

항체가 건조상태로 고정화된 면역진단키트의 안정화와 Shelf-Life 결정

이 창우·조정환·¹육순학·¹권오협·²박영남·[†]백세환
고려대학교 생명공학원, ¹두산인재기술개발원 과제개발분야, ²영동제약 연구개발센터
(접수 : 1998. 4. 24., 게재승인 : 1998. 6. 12.)

Stabilization of Dry Immuno-Diagnostic Kit with Immobilized Antibody and Determination of Its Shelf-Life

Chang-Woo Lee, Joung-Hwan Cho, Soon-Hack Yook¹, Oh-Hyep Kwon¹, Yeong-Nam Park², and Se-Hwan Pack[†]
Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
¹Products Development Group, Doosan Training & Technology Center, Yongin, Kyonggi 449-840, Korea
²R&D Center, Yeongdong Pharmaceutical Corp., Yongin, Kyonggi 449-830, Korea
(Received : 1998. 4. 24., Accepted : 1998. 6. 12.)

Stabilization of antibody, which is specific to *Salmonella typhimurium* antigens, present in dry states on membranes was accomplished, and its shelf-life, i.e., duration for maintaining minimum 90% of the initial activity, under optimal conditions was determined. To prepare two major components of an immuno-strip, the antibody was not only immobilized on nitrocellulose membrane surfaces but also placed within the pores of glass fiber membrane after conjugating it with gold colloids as signal generator. Among potential stabilizers of the immuno-components, a disaccharide, trehalose, showed a significant protection effect of immunoglobulin structure from thermal energy. Optimal concentrations of trehalose for the respective component were significantly different (8-fold higher for the antibody-gold conjugate than for the immobilized antibody), which probably resulted from distinct densities and configurations of antibody present on the membranes. An additional requirement for the gold conjugate was freeze-drying of this substance such that the conjugate can be readily resolubilized upon contact with aqueous medium. By using the components prepared under optimal conditions, immuno-strips were constructed and exposed to thermal energy. Signals with less than 10% decrease in the intensity were maintained for approximately 21 days at 60 °C. Compared to previous reports, this result represented a 2-year shelf-life at room temperature. It was, however, two times longer if determined from thermal acceleration tests based on the theory of inactivation rate of protein. Such discrepancy between the two estimates could be mainly attributed to errors in accurately controlling temperatures and also to changes in the physical properties of membranes due to a high thermal energy

Key Words : immobilized antibody, thermo-stability, shelf-life, trehalose, immuno-diagnostic kit

서 론

구조가 비교적 간단한 물질 (이온 등)의 분석은 화학적 방법 혹은 이온결합과 소수성 상호작용 등을 이용한 HPLC에 의해 수행이 용이한 반면에, 구조가 복잡한 생물학적 고분자 유기물질의 측정에는 그와 특이하게 반응하는 성분의 도입에 의해 단지 수행될 수 있다. 특히, 1959년 Yalow와 Berson(1)에 의해 제시된 특정 부착단백질인 항체와 항원 (즉, 분석물질) 간의 반응을 이용한 면역학적 분석방법은 높은 특이성과 민감도를 제공할 뿐만 아니라 한 분석물질에 대해 개발된 측정원리가 다른 성분에도 적용될

수 있는 일반성을 지닌다. 더욱이 1975년 Kohler와 Milstein(2)에 의해 단일클론항체 생산방법이 개발되어 항체의 무제한 생산이 가능하게 됨으로써 면역분석법은 단백질, 호르몬, 그리고 세포 등의 정성 및 정량 측정에 널리 이용될 수 있는 전기가 마련되었다(3)

의료, 식품, 환경 등 면역분석 응용분야의 확산에 따라 임상실험실 등 특정 장소에서만뿐만 아니라 가정에서까지 사용 가능한 키트형태의 제품 수요가 증가추세에 있으므로(4) 실온 등 편리한 조건에서 보관할 수 있으며 또한 사용기간이 연장된 제품의 개발이 요구된다. 따라서 유통과 보관시 일정한 품질이 유지될 수 있도록 분석키트의 안정화는 제조 시 반드시 고려되어야 할 필수인자이다. 면역분석의 기본원리인 항원-항체 반응은 항원분자 상의 특정구조 (epitope)와 그에 대해 항체분자 상에 특이하게 형성된 항원부착자리 간의 결합에 의해 이루어진다. 항체는 효소와 같이 미세 환경변화에 대해 매우 민감한 기능성 단백질로

[†] Corresponding Author : Department of Biotechnology, Korea University, Chochiwon, Choongnam 339-800, Korea
Tel : 0415-60-1414, Fax : 0415-864-2665
e-mail : shpaek@uger.korea.ac.kr

새 측정키트의 보관 및 유통과정에서 발생할 수 있는 단백질 구조의 변화는 그 기능성의 저하 혹은 상실을 초래할 수 있다. 그러므로 제품 상업화 시 항체와 같이 민감한 단백질의 액체상 혹은 고체상에서의 기능성 보존은 반드시 성취되어야 할 주요과제이며, 현재 고체상태의 면역진단제품의 경우 실온에서 2년 정도의 유통 기간이 일반적으로 보증되고 있다(5).

기능성 단백질을 액체상에서 보관할 경우 그 구조적 안정성은 일반적으로 비반응성 단백질 (bovine serum albumin 등) 혹은 그 대체물질 (아미노산, polyvinyl alcohol, glycerol 등)을 첨가함으로써 일정기간 동안 유지될 수 있다(6-8). 이와 같이 총 단백질 농도를 증가시키는 방법은 용액 내에 함유될 수 있는 free radicals, proteolytic activity, 그리고 heavy metal 등 비특이적으로 단백질에 작용하는 구조변화 유발인자에 의한 저해효과를 최소화시킨다. 그러나 액체상 시약은 미생물에 의한 오염위험이 높고 또한 면역진단제품의 부피를 증가시키므로 사용자의 간편성을 향상시키기 위해 건조된 시약제품의 상업화가 선호된다. 건조제품은 액체상 시약의 단점을 보완하지만, 건조 시 기능성 단백질의 구조적 안정을 위해 필수적인 아미노산과 물분자 간 수소결합이 불완전해지고 따라서 열에너지에 의한 단백질 구조변화가 쉽게 초래된다(9). 이와 같은 구조변화에 의한 단백질의 불활성화는 안정제의 첨가에 의해 최소화될 수 있으며 당류, 동물 혈청, 친수성 폴리머 등 다양한 물질들이 보고되고 있다(9-11).

