(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0080141
(43) 공개일자 2015년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0167454
(22) 출원일자 2013년12월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
남형진
인천 남구 재넘이길 147-21, 201동 204호 (용현동, 문화네트빌)
김동일
인천 연수구 청능대로 124, 109동 403호 (동춘동, 금호동아아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

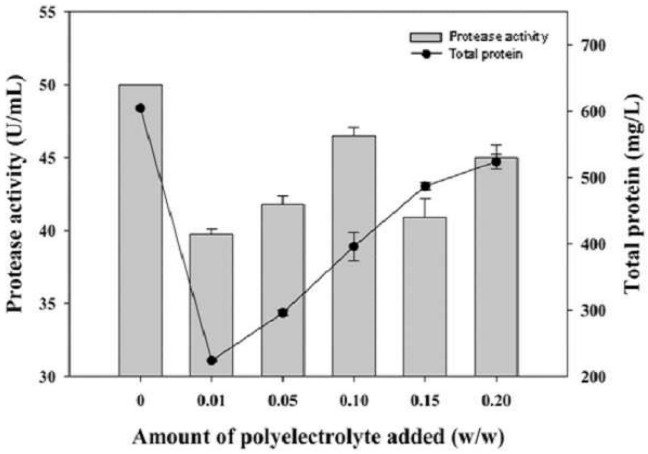
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 생산방법 및 단백질 생산용 배지 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 배양물의 산도를 조절하는 단계 및 고분자전해질을 첨가하여 침전을 형성하는 단계를 포함하는 단백질 생산방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 단백질 생산 방법 및 배지 조성물을 이용하는 경우, 생산 단백질과 함께 배지에 배출되는 단백질 분해효소에 의하여 목적 단백질의 생산효율이 감소하는 것을 방지함으로써, 단백질의 생산량을 증대시킬 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

권준영

인천 부평구 안남로 272, 107동 1702호 (청천동, 금호아파트)

최홍열

경기 성남시 중원구 산성대로452번길 8-1, (금광동)

성윤경

충북 청주시 상당구 중흥로 70, 306동 1501호 (용암동, 용암현대3차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	ITAH1302130110010001000200200
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	사단법인 한국바이오협회
연구사업명	바이오전문인력양성사업
연구과제명	바이오전문인력양성사업 의약바이오특성화대학원 운영
기 여 율	10/100
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2013.01.01 ~ 2013.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	NRF-2013M3A9B6075887
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	차세대응용오믹스사업
연구과제명	글리칸 변이 바이오의약품의 생산을 위한 글리칸 조절 및 제어 원천기술 개발
기 여 율	90/100
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2013.11.20 ~ 2018.11.19

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포 배양물의 산도(pH)를 목적단백질의 pI 값까지 조절하는 단계;

상기 세포 배양물에 고분자전해질을 첨가하여 고분자전해질-목적단백질 침전물을 형성하는 단계; 및

상기 침전물로부터 목적단백질을 회수하는 단계;를 포함하는 단백질 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포는 벼(*Oryza sativa*)세포, 형질 전환된 벼(*Oryza sativa*)세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것인, 단백질 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 형질 전환된 벼(*Oryza sativa*)세포는 RAmy3D 유도성 프로모터(RAmy3D inducible promoter)를 포함하는 것인, 단백질 생산방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 고분자전해질은 폴리비닐설폰산, 폴리비닐술포네이트, 폴리스티렌설폰산, 폴리아크릴산 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인, 단백질 생산방법.

청구항 5

폴리비닐설폰산 0.001 %(w/w) 내지 0.05 %(w/w)($g_{PVS}/g_{total\ protein}$)미만으로 포함하고, pH 3.0 내지 pH 7.0의 산도를 갖는, 단백질 생산용 배지 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단백질의 생산방법 및 단백질 생산용 배지 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 경제적인 대규모 단백질 생산 및 정제는 공학 산업에서 점점 중요한 문제가 되고 있다. 일반적으로, 단백질은 목적단백질의 유전자를 함유하는 재조합 플라스미드를 삽입시켜 목적 단백질을 생산하도록 조작된 포유동물 또는 박테리아 세포주를 사용하여 세포 배양에 의해 생산된다. 사용된 세포주는 살아있는 생물체이기 때문에, 이들에게 통상적으로 동물 혈청 제제로부터 공급되는 당, 아미노산 및 성장 인자를 함유하는 복합 성장 배지가 공급되어야 한다. 목적 단백질을 세포에 공급된 화합물의 혼합물 및 세포 자체의 부산물로부터 인간 치료제로서 사용 하기에 충분한 순도로 분리하는 것은 만만치 않은 일이다.

