

고정화 효소(아르기나아제)

Immobilized Arginase

에일효모(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 유래한 아르기나아제 유전자(EC3.5.3.1)를 합성용으로 선별하고 상업적으로 이용 가능한 *Escherichia coli* BL2(DE3) 유전자 조작 균주에서 발현시켜 얻은 효소제이다.

제법

고정화 효소 아르기나아제는 유전자 조작 박테리아의 다단계 발효를 통해 생산된다. 박테리아체를 수집하고, 세포 파쇄공정을 거쳐 표적 효소를 추출한다. 여과 및 다단계 정제 후, 효소는 견고한 폴리머 담체에 고정된다. 멸균, 진공추출, 세척과정을 거쳐 최종 제품이 완성된다.

성상

이 약은 흰색 또는 옅은 황색의 구형 과립이다.

효소활성

아르기닌은 고정화 효소 아르기나아제의 작용에 의해 오르니틴과 요소로 전환되며, 고정화 효소 아르기나아제의 활성은 생성된 오르니틴의 양에 따라 계산된다.

1) 시액조제

(1) 버퍼용액

트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 12.114g을 달아 물 950mL를 넣어 녹이고 6mol/L 염산용액으로 pH를 9.50으로 맞춘 후 물을 넣어 1000mL로 한다.

(2) 아르기닌 용액

L-아르기닌 10g을 달아 버퍼용액 85mL를 가하여 녹이고 37°C로 예열한 후 6mol/L 염산용액으로 pH를 9.50으로 맞춘 후 버퍼용액을 넣어 100mL로 한다. 나중에 사용할 수 있도록 37°C로 예열한다.

(3) 망간 용액

염화망간 0.3958g을 달아 물에 녹여 100mL로 한다.

(4) 붕산 버퍼용액

붕산 24.73g을 달아 물 950mL를 넣어 녹이고 1mol/L 수산화나트륨용액으로 pH를 9.5로 맞춘 후 물을 넣어 1000mL로 한다.



(5) 프리컬럼 유도제

o-프탈알데히드 0.3430g과 N-아세틸-L-시스테인 0.1472g을 정확히 달아 25mL 용량플라스크에 넣은 다음 무수 에탄올 5mL를 추가하고 봉산 버퍼용액을 넣어 25mL로 하고 나중에 사용하기 위해 빛을 차단한다.

(6) 이동상

아세트산나트륨(3수화물) 4.08g을 달아 물 600mL를 넣어 녹인 후 메탄올 400mL를 넣는다.

2) 전환반응(검액)

아르기닌 용액 20mL, 망간 용액 2mL 및 이 약 0.2g을 37°C 항온 수조 컵에 넣어 저어주고 37°C 항온에서 10분간 반응시킨 후 여과하고 맑은 용액을 10배로 희석한다. 이 액 0.5mL를 50mL 용량플라스크에 넣고 봉산 버퍼용액과 프리컬럼 유도제 2mL를 차례로 넣어 빠르게 흔들어 섞은 다음, 1분 후 봉산 버퍼용액을 넣어 표선까지 부피를 맞추고 잘 흔든 다음 여과액으로 HPLC 분석을 하여 오르니틴의 피크 면적을 기록한다.

3) 표준액

오르니틴 표준품 20~25mg을 정밀히 달아 물에 녹여 10mL로 하고 0.5mL를 50mL 용량플라스크에 옮겨 봉산 버퍼용액과 프리컬럼 유도제 2mL를 차례로 넣고 재빨리 흔들어 섞은 다음, 1분 후 봉산 버퍼용액을 넣어 표선까지 부피를 맞추고 잘 흔든 다음 여과액으로 HPLC 분석을 한다.

4) HPLC 분석

컬럼: CenturySILC8-BDS, 5μm, 4.6×250mm

유속: 1.00mL/분

측정: UV 338nm

5) 계산식

$$\text{Activity (37 } ^\circ\text{C, wet product)} = \frac{A_{\text{Sample}} \times W_{\text{Standard}} \times P_{\text{Standard}} \times 0.5 \times 22 \times 1000 \times 1000}{A_{\text{Standard}} \times M_{\text{Ornithine}} \times W_{\text{Sample}} \times 10 \times 50 \times 10} \text{ (U/g)}$$

A_{Sample} - 검액에서의 오르니틴 면적

W_{Standard} - 오르니틴 표준품의 취한 양, g

P_{Standard} - 오르니틴 표준품의 함량, %

A_{Standard} - 표준액에서의 오르니틴 면적

$M_{\text{Ornithine}}$ - 오르니틴의 분자량

W_{Standard} - 검체의 취한 양, g



검액중 L-오르니틴의 함량을 산출하며 효소활성은 2500U/g 이상이어야 한다.

건조감량 60~70% (1g, 130℃, 3시간)