단백질 안정제의 종류와 농도 등 최적조건은 분석키트에 사용된 기능성 단백질의 종류 및 그 상태에 따라 변화되고 또한 다른 분석성능에 대한 영향을 고려하여 결정되어야 한다. 본 연구에서는 식품을 오염시키는 식중독균의 하나인 *Salmonella* 균 검출을 위해 제조된 면역분석키트(12)의 두 주요 구성성분 즉, membrane 상에 고정화된 항체 그리고 건조상태로 축적된 항체-신호발생물질 중합체의 기능성에 대한 안정화를 수행하였고 또한 그 조건하에서 제조된 키트의 shelf-life (조기활성의 90% 유지기간)를 결정하였다

재료 및 방법

재료

열처리된 *Salmonella typhimurium* 표준시료와 그에 특이한 복합클론 염소항체 그리고 항 염소 복합클론 토끼항체가 Kirkegaard & Perry Laboratories사 (미국)로 부터 구입되었다. Gold chloride (HAuCl_4), casein (sodium salt 형태, 우유로부터 추출), trehalose, sucrose, glycine, 그리고 lysine은 Sigma사 (미국)로 부터 공급되었다. Nitrocellulose (NC) membrane (세공크기 $5 \mu\text{m}$)과 glass fiber membrane (G6 grade) 그리고 cellulose membrane (qualitative grade #1 및 3MM chromatography grade)은 Millipore사 (미국)와 Fisher Scientific사 (미국) 그리고 Whatman사 (미국)로부터 각각 구입되었다. 그 외 다른 모든 시약들은 분석용급으로 사용되었다.

항체-colloidal gold 중합체 합성

면역분석시스템의 신호발생원을 제조하고자 colloidal gold를 합성하였고 이 물질을 다시 *Salmonella* 특정항체와 중합시켰다. Gold chloride 용액 (2% HAuCl_4) 0.5 mL를 탈이온수 100 mL과 혼합한 후 가열하였고 100 °C에서 1% sodium citrate 용액 1.75

mL를 첨가함으로써 colloidal gold를 합성하였다.(13,14) 합성된 colloidal gold를 항체와 중합시키기 위해, pH 9.0으로 조절된 8 mL gold 용액에 10 mM phosphate 완충용액 (pH 7.4)으로 투석시킨 0.8 mL 항체용액 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 최종 pH 9.0으로 조절)을 가하여 혼합한 후 실온에서 30분 간 반응시켰다. 5% casein이 포함된 100 mM tris 용액 (pH 7.6; Casein-Tris) 0.98 mL을 추가한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 100,000 g에서 45분 간 초원심분리를 수행한 후 상등액을 제거하였고 Casein-Tris로 중합체의 최종부피를 0.2 mL로 조절하였다. 이와 같이 제조된 중합체는 사용할 때까지 4 °C에서 보관되었다.

안정제의 선택

건조상태의 항체에 대한 최적 안정제를 선택하기 위해, 그 후보물질로써 혈청 (인간, 토끼)과 아미노산 (glycine, lysine) 그리고 당 (trehalose, sucrose)의 안정화 효과를 시험하였다. NC membrane strip (0.5×2 cm)의 아래쪽 끝으로부터 0.8 cm 지역에 *Salmonella* 특정항체 (2.5 mg/mL) 그리고 1.2 cm 지역에 항염소 토끼항체 (0.5 mg/mL)를 각각 직선형태로 고정화한 후 Casein-Tris 내에 담가 잔여표면을 처리하였고(12), 처리된 membrane을 각 안정제가 포함된 100 mM Tris 완충용액으로 직진 후 실온에서 1시간 동안 건조하였다. 준비된 membrane들을 습기가 제거된 60 °C 항온실에 넣고 3일 간 열처리를 수행하였다. 이와 같이 처리된 항체의 활성을 시험하기 위해, 준비된 NC membrane을 Figure 1에서와 같이 탐지항체-gold 중합체 4 μL 가 축적된 glass fiber membrane (0.5×2 cm) 그리고 3MM cellulose membrane (0.5×3 cm)과 부분적으로 접하도록 접촉시켜 측정시스템을 구성하였고(12), 그 시스템의 하부로부터 0.1% Casein-Tris 용액으로 희석된 *Salmonella* 표준시료 (1×10^7 cells/mL)를 흡수시켰다. 수용액은 15분 이내에 상단 끝에 도달하였고 *Salmonella* 특정항체가 고정화된 지역에서 발색된 신호는 image analyzer에 의해 정량 되었다. 발색된 strip을 scanner를 사용하여 membrane image로 포착하였고, 포착된 image 상의 발색부분은 image 분석 프로그램 (2D Archive programs, Advanced American Biotechnology, 미국)을 이용하여 신호세기 에 비례하는 optical density로 전환하였다

포획항체의 안정화

NC membrane 상에 고정화된 포획항체의 안정성에 대한 trehalose의 최적농도를 결정하기 위해, 그 물질을 100 mM Tris 완충용액으로 0.3-3% 범위로 희석하였고 위에서 언급된 바와 같이 항체가 고정화된 NC membrane에 가한 후 실온에서 건조하였다. 이와 같이 준비된 membrane을 60 °C 항온실에서 7일간 열처리하였고, 위에서 동일한 과정에 따라 분석시스템을 구성하였다. 그 시스템의 하단으로부터 *Salmonella* 표준시료를 흡수시킨 후 발색된 신호는 위에서 설명된 바와 같이 정량 되었다