[0003] 또한, 당 고갈에 의해 목적단백질의 생산이 유도되는 경우, 당고갈에 의한 세포의 사멸도 함께 유발되고, 사멸된 세포로부터 배양액으로 용출된 프로테아제(protease)와 같은 단백질 분해 효소에 의해 목적단백질의 분해가 일어나, 목적단백질의 생산성을 떨어뜨리는 단점이 있다.

[0004] 이에 따라, 목적단백질의 분해를 방지하여 생산량을 증가시키기 위한 방법에 대한 연구가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 단백질의 생산량을 향상시킬 수 있는 방법 및 이를 위한 배지 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 세포 배양물의 산도(pH)를 목적단백질의 pI 값까지 조절하는 단계; 상기 세포 배양물에 고분자전해질을 첨가하여 고분자전해질-목적단백질 침전물을 형성하는 단계; 및 상기 침전물로부터 목적단백질을 회수하는 단계;를 포함하는 단백질 생산방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 폴리비닐설폰산 0.001 %(w/w) 내지 0.05 %(w/w)($g_{PVS}/g_{total\ protein}$)미만으로 포함하고, pH 3.0 내지 pH 7.0의 산도를 갖는, 단백질 생산용 배지 조성물을 제공한다.

[0008] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0009] 본 발명은 세포 배양물의 산도(pH)를 목적단백질의 pI 값까지 조절하는 단계; 상기 세포 배양물에 고분자전해질을 첨가하여 고분자전해질-목적단백질 침전물을 형성하는 단계; 및 상기 침전물로부터 목적단백질을 회수하는 단계;를 포함하는 단백질 생산방법을 제공한다.

[0010] 상기 목적단백질은 세포의 배양을 통해서 생산하고자 하는 단백질을 의미하는 것으로, 세포의 배양에 의하여 생합성 방법으로 생산할 수 있는 모든 단백질을 의미한다.

[0011] 본 발명에서 생산하고자 하는 단백질은 바람직하게는 hCTLA4Ig 단백질 일 수 있다. hCTLA4Ig 단백질은 인간 세포독성 T 림프구 항원 4-면역글로불린(human T-human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin)으로 자가면역 질환의 치료제로 사용되고 있으나, hCTLA4Ig 단백질을 생산하기 위해서 사용되는 프로모터는 당고갈 환경에서 유도되는바, 단백질의 생산과 함께 세포의 사멸이 발생하여 세포로부터 용출된 단백질 분해 효소에 의하여 hCTLA4Ig 단백질이 오히려 분해되어, 생산 효율이 현저히 나빠지는 문제가 있으나, 본 발명의 경우 단백질의 침전을 통해 분해 효소에 의한 목적 단백질의 분해를 방지하여 hCTLA4Ig 단백질의 생산성을 향상시키는 효과가 인정된다.

[0012] 상기 세포는 다세포의 진핵세포 또는 박테리아 및 효모를 비롯한 단세포의 원핵세포로부터 유도된 세포를 의미하고, 바람직하게는 식물세포를 의미하며, 가장 바람직하게는 벼(*Oryza sativa*)로부터 유래된 세포를 의미한다. 상기 세포는 유전학적 처리를 거치지 않은 세포 및 형질 전환과 같은 유전공학적 처리극 거친 세포도 모두 포함한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 벼(*Oryza sativa*)세포, 형질 전환된 벼(*Oryza sativa*)세포 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 일 수 있다.

[0014] 상기 형질 전환된 벼(*Oryza sativa*)세포는 RAmy3D 유도성 프로모터(RAmy3D inducible promoter)를 포함하는 어느 하나 일 수 있다.

[0015] 단백질마다 고유의 pI 값을 가지는 것인바, pI와 유사한 범위의 산도로 배양물을 조절하는 경우 침전이 발생하여, 배양 세포로부터 분리되는 단백질 분해 효소에 의하여 목적단백질이 분해되는 것을 방지할 수 있다.

