, pH 5.8, temperature 30°C).

### 요 약

재조합 효모를 이용한 hirudin 발효생산조건의 최적화 연구를 수행하였다. Hirudin 유전자는 *GAL10* promoter와 *MfaI* 분비신호, *GAL7* terminator와 결합되어 있다. 재조합 효모의 성장속도와 hirudin 최종 농도를 증가시키기 위하여 최적의 배지조성과 배양조건을 결정하였다. 최적의 배지조성과 배양조건은 yeast extract 40g/l, casamino acid 5g/l, 포도당 20g/l, galactose 30g/l, DO 50%, 온도 30°C였다. 이 조건으로 2.5 l 발효조에서 회분식배

양을 수행한 결과 비성장속도는  $0.13\text{hr}^{-1}$ , 최종 건조균체농도는 30g cell/l, 최종 hirudin 농도는 64mg/l로 나타났다.

### 참고문헌

1. F. Markwardt(1970), *Methods in Enzymol.*, (G. E. Perlmann and L. Lorand, eds), Vol. 19, 924, Academic Press, New York.
2. S. R. Stone and J. Hofsteenge(1986), *Biochemistry*, **25**, 4622.
3. F. Markwardt, J. Hauptmann, G. Nowak, C. Klessen and P. Walsmann(1982), *Thromb. Haemostasis*, **47**, 226.
4. D. Bagdy, E. Barabas, L. Graf, P. Ellebaek and S. Magnusson(1976), *Meth. Enzymol.*, **45**, 669.
5. P. Walsmann and F. Markwardt(1985), *Thromb. Res.*, **40**, 563.
6. L. Graf, A. Patthy, E. Barabas and D. Bagdy(1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 416.
7. S. J. T. Mao, M. T. Yates, D. T. Blankenship, A. D. Cardin, J. L. Krstenansky, W. Lovenberg and R. L. Jackson(1987), *Anal. Biochem.*, **161**, 514.
8. I. P. Baskova, D. U. Cherkesova and V. V. Mosolov(1983), *Thromb. Res.*, **30**, 459.
9. R. P. Harvey, E. Degryse, L. Stefani, F. Schamber, J.-P. Cazenave, M. Courtney, P. Tolstochev and J.-P. Lecocq(1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 1084.
10. E. Fortkamp, M. Rieger, G. Heisterberg-Moutsers, S. Schweitzer and R. Sommer (1986), *DNA*, **5**, 511.
11. W. E. Marki and R. B. Wallis(1990), *Thromb. Haemost.*, **64**, 344.
12. A. Tilman, N. J. Martine, F. Annie, M. Muriel and L. Yves(1992), *Gene*, **110**, 25.
13. M. Janes, B. Meyhack, W. Zimmermann and A. Hinnen(1990), *Curr. Genet.*, **18**, 97.
14. G. Gerd, A. J. Zbigniew, W. Ulrike, M. Karl, W. M. S. Alexander and P. H. Cornelis (1992), *Biotech. Adv.*, **10**, 179.

15. B. Luca, S. Emanuela, H. L. B. David and S. Paolo(1991), *Gene*, **101**, 255.
16. J. H. Sohn, S. K. Lee, E. S. Choi and S. K. Rhee(1991), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 266.
17. M. F. Chaplin(1986), *Carbohydrate Analysis : a Practical Approach*(M. F. Chaplin and J. F. Kennedy eds), Monosaccharides, p. 3, IRL Press, Oxford, Washington D. C.