탐지항체-gold 중합체의 안정화

Glass membrane 상에 건조상태로 축적된 항체-gold 중합체의 재용해성과 안정성을 향상시키고자 동결건조와 안정제의 효과를 시험하였다. 먼저 안정제인 trehalose (3%)의 존재 혹은 부재 하에서 항체-gold 중합체를 glass fiber membrane에 축적시킨 후 액화질소를 이용하여 급속히 동결시켰고 동결건조기 내에서 건

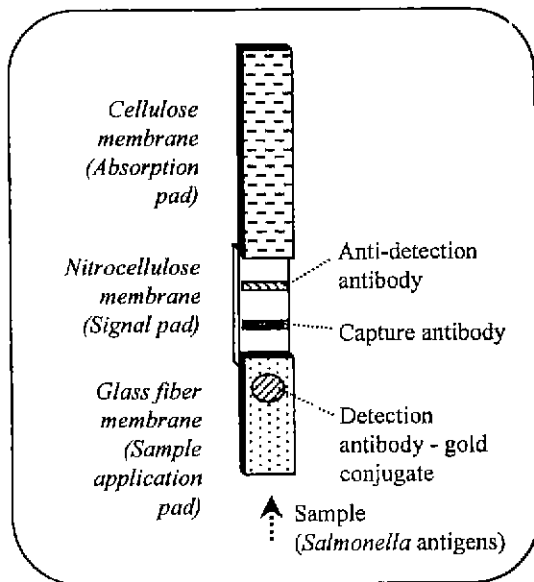


Figure 1 Membrane strip assay system for *Salmonella typhimurium* antigens based on immuno-chromatographic method. The system consisted of the three major components. 1) glass fiber membrane with freeze-dried detection antibody-gold conjugate, 2) nitrocellulose membrane with capture antibody and anti-detection antibody that were immobilized in spatially separated areas, and 3) cellulose membrane used for absorption.

조를 수행하였다. 건조된 glass membrane을 60°C에서 3일간 열처리한 후 포획항체가 고정화된 NC membrane 그리고 흡수대와 접합시킴으로써 측정시스템을 제조하였고 (Figure 1 참조), *Salmonella* 표준시료 (1×10^7 cells/mL)를 이용하여 분석을 수행하였다. 그 효과를 비교하기 위해, 동결건조를 수행하지 않고 열처리된 혹은 열처리되지 않은 중합체가 축적된 membrane으로 위에서와 동일한 과정을 반복하였다.

항체-gold 중합체 안정성에 대한 안정제의 최적농도를 결정하기 위해 다양한 농도의 trehalose의 존재 하에서 중합체를 glass fiber membrane에 축적하였고 위에서와 같이 동결건조하였다. 준비된 membrane은 60°C에서 3일간 열처리된 후 측정시스템의 제조에 사용되었고 *Salmonella* 표준시료에 대한 분석이 수행되었다. 또한, 열처리 및 동결건조를 하지 않은 중합체를 이용하여 동일한 과정을 반복하였고 그 결과를 비교하였다.

분석시스템의 열 안정성 시험

각 구성성분의 성능에 대한 최적조건 하에서 분석시스템을 제조하였고 고온에서 그 안정성을 시험하였다. 먼저, 포획항체가 고정화된 NC membrane을 100 mM Tris 완충용액으로 희석된 3% trehalose 용액에 적신 후 상온에서 건조하였다. 항체-gold 중합체의 경우 48% trehalose 용액과 1:1로 혼합한 후 glass membrane 상에 축적하였고 신속히 동결건조하였다. 준비된 membrane들을 60°C에서 일정시간 동안 열처리한 후 측정시스템의 구성에 이용하였고, *Salmonella* 표준항원 (1×10^7 cells/mL)을 이용하여 분석을 수행하였다. 안정성을 비교하기 위해, trehalose를 첨가하지 않은 분석시스템으로 같은 과정을 반복 수행하였다.

Shelf-life 산출

안정화된 분석시스템의 shelf-life 결정 시 요구되는 실험자료를 마련하기 위해 다양한 온도에서 시간에 대한 활성변화를 측정하였다. 위에서와 같이 포획항체의 경우 3% trehalose를 첨가한 후 상온에서 건조하였고, 항체-gold 중합체는 24% trehalose 존재 하에서 동결건조하였다. 준비된 두 구성성분을 60°C로 유지되는 항온실에서 1-21일, 70°C에서 3-14일, 그리고 90°C에서 1.5-6시간 동안 각각 열처리하였다. 열처리된 구성성분들을 위에서 설명된 바와 같이 측정시스템으로 결합하였고, 1×10^7 cells/mL *Salmonella* 항원을 시료로 사용하여 분석을 수행하였다. 발색된 신호를 optical density로 변환시킨 후 shelf-life 결정을 위한 자료로 사용하였다 (이론 및 계산과정은 '결과 및 고찰' 참조).

결과 및 고찰

시료 내 식중독균 (모델분석물질: *Salmonella typhimurium* 항원)의 존재 여부는 분석물질 특정항체들이 적절히 결합된 세공성 membrane strip과 표지물질을 이용한 면역 크로마토그래피 방법에 의해 간편하게 결정될 수 있다. 분석물질에 대한 특정항체들로서 항원분자 (분석물질) 상의 인지부위가 다른 두 종류의 단일클론 항체가 일반적으로 사용되지만, 본 연구에서는 그와 유사한 성능을 갖도록 정제된 복합클론 항체를 사용하였다. 이 항체를 세공성 NC membrane 표면의 일정부분에 고정화하였고 또한 colloidal gold와 물리적으로 중합시킨 후 흡습성이 뛰어난 glass fiber membrane 상에 축적시켜 건조하였다. Figure 1에서와 같이, 제조된 두 membrane들을 길이로 접촉시킨 후 그 상부에 cellulose membrane이 연결된 strip형 면역분석시스템을 개발하였다(12). 이와 같은 면역 strip의 하단으로부터 분석물질인 *Salmonella* 항원이 존재하는 시료를 모세관현상에 의해 흡수시키면, glass fiber membrane 상에서 용해된 중합체와 항원 간 제1차 항원-항체 반응에 의해 면역결합체가 형성되고 이 결합체는 NC membrane 상으로 이동되어 고정화된 포획항체와 제2차 부착반응 됨으로써 항원을 중심으로 sandwich 형태의 결합체가 형성된다. 이 결합체 내에는 신호발생원인 colloidal gold가 포함되므로 이로부터 붉은 색의 발색이 신호로써 발생되며 그 신호세기는 *Salmonella* 항원농도에 비례하고 총 분석시간은 15분 이내로 조절될 수 있다.