[0016] 상기 고분자전해질은 하전된 단량체 단위로 구성된 수용성 중합체이다. 본 발명의 고분자전해질의 단량체 단위는 산도 (pH)에 따라 수용액에서 양성자 용해 (이온화)되는 전해질기 (하전된 관능기)를 갖는다. 고분자전해질의 하전된 관능기 예로는 설폰산, 포스폰산, 카르복실산 및 아민, 및 이들 각각의 이온: 술포네이트, 포스포네이트, 카르복실레이트 및 암모늄이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 용해는 용액의 이온 농도 및 전기 전도율에 영향을 미친다.

[0017] 본 발명의 방법에 유용한 고분자전해질의 분자량은 약 천 (1000) 달톤 (Da) 내지 약 백만 (1,000,000) 달톤일 수 있다. 본 발명의 고분자전해질은 넓은 범위의 쇄 길이, 즉 약 1200 달톤 (Da) 내지 약 백만 (1,000,000) 달톤의 분자량 범위를 갖는 특정 유형의 반복 단량체 단위의 혼합물로서 사용될 수 있다. 평균 분자량 및 분자량

분포 프로파일은 단량체 단위의 특정 중합 조건, 예를 들어 농도, 중합 개시제 또는 촉매, 온도, 또는 시간 하에서 조절될 수 있다. 고분자전해질의 평균 분자량 및 분자량 분포 프로파일은 또한 특정 예비 정제 방법 하에서 선택될 수 있다.

[0018] 음으로 하전된 음이온 고분자전해질 및 양으로 하전된 양이온 고분자전해질은 침전 반응에 사용될 수 있다. 용액의 pH가 목적 단백질의 pI 미만인 경우, 단백질은 양전하를 띤다. 이들 조건 하에서, 양이온 고분자전해질은 불순물을 침전시키고, 용액에 목적 단백질을 남길 수 있다. 역으로, 음이온 고분자전해질은 단백질을 침전시켜 목적 단백질-고분자전해질 침전물을 형성하고, 용액에 불순물을 남길 수 있다. 본 발명의 방법에서 고분자전해질의 선택시 다른 인자에는 관능기 안정성 및 반응성, 분자량, 전하 밀도 및 쇄 강성도가 포함된다.

[0019] 본 발명의 고분자전해질은 양이온 및 음이온 하전된 관능기 둘 다를 갖는 양쪽성고분자전해질(polyampholyte)을 포함한다.

[0020] 본 발명의 폴리음이온 고분자전해질 예에는 폴리아크릴산 (PAA), 폴리비닐술포네이트 (PVS), 폴리스티렌설폰산 (PSS, 폴리(4-비닐벤젠술포네이트 금속염)), 폴리메타크릴레이트 (PMA), 폴리아크릴아미도메틸프로판술포네이트 (PAMPS), 카르복시메틸셀룰로스 (CMC), 말레산 무수물-스티렌 공중합체 (MAS, 말레산 무수물-비닐메틸 에테르공중합체 (MAVE), 폴리아스파르테이트, 폴리글루타메이트, 덱스트란 술페이트, 펙틴, 알기네이트, 및 글리코사미노글리칸, 예를 들어 콘드로이틴 술페이트, 헤파린/헤파린 술페이트 및 히알루론산; 및 이들의 모든 염 및 공중합체가 포함된다.

[0021] 폴리아크릴산(PAA) 및 폴리비닐설폰산(PVS), 및 이들의 음이온, 폴리아크릴레이트 및 폴리비닐술포네이트 각각은 본 발명의 방법을 유용한 고분자전해질이다. PAA는 PVS와 유사한 구조적 성질을 갖는다. 둘 다 중합체이며, 선형 탄소 골격을 갖는다. 두 고분자전해질은 관능기가 상이하다. PVS는 설폰산 관능기를 가지며 pKa가대략 1이다.

[0022] 세포 배양물에 고분자전해질을 첨가하는 경우 0.001 %(w/w) 내지 0.20 %(w/w)($g_{PVS}/g_{총\ 단백질(total\ protein)}$)의 농도로 첨가할 수 있고, 바람직하게는 0.005 %(w/w) 내지 0.15 %(w/w)의 농도로 첨가할 수 있다. 상기 범위로 고분자전해질을 첨가하는 경우 침전을 통해서 목적 단백질의 분해를 효율적으로 방지할 수 있다. 상기 총 단백질은 상기 세포의 배양물에 포함된 모든 단백질을 의미한다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에서는 가장 바람직하게 폴리비닐설폰산을 이용하여 단백질의 침전을 유도하여, 단백질 분해효소에 의한 생산량이 감소되는 것을 방지하였다.