이와 같이 제조된 면역분석시스템의 상업화 시, 품질보증기간은 사용된 단백질 즉 항체분자의 안정성에 의해 주로 결정되므로 그 기능보존을 위한 단백질구조의 안정화는 반드시 성취되어야 한다. 제품의 장기간 유통과정 혹은 사용 중 초래될 수 있는 열에너지에 의한 항체기능의 손실은 자연적으로 진행되며 그 불활성속도는 온도에 비례한다. 따라서, 열에 의한 단백질 불안정화를 최소화시킬 수 있는 방법의 개발과 그 활성 유효기간의 예측은 매우 중요하다.

본 연구에서는 분석시스템에서 사용된 주요 구성성분들 즉, NC membrane 상에 고정화된 항체 (포획항체) 및 glass membrane에 축적된 항체 (탐지항체)-gold 중합체에 대한 안정화를 수행하였다. 그 접근방법으로써 단백질의 구조적 안정성을 향상시킬 수 있는 물질의 도입과 그 최적조성이 결정되었고, 이와 같은 조건하에서 분석시스템 초기활성의 90%가 유지되는 기

간 즉, shelf-life가 결정되었다.

단백질 안정화

단백질의 안정성은 탈수 시 그리고 보관 시 그 구조의 변형에 주로 기인하므로 그 안정화는 측정시스템 제조공정 중 분자구조를 보호하는 물질을 첨가하고 유지시킴으로써 수행될 수 있다(4). 이와 같은 목적으로 사용하는 안정제는 대상 단백질의 종류에 따라 상이할 수 있고 또한 그 화학적 조성은 단백질의 기능에 따라 최적화 되어야 한다. 따라서 잠재성을 지닌 다양한 안정제를 시험하였고 각 구성성분들의 최대 성능이 유지되도록 안정화 조건들이 결정되었다.

안정제의 선택 : 항체와 같은 기능성 단백질을 수용액에 용해된 상태로 보관 시 보통 bovine serum albumin과 casein 등과 같은 보호 단백질을 그 용액 내에 첨가한다 이러한 보호 단백질은 항체분자 주위에 존재함으로써 용액에 포함될 수 있는 안정성 저해물질 (일반적으로, free radical, proteolytic activity, heavy metal 등)의 항체에 대한 직접적인 영향을 감소시키는 보호효과를 나타낸다. 유사한 보호기능을 나타내는 물질로써 동물 혈청 그리고 아미노산류가 보고된 바 있다(8,10). 특히, 건조 시 단백질분자와 수소결합에 의해 상호 작용하는 물분자의 탈착이 야기되므로 그 분자구조를 유지시키기 위해 일부 당류들이 사용될 수 있는 것으로 알려져 있다(9).

개발된 측정시스템의 초기성능의 유지를 위해, NC membrane 상에 고정화된 항체의 안정화 물질로써 상업적으로 구입 가능한 혈청 (토끼, 인간)과 아미노산 (glycine, lysine) 그리고 당류 (sucrose, trehalose)를 각각 두 종류씩 대표적으로 시험하였다 (Figure 2). 아미노산과 당류의 농도는 분석시스템의 유속에 미치는 영향을 고려하여 3%로 고정되었으며, 혈청은 분석시스템에서 사용된 항체와의 교차반응을 최소화하기 위해 1%로 조절되었다. 이와 같은 안정제를 첨가하여 제조된 면역 membrane (즉, 항체가 고정화된 membrane)의 열에 대한 안정성을 가속시험하

기 위해 60°C에서 3일간 열처리를 수행하였다. 이와 같이 안정제의 존재 하에서 열처리된 면역 membrane들을 사용한 측정시스템의 성능은 모두 안정제의 부재 하에서 동일한 과정에 의해 얻어진 결과 (Negative control)와 열처리를 하지 않은 경우 (Positive control)의 사이에 존재하였다 (Figure 2). 주목할 만한 사항으로, 안정효과는 사용된 물질의 종류에 따라 현저히 다른 것으로 나타났고 당류와 아미노산 그리고 혈청의 순으로 유효하였다. 특히, 당류인 trehalose를 사용하여 제조한 시스템의 성능은 열처리 전후 현저한 변화가 없는 것으로 나타났다

이당류인 trehalose는 주로 식품보존을 위한 동결건조 시 첨가하는 물질로써, 단백질의 건조 시 수소결합을 형성하였던 물분자가 탈착되면 그 자리에 trehalose 분자가 대체되어 단백질 구조를 안정하게 유지시키는 것으로 알려져 있다(9,15-17). 이 안정제의 존재 하에서 단백질을 탈수시킬 경우 용해상태의 trehalose는 고점도의 syrup 형태로 전환되고 탈수가 더욱 진행됨에 따라 높은 점도와 탄성을 지닌 viscoelastic 상태로 변환되어진다. 이로부터 탈수의 진행은 다시 상태변화를 유발하여 glass 상태의 trehalose 결정이 단백질분자 주위에 형성됨으로써 주위의 열에너지로부터 단백질을 안정하게 보호한다(18,19). 반면에, trehalose와 유사한 구조의 sucrose는 화학적으로 불안정하여 열에너지에 의해 단당류인 glucose와 fructose로 분해되므로 단백질 안정화 효과가 감소되고 더욱이 분해된 당은 단백질분자 상의 amino 그룹과 반응 (glycosylation)하는 것으로 보고되고 있다(20).

참고로, trehalose와 다른 물질 (아미노산 등)과의 결합효과가 시험되었지만 trehalose를 단독으로 사용한 경우와 비교하여 측정시스템의 성능은 현저히 향상되지 않았다. 그러므로, 본 연구에서는 trehalose를 본 분석시스템의 안정제로써 선택하였고 시스템 각 구성성분 즉, 고정화된 포획항체와 탐지항체-gold 중합체의 안정화를 위한 최적조성이 연구되었다.

포획항체 : Membrane 표면에 고정화된 항체를 위한 안정제의 최적농도는 그 단백질의 기능성과 분석시간을 결정하는 시료의 유속에 대해 결정되었다. 안정제인 trehalose 0.3-3% 용액으로 처리된 면역 membrane을 60°C에서 7일간 노출시킨 후 이 membrane을 이용하여 측정시스템을 구성하였고 분석물질 농도 변화에 대한 발색신호 세기를 측정하였다 (Figure 3). 사용된 모든 안정제 농도에서 유사한 농도응답 양상이 얻어졌지만, 일정 농도에서의 신호세기는 trehalose 농도에 정비례하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터, 3% trehalose는 다른 농도에서 보다 포획항체에 대한 안정화 효과가 높은 것으로 판단된다. 그러나, 3% 보다 높은 농도의 안정제를 사용할 경우 측정시스템의 안정성은 현저히 증가되지 않는 반면에 분석 시 용액의 점도가 증가하여 유속이 현저히 감소되었고 따라서 총 분석시간이 15분을 초과하였다. 그러므로, 시스템의 안정성과 분석시간을 고려하여 trehalose의 최적농도를 3%로 결정하였다.

탐지항체-gold 중합체 : 포획항체와는 달리, 신호발생용 항체-gold 중합체는 glass fiber membrane 상에 건조상태로 축적되지만 분석시료 수용액과 접촉 시 체용해되어 액체상에서 분석물질과 면역반응하도록 고안된다. 따라서, 항체의 안정화를 성취하기 전에 먼저 면역반응공정을 원활히 유발시키기 위해 수용액에 대한 중합체의 높은 용해성이 유지되도록 조건이 결정되어야 한다. 단백질 용해성 및 그 활성은 동결건조 방법의 사용에 의해 향상될 수 있는 것으로 보고되어 있으므로(4) 그 효과를 우선하

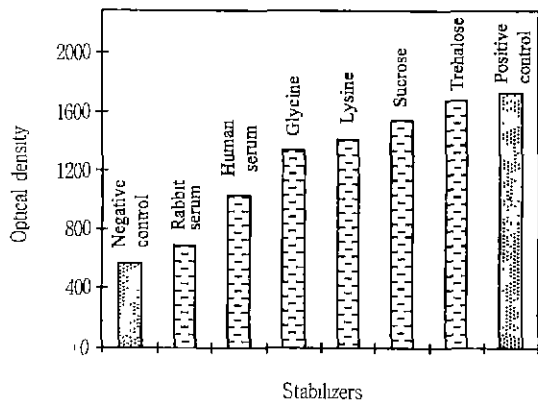


Figure 2. Thermo-stability of the capture antibody immobilized on membrane surfaces in the presence of various potential stabilizers. Stabilizers selected were two kinds of serum (human and rabbit), two amino acids (glycine and lysine), and two disaccharides (sucrose and trehalose) Their stabilization effects after thermal treatment were compared with results obtained without stabilizer (Negative control) and before the treatment (Positive control).

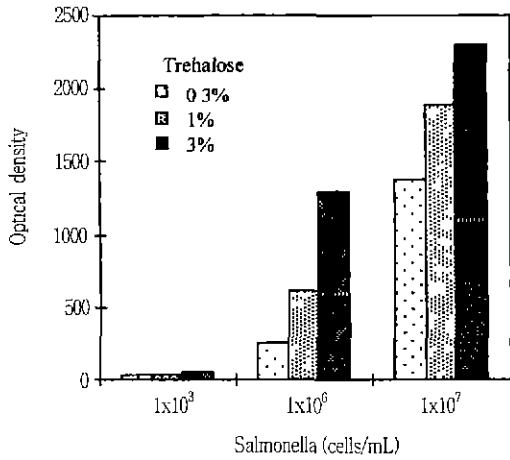


Figure 3 Determination of optimal trehalose concentration as to the stability of the immobilized capture antibody After exposure to thermal energy, signals measured from the system proportionally increased to the trehalose concentration in a selected range.

여 시험하였고, 또한 결정된 조건하에서 항체 안정화를 위한 trehalose 최적농도를 구하였다.

중합체의 용해도에 대한 동결건조 효과를 시험하기 위해 중합체 용액을 glass membrane 표면에 가한 후 공기 중 건조 혹은 동결건조를 수행하였고, 또한 3% trehalose 존재 하에서 동결건조 시킴으로써 중합체의 용해성과 안정성에 대한 복합효과를 점검하였다 (Figure 4). 이와 같이 제조된 membrane을 60°C에서 3 일 긴 열처리한 후 분석시스템의 제조에 사용하였고 이를 이용하여 분석물질에 대한 응답을 구하였다. 중합체의 동결건조만을 단지 수행한 경우 (Without trehalose) 공기 중 건조시킨 결과 (Negative control)와 비교하여 상대적으로 높은 신호가 얻어졌다. 이것은 단백질을 공기 중에서 건조시키면 탈수가 점차 진행됨에 따라 분자 간 응집현상이 발생되고 결국 수용액에 대한 용해도의 감소가 초래되는 반면에 동결건조는 단백질분자 간의 상호작용이 최소화되므로 그와 같은 저해효과가 제거되었기 때문에 예측된다(4). 더욱이, 3% trehalose 존재 하에서 동결건조 시 (With trehalose) 신호수율은 그 부재시 보다 현저히 상승되었다 이 결과로부터, 동결건조는 용해성을 향상시켜 신호수율을 향상시키지만, trehalose가 부재할 경우 단백질구조는 열에너지로부터 보호받지 못하는 것으로 나타났다. 그러나, 3% trehalose 존재 하에서 얻어진 최고신호는 열처리되지 않은 결과 (Positive control)와 비교하여 매우 낮았으므로 그 안정제 농도의 최적화가 요구되었다