[0024] 상기 목적단백질을 회수하는 단계는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 여과, 분리 및 정제 방법을 사용할 수 있고, 상기 방법에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 본 발명은 폴리비닐설폰산 0.001 %(w/w) 내지 0.05 %(w/w)($g_{PVS}/g_{total\ protein}$)미만으로 포함하고, pH 3.0 내지 pH 7.0의 산도를 갖는 단백질 생산용 배지 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 범위를 만족하는 조성물의 배지를 이용하여 세포를 배양하는 경우, 세로포부터 생산된 단백질이 폴리비닐설폰산과 침전함으로써 세포로부터 용출 또는 배춘되는 단백질 분해효소에 의하여 생산된 단백질이 분해되어, 본 발명의 단백질 생산량이 감소하는 것을 방지하여, 단백질 생산 효율을 증가시킬 수 있다.

[0027] 상기 단백질은 바람직하게는 hCTLA4Ig 단백질 일 수 있다. hCTLA4Ig 단백질은 인간 세포독성 T 림프구 항원 4-면역글로불린(human T-human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-immunoglobulin)으로 자가면역 질환의 치료제로 사용되고 있으나, hCTLA4Ig 단백질을 생산하기 위해서 사용되는 프로모터는 당고갈 환경에서 유도되는바, 단백질의 생산과 함께 세포의 사멸이 발생하여 세포로부터 용출된 단백질 분해 효소에 의하여 hCTLA4Ig 단백질이 오히려 분해되어, 생산 효율이 현저히 나빠지는 문제가 있으나, 본 발명의 경우 단백질을 침전시킬 수 있는 배지 조성물을 이용하여, 세포로부터 용출된 분해 효소에 의한 목적 단백질의 분해를 방지하여 hCTLA4Ig 단백질의 생산성을 향상시키는 효과가 인정된다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 단백질 생산 방법 및 배지 조성물을 이용하는 경우, 생산 단백질과 함께 배지에 배출되는 단백질 분해효소에 의하여 목적 단백질의 생산효율이 감소하는 것을 방지함으로써, 단백질의 생산량을 증대시킬 수

있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예따라, 고분자전해질로 사용한 폴리비닐설폰산의 화학구조식을 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예따라, 단백질의 침전 실험을 나타내는 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라, pH 3.0의 산도에서, 고분자전해질의 농도에 따른 프로테아제의 활성(막대 그래프) 및 총 단백질 생산량(꺾은선 그래프)을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 고분자전해질의 %농도(w/w)를 나타내고, 좌측 세로축은 프로테아제의 활성(U/ml), 우측 세로축은 총 단백질 생산량(mg/L)을 의미한다.

도 4은 본 발명의 일 실시예에 따라, pH 4.0의 산도에서, 고분자전해질의 농도에 따른 프로테아제의 활성(막대 그래프) 및 총 단백질 생산량(꺾은선 그래프)을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 고분자전해질의 %농도(w/w)를 나타내고, 좌측 세로축은 프로테아제의 활성(U/ml), 우측 세로축은 총 단백질 생산량(mg/L)을 의미한다.

도 5은 본 발명의 일 실시예에 따라, pH 5.0의 산도에서, 고분자전해질의 농도에 따른 프로테아제의 활성(막대 그래프) 및 총 단백질 생산량(꺾은선 그래프)을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 고분자전해질의 %농도(w/w)를 나타내고, 좌측 세로축은 프로테아제의 활성(U/ml), 우측 세로축은 총 단백질 생산량(mg/L)을 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라, pH 6.0의 산도에서, 고분자전해질의 농도에 따른 프로테아제의 활성(막대 그래프) 및 총 단백질 생산량(꺾은선 그래프)을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 고분자전해질의 %농도(w/w)를 나타내고, 좌측 세로축은 프로테아제의 활성(U/ml), 우측 세로축은 총 단백질 생산량(mg/L)을 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라, pH 7.0의 산도에서, 고분자전해질의 농도에 따른 프로테아제의 활성(막대 그래프) 및 총 단백질 생산량(꺾은선 그래프)을 나타내는 그래프이다. 그래프의 가로축은 고분자전해질의 %농도(w/w)를 나타내고, 좌측 세로축은 프로테아제의 활성(U/ml), 우측 세로축은 총 단백질 생산량(mg/L)을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[0031] **[준비예] 세포주 준비 및 이의 배양**

[0032] 1. 세포주 형질전환 및 배양조건

[0033] 단백질을 생산하는 세포주로는 벼(Oryza sativa L. Dongjin)를 형질전환하여 실험에 이용하였다. 벼의 알파-아밀라아제(α-amylase) 유전자군(gene family)이며, 탄소원인 sucrose가 고갈된 상태에서만 목적 단백질인 hCTLA4Ig를 생산할 수 있도록, RAmy3D 유도성 프로모터(RAmy3D inducible promoter)를 포함하도록 형질전환 시켰고, 이를 현탁하여 단백질 생산 실험을 실시하였다.