중합체의 안정화 조건을 결정하기 위해 다양한 농도의 trehalose (0-24% 범위)가 포함된 중합체 용액을 위에서와 같이 glass membrane 상에서 동결건조하였고 이 구성성분을 고온에 노출시킨 후 그 신호발생능을 시험하였다 (Figure 5) 신호세기는 안정제 농도에 정비례하여 증가하였고, 24% trehalose 농도에서의 신호발생량은 열처리되지 않은 중합체를 이용하여 얻은 결과 (Positive control)와 거의 동일한 것으로 나타났다. 그 보다 높은 농도의 trehalose는 포획항체의 경우에서의와 같이 운반용액의 점도를 상승시켰고 따라서 분석시간의 연장을 초래하였다. 이

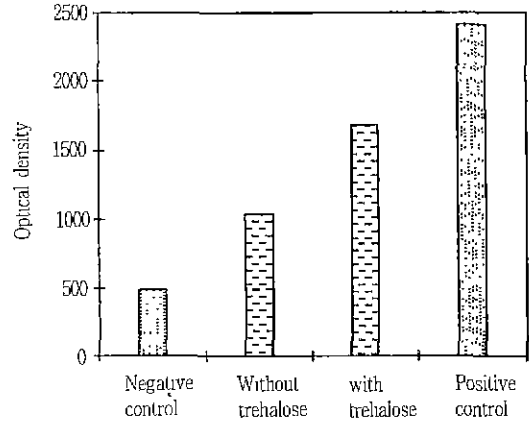


Figure 4. Combined effect of trehalose and freeze-drying on the stability of the detection antibody-gold conjugate. Freeze-drying process itself (Without trehalose) improved the stability as compared to the result of air drying (Negative control), and this effect further increased by supplementing 3% trehalose (With trehalose). However, the combination effect was still not satisfactory as compared to the result obtained before heat treatment (Positive control).

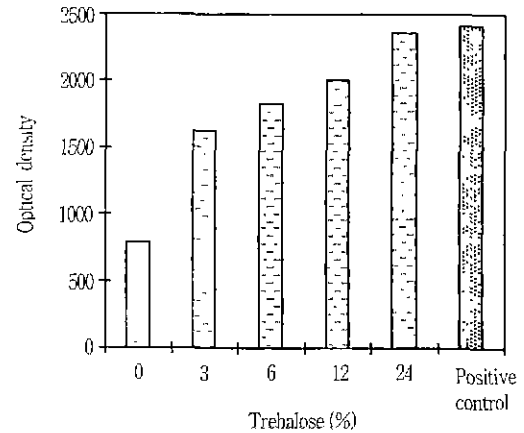


Figure 5 Optimization of trehalose concentration added to the antibody-gold conjugate. Thermo-stability of the conjugate increased in proportion to the trehalose concentration used. Thermal treatment of the conjugate in the presence of 24% trehalose did not cause a significant decrease in the activity if compared to the result before the treatment (Positive control)

와 같은 결과로부터, 탐지항체의 안정성과 분석시간이 함께 고려된 안정제의 최적농도를 24%로 결정하였다

탐지항체에 대한 안정제의 최적농도 (24% trehalose)가 포획항체에 대한 조건 (3%)과 비교하여 현저히 다른 이유는 대상 단백질의 축적상태와 밀도의 차이에 의해 설명될 수 있다 일반적으로, 포획항체의 경우에서의와 같이 단백질이 고체상에 고정화되면 그 분자와 고체표면 간의 상호작용에 의해 비고정화상에서 보다 그 구조적 안정성이 향상된다(21). 또한, 축적에 사용된 두 항체량은 유사하지만 고정화효율에 따라 고체표면에 진존한 포획항체량은 감소되므로 membrane 단위 투영면적 당 포획항체의 밀

도는 탐지항체의 경우와 비교하여 상대적으로 낮다. 이와 같은 항체분자의 축적조건 변화에 따라 그 안정화를 위해 요구되는 trehalose의 농도는 상이하게 결정되는 것으로 판단된다.

분석시스템의 열 안정성

상기한 바와 같이 각 구성성분의 기능에 대해 최적화 된 안정제의 존재 하에서 분석시스템을 제조하였고 그 시스템의 보관기간에 따른 총괄성능의 변화를 측정하였다. 상업화된 면역진단제품의 경우 일반적으로 실온에서 1-2년 동안 그 활성유지가 요구되고 이에 대한 충족여부는 고온에서 가속실험에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 실온에서 약 1년 간의 단백질 활성은 50°C에서 1달 간 유지된 단백질 안정성에 상응한다(4). 이와 같은 원리를 이용한 가속 열 안정성 시험을 위해, 제조된 분석시스템을 60°C에서 28일 간 열처리함으로써 시간에 따른 성능변화를 초기 면역활성에 대한 백분율로 측정하였다 (Figure 6). 안정제를 사용하지 않은 경우 (Tris) 단 하루만에 60%의 활성감소를 나타냈고 약 7일 이후부터는 신호발생이 탐지되지 않은 반면에, 안정제인 trehalose로 처리된 시스템의 활성 (Trehalose)은 동일한 온도 조건 하에서 약 21일 동안 초기값의 90% 이상 유지되는 것으로 나타났다. 동일한 온도조건 하에서 시험된 다른 보고와 비교하면 (22), 이 결과는 실온에서 약 2년 동안의 활성 유지기간에 해당된다 이와 같은 간접적인 비교는 열에너지에 의한 생화학물질들의 불활성화 이론 (아래 참조)의 일반성에 근거한다.

주목할 만한 사항으로, 실험초기에 나타난 일시적 활성감소현상 (열처리 후 이틀째 결과 참조)은 반복실험 시 재현성이 있었으며, 이와 같은 초기 활성변화는 위에서 언급된 바와 같은 탈수에 따른 trehalose의 상태변화가 반영된 것으로 예측된다. 즉, 실험 3일째부터 trehalose의 안정한 glass 상태가 형성되며 이 상태는 사용된 조건하에서 약 18일 간 지속됨으로써 열에너지에 대해 단백질의 구조적 안정성을 유지시키는 것으로 추측된다 그러나 탈수가 더욱 진행되면 glass 상태가 파괴되어 고정화된 포획항체나 항체-gold 중합체를 열에너지로부터 보호하지 못하는 것으로 판단된다(18,19).

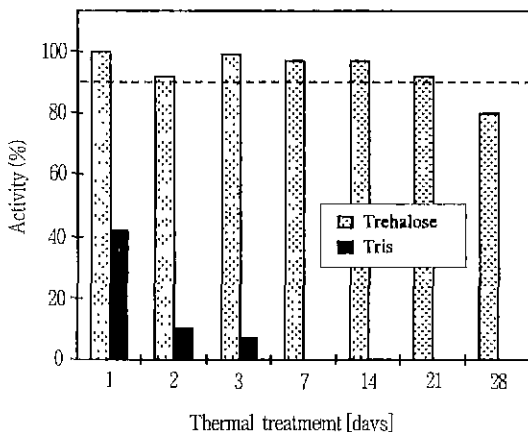


Figure 6. Thermo-stability of the analytical system composed of membranes with immobilized antibody and freeze-dried antibody-gold conjugate. The system was constructed under optimal conditions (Trehalose) and its performance toward stability at 60°C was compared with that prepared in absence of trehalose (Tris).

Shelf-life 결정

면역분석시스템의 성능은 보통 측정민감도 (측정하한농도로 정의), 분석시간, 사용 편리성 등으로 평가되지만 제품의 상업화 관점에서 그 유통기간을 결정하는 시스템 안정성도 반드시 고려되어야 할 주요 인자이다. 분석시스템의 안정성은 위에서 예증된 바와 같이 단백질 안정제의 도입에 의해 조절될 수 있었고, 그 최적조건 하에서 시스템 초기활성의 90% 이상 유지되는 기간 즉 shelf-life를 결정하고자 하였다.

이론 : 측정시스템 구성성분인 단백질의 시간에 따른 활성변화는 다음에서와 같이 1차 불활성 속도식으로 표현된다(4,23).

$$- d[p]/dt = k_d [p] \tag{a}$$

이 식에서 [p]는 활성을 갖는 단백질의 농도, t는 시간, 그리고 k_d 는 불활성화 속도상수를 각각 나타낸다. 실험초기에 즉 $t = 0$ 에서의 초기활성은 $[p] = [p_0]$ 이고 임의의 시간 $t = t$ 일 때 $[p] = [p]$ 이라고 하면, 이와 같은 범위에서의 식 (a)의 적분 결과는 다음과 같다.

$$- \ln ([p]/[p_0]) = k_d t \tag{b}$$

식 (b)에서 $[p]/[p_0]$ 는 시간 t에서의 총 단백질에 대한 잔여 활성단백질의 분율을 나타내므로 이 비율은 분석시스템에서 항원-항체 반응에 의해 발생된 초기 신호세기에 대한 시간 t에서의 신호량의 비로써 측정될 수 있다. 일정 보관온도 (예를 들어, 실온)에서의 유통기간은 다음과 같이 shelf-life (즉, $[p]/[p_0] = 0.9$ 이상이 유지되는 기간)에 의해 결정된다.

$$t_{shelf-life} = - \ln(0.9) / k_d \tag{c}$$

실온 보관조건에서 면역제품의 shelf-life는 보통 1년 이상이므로 이를 결정하기 위해서는 장기간의 실험이 요구되지만 실온에서의 k_d 값을 계산할 수 있을 경우 식 (c)에 따라 비교적 간편하게 계산될 수 있다.

속도상수 k_d 는 다음과 같은 Arrhenius 식에 의해 다음과 같이 온도의 함수로써 표현된다(4,23).

$$k_d = k_0 e^{-E_d/RT} \tag{d}$$

이 식에서 k_0 는 frequency factor, E_d 는 불활성화 에너지, R은 기체상수, 그리고 T는 절대온도를 나타낸다 사용된 단백질에 특이한 두 변수 k_0 와 E_d 를 결정하기 위해 식 (d)의 양변에 logarithm을 취하여 선형화 하면,

$$\ln k_d = \ln k_0 - (E_d/R) (1/T) \tag{e}$$

이 된다.

상기한 이론식들을 이용한 k_d 의 결정과 보관조건인 실온에서의 shelf-life의 산출과정은 다음과 같다.

첫째로, 단백질 불활성화 속도가 비교적 빠른 높은 온도에서 시간에 대한 측정시스템의 신호변화를 측정하여 활성잔여율 ($[p]/[p_0]$)을 구하고, 이로부터 t에 대한 $-\ln ([p]/[p_0])$ 를 계산하여 도식화한다. 도식된 자료로부터 원점을 지나는 직선의 회귀식을 구하면 그 기울기로부터 식 (b)에 따라 속도상수 k_d 를 결정한다.

둘째로, 다른 두 온도 이상에서 첫째 과정을 반복하여 k_d 값들을 결정하고, $1/T$ 에 대한 $\ln(k_d)$ 를 도식화하여 1차 회귀식을 구한다. 이 식의 기울기와 Y-축 절편으로부터 식 (e)에 따라 E_d/R 와 k_0 를 각각 결정한다.