[0034] 생산배지로는 수크로오스(sucrose)를 제외한 amino acid (AA) 기본배지를 사용하였으며, 생장조절제인 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2.0 mg/L와 kinetin 0.02 mg/L를 사용하였다. 여기에 아미노산 혼합용액(1.0 mM 글리신(glycine), 6.0 mM 글루타민(glutamine), 2.0 mM 아스파르트산(aspartic acid), 1.3 mM 아르기닌(arginine))을 농축하여 지베렐린(gibberellin, GA3) 0.1 mg/L를 첨가하여 0.22 ㎛의 막여과기(membrane filter)로 여과 및 멸균하였다. 멸균된 100 mL 삼각플라스크(Erlenmeyer flask)에 여과된 배지혼합용액을 30 mL씩 분주하고, 플라스크 당 3 g의 세포 생체량(Fresh cell weight, FCW)으로 접종하였고, 교반배양기(shaking incubator)에서 28 ℃, 120 rpm, 암조건으로 배양하였다.

[0035] 2. 배양물의 회수

[0036] 배양물의 회수는 2일 간격으로 여과멸균하는 방법으로 실시하였다. 100 mL 삼각플라스크에서 배양한 배양물에서 흡인여과기(Buchner funnel)에 여과지(Whatman No.1)를 사용하여 현탁세포와 배양액을 분리하고, 분리해낸 배양액는 0.22 ㎛ 필터(filter)를 이용한 여과멸균을 하고, 50 mL 팔콘튜브(falcon tube)에 넣어 냉동보관하고, 실험에 사용하였다.

[0037] **[시험예 1] 실험 방법 및 단백질 생산 확인**

[0038] 1. pH에 따른 단백질 침전 조건 확인

[0039] 배양 8일차에 회수한 생산배양액을 5 가지 pH군(pH 3, 4, 5, 6, 7)으로 설정하여 eppendorf tube에 1 mL씩 분주하고, PVS를 각각 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 %(w/w) (PVS 함량(g)/총 단백질(total protein)의 함량(g))로 첨가하였다. 침전 과정은 4 ℃에서 하룻밤 동안(overnight) 진행하였다.

[0040] 2. 세포량 측정

[0041] 세포의 증식을 확인하기 위해서 세포생체량(Fresh cell weight, FCW)과 세포건체량(Dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 100 mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현택세포를 Buchner funnel과 Whatman No.1 여과지를 이용하여 세포와 배양액을 분리하였다. 분리된 세포는 배지와 동량의 증류수로 세척한 후, 진공펌프로 수분을 제거하고, 미리 무게가 측정된 weighting dish에 세포를 옮겨 담아 FCW를 측정하였다. FCW 측정 후, 60 ℃ drying oven에서 48시간 동안 무게의 변화가 없을 때까지 건조시켜 DCW를 측정하였다.

[0042] 3. 세포 생존도 측정

[0043] 세포의 생존도는 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 환원법으로 상대적인 값을 측정하였다. 세포생체량(FCW) 0.1 g 세포를 에펜도르프 튜브(eppendorf tube)에 담아 1.5 % TTC 용액 1.6 mL을 첨가하여 20 ℃에서 24시간 동안 암반응시켰다. 그 후, TTC 용액은 제거하고 세포 내에 생성된 레드 포르마잔(red formazan)을 추출하기 위해 95 % 에탄올(ethanol) 1 mL을 첨가하여 60 ℃에서 30분 동안 반응시켰다. 4 ℃, 15,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 후, 상등액 0.6 mL을 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 485 nm에서 O.D.값을 측정하였다. 블랭크(Blank)로는 95 % 에탄올을 사용하였다.

[0044] 4. 프로테아제 활성 측정

[0045] 프로테아제가 배양배지 내에서 미치는 영향을 알아보기 위해서 변형된 Anson뮐 method를 이용하여 프로테아제 활성(protease activity)을 측정하였다. 카제인 나트륨염(Na-caseinate, 67 mM 인산 완충액, pH 7.0) 1 % 용액 0.5 mL와 각 시료의 용액 0.5 mL을 섞어서 50 ℃에서 20분간 반응시켰다. 그 후 30 % TCA (trichloroacetic acid) 용액 0.3 mL을 첨가하여 50 ℃에서 30분간 정치시킨 후 반응을 종료하였다. 10분간 15,000 rpm에서 원심분리하여 상등액 0.8 mL을 분광광도계를 이용하여 280 nm에서 O.D.값을 측정하였다. 표준물질로는 티로신(tyrosine) 용액을 0~4 mg/mL 농도로 달리하여 사용하였고, 블랭크(blank)는 증류수로 하였다. 단위 1 U(unit)는 같은 조건에서 분당 티로신(tyrosine) 1 mg이 생산되는 효소의 양으로 정의하였다.

[0046] 5. 총 단백질 정량

[0047] 배양액 내 목적단백질을 포함하는 총 단백질의 양은 Pierce사의 BCA™ assay kit를 사용하여 측정하였다. 표준물질로는 2.0 mg/mL bovine serum albumin을 사용하였다. Microplate reader(VersaMax)의 590 nm에서 O.D.값을 측정하여 표준 농도식을 구한 뒤, 정량분석 하였다.

[0048] 6. 결과

[0049] 상기 PVS 농도에 따른 단백질 생산량 및 프로테아제 활성은 각 pH 3.0부터 pH 7.0까지 1.0 단위로 순서대로 도 3 내지 도 7에 나타내었다.

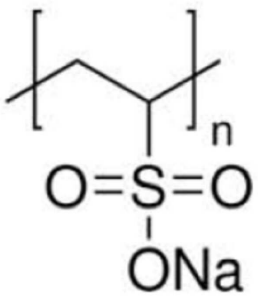
[0050] 도 3 내지 7에 나타낸 바와 같이, pH 3.0(도 3)과 pH 4.0(도 4)에서 프로테아제 활성이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었으며, pH가 3.0, 4.0, 5.0에선 PVS 농도가 0.01, 0.15 %(w/w) 일 때, 그리고 pH가 6.0, 7.0에선 0.01, 0.1 %(w/w) 일 때 영향이 큰 것을 확인하였다.

[0051] 총 단백질 양을 확인해 보았을 때 pH3과 pH4에서 PVS 농도가 0.01 %(w/w) 가장 낮게 나왔으며, 농도가 높아질수록 침전이 적게 된 것을 확인 할 수 있었다. 그 밖의 pH에서는 큰 영향이 없는 것을 확인 할 수 있었다.

[0052] 모든 결과를 비교해 보았을 때 pH가 3일 때 가장 차이가 분명하였으며, PVS 농도가 0.01 %(w/w)일 때 가장 낮은 protease 활성과 총 단백질 양을 확인 할 수 있었다. pH 4에서도 0.01 %(w/w)에서 가장 낮은 것을 확인 할 수 있었다.

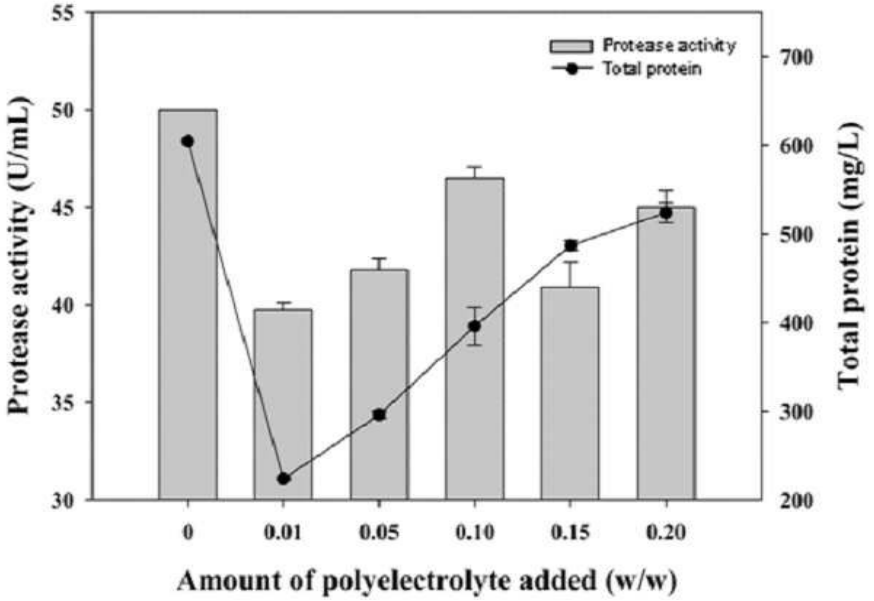
도면

도면1

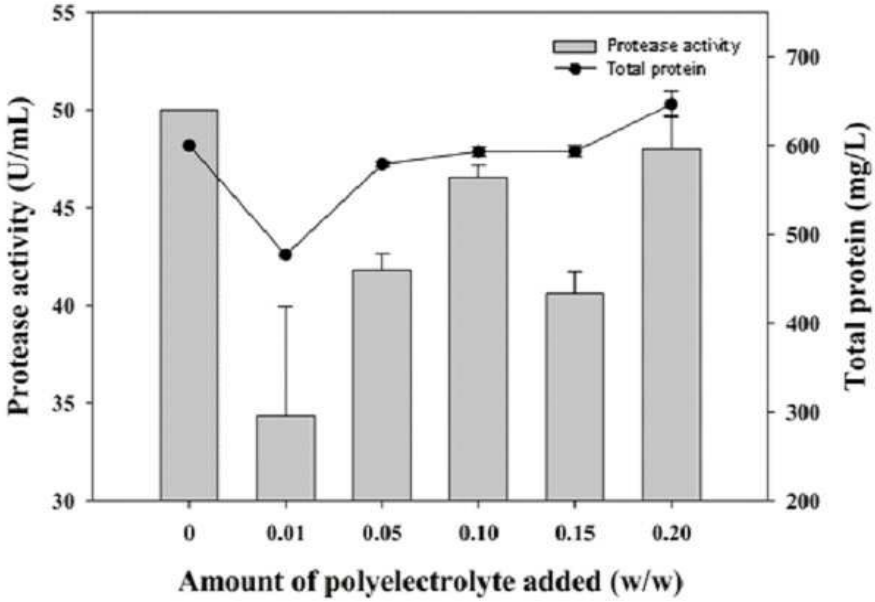


도면2

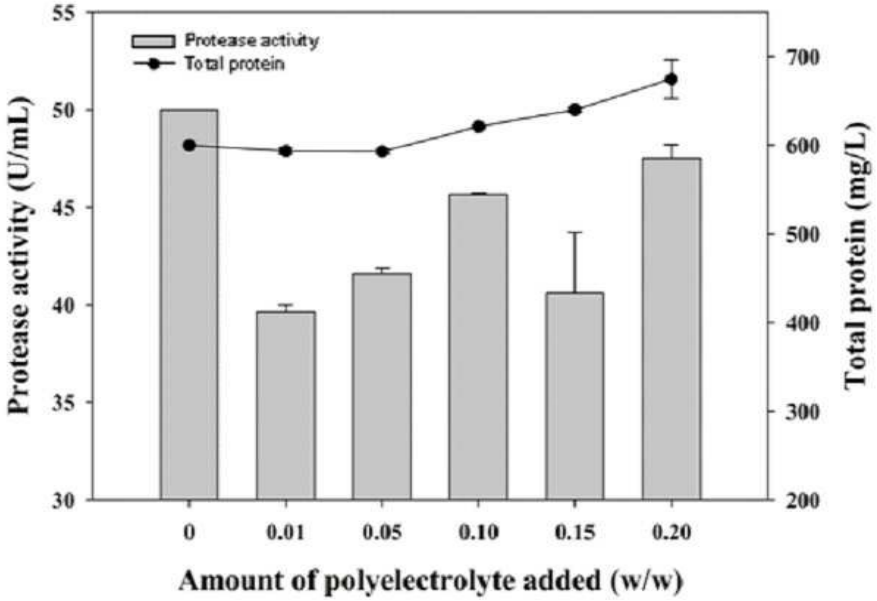
도면3


Protease activity
Total protein
Protease activity (U/mL)
Total protein (mg/L)
55
50
45
40
35
30
700
600
500
400
300
200
0
0.01
0.05
0.10
0.15
0.20
Amount of polyelectrolyte added (w/w)

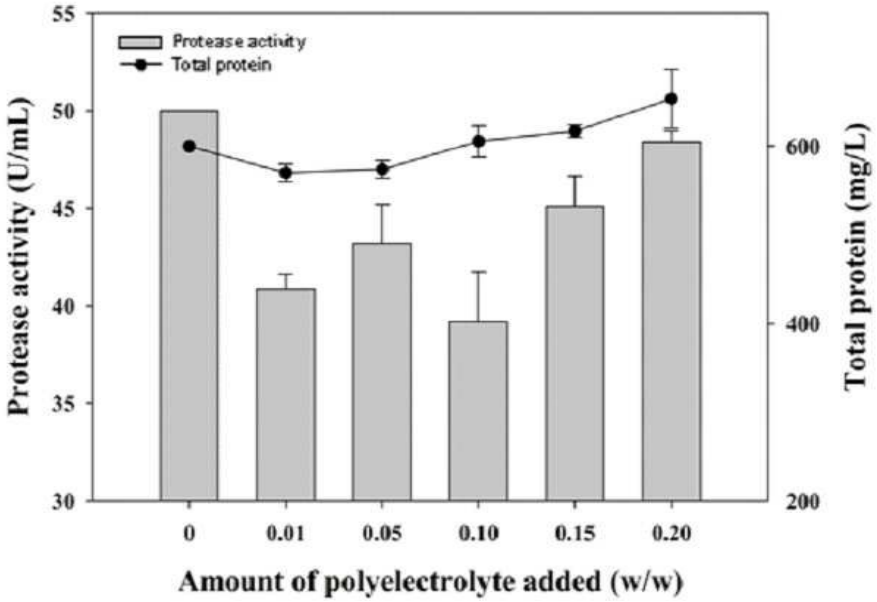
도면4


Protease activity
Total protein
Protease activity (U/mL)
Total protein (mg/L)
55
50
45
40
35
30
700
600
500
400
300
200
0
0.01
0.05
0.10
0.15
0.20
Amount of polyelectrolyte added (w/w)

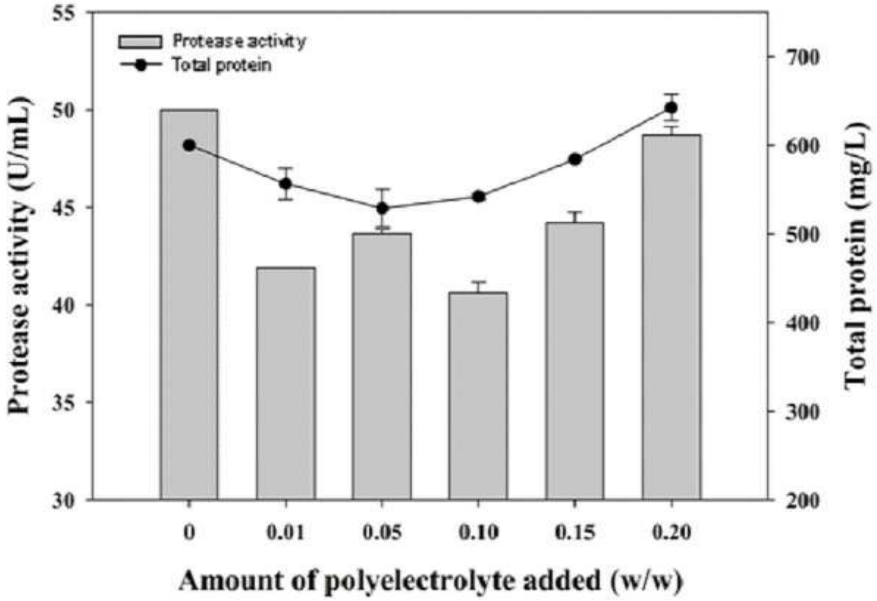
도면5


Protease activity
Total protein
Protease activity (U/mL)
Total protein (mg/L)
55
50
45
40
35
30
700
600
500
400
300
200
0
0.01
0.05
0.10
0.15
0.20
Amount of polyelectrolyte added (w/w)

도면6


Protease activity
Total protein
Protease activity (U/mL)
Total protein (mg/L)
55
50
45
40
35
30
600
400
200
0
0.01
0.05
0.10
0.15
0.20
Amount of polyelectrolyte added (w/w)

도면7


Protease activity
Total protein
Protease activity (U/mL)
Total protein (mg/L)
55
50
45
40
35
30
700
600
500
400
300
200
0
0.01
0.05
0.10
0.15
0.20
Amount of polyelectrolyte added (w/w)