셋째로, 위에서 구한 E_d/R 와 k_0 값들을 식 (d)에 대입한 후, 그 식으로부터 실온 ($T = 298$ K)에서의 k_d 를 계산한다. 그 결과를 식 (c)에 대입함으로써 실온 보관조건에서의 shelf-life를 결정한다.

Shelf-life 산출 . 위에서 제시된 과정에 따라, 항체성분이 포함된 구성성분들을 미리 설정된 세 온도 (60, 70, 90°C)에서 일정 시간 동안 열처리 후 분석에 사용하였고, 그 열에너지 효과로써 분석시스템으로부터 발생된 신호세기를 측정하였다. 위에서 제시된 첫째 과정에 따라 각 온도에서의 속도상수 k_d 값들을 결정하였다 (60°C에서 $2.316 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$, 70°C에서 $5.460 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$, 그리고 90°C에서 $7.726 \times 10^{-1} \text{ day}^{-1}$) 둘째 과정으로, 이와 같이 결정된 값으로부터 $\ln(k_d)$ 를 계산하여 절대온도의 역수에 대해 도식화하였고 (Figure 7), 그 도표로부터 1차 회귀식을 구하였다 ($Y = -1.421 \times 10^3 X + 3.814 \times 10^1$; 상관계수, $R^2 = 0.9931$). 이 회귀식을 이용하여 식 (e)에 따라 E_d (28,239 kcal/mol)와 k_0 ($3.68 \times 10^{16} \text{ day}^{-1}$)를 각각 결정하였고, 그 불활성화 에너지 값은 다양한 종류의 단백질에 대해 보고된 수치범위 (15–35 kcal/mol; (24–27)) 내에 존재하였다. 마지막으로, 결정된 상수값들을 식 (d)에 대입함으로써 실온 (25°C)에서의 속도상수 ($7.145 \times 10^{-5} \text{ day}^{-1}$)를 계산하였고, 이 조건하에서 식 (c)로부터 산출된 초기 활성의 90% 유지기간은 1,470일 (약 4년)인 것으로 계산되었다. 상기한 바와 같이 60°C에서의 안정성 시험결과 (Figure 6)로부터 예측되었고 또한 보고된 면역진단제품의 shelf-life가 2년 정도인 것과 비교할 때(4,22), 위에서 단백질 불활성화 이론에 근거한 열 가속실험에 의해 결정된 기간은 약 2배 더 긴 것으로 나타났다.

열 가속실험에 의해 결정된 shelf-life와 보고된 값의 차이는 주로 온도조절과 구성성분 변성효과에 의한 실험오차에 기인된 것으로 예측된다. 본 실험에서 사용된 항온실 기기는 매우 정확한 온도조절 ($\pm 0.2^\circ\text{C}$)이 가능하지만, 열처리 기간에 대한 안정성을 시험하기 위한 항온실의 개폐가 요구되고 더욱이 높은 온도에서는 불활성화 속도가 증가되므로 단위 시간 당 개폐횟수가 증가된다. 설정된 온도범위 중 가장 높은 90°C에서의 총 실험기간은 6시간으로 짧고 4회 이상 시료채취를 수행하여야 하므로 평균 1.5 시간 당 1회 이상 항온실을 개방하여야 하고 이에 따라 항온실 내 온도의 변동이 상대적으로 크게 된다. 이러한 온도변이는 불활성화 속도상수 k_d 값의 결정 시 실험오차로 작용하고 그 정도는 Figure 7에서와 같이 semi-log 도표에 도식 시 더욱 증폭된다. 다른 요인으로써, 단백질로 도포된 NC membrane을 고온에서 장기간 열처리 후 분석에 이용 시 처리 온도와 시간에 반비례하여 모세관현상에 의한 수용액의 유속이 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 고정화된 단백질 분자의 열에너지에 의한 구조적 변형 (예: denaturation)과 이에 의해 야기되는 고체 표면의 소수성성질의 증가 혹은 membrane 자체의 경화현상에 의해 초래되는 것으로 추측된다. 모세관을 통한 유속의 감소는 항원-항체 반응시간 그리고 결과적으로 발생된 신호세기를 변화시키므로 shelf-life 산출 시 오차를 증가시킬 수 있는 것으로 판단된다.

결론으로써, 건조상태로 고체표면에 고정화된 항체와 동결건조

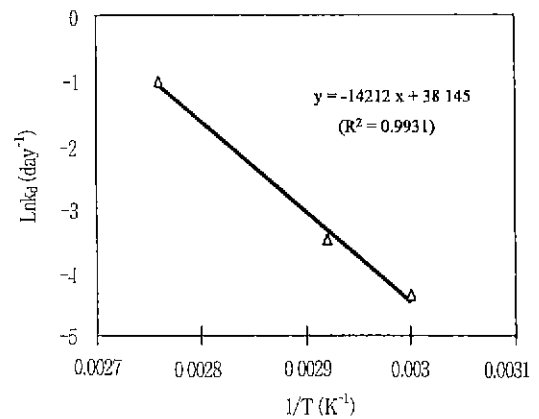


Figure 7 Determination of the frequency factor and deactivation energy of the membrane strip immunoassay system by plotting $\ln k_d$ versus $1/T$ according to equation 5. The two constants of the system were calculated from the y-intercept and slope of the regression line, respectively.

된 항체-gold 중합체를 구성성분으로 포함하는 면역진단키트의 기능성 안정화는 각각 3%와 24% trehalose 존재 하에서 다른 분석성능의 희생 없이 성취되었고, 그 조건하에서 상업화 시 품질보증기간으로 대표되는 shelf-life는 실온에서 약 4년인 것으로 산출되었다. 이 기간은 안정성 시험결과 (Figure 6 참조)를 이용하여 환산되거나 혹은 문헌에 보고된 수치와 비교하여 2배 정도 더 긴 것으로 나타났다. Shelf-life 산출에 사용된 불활성화 속도상수의 측정과정은 실험오차에 의해 매우 민감하게 영향을 받았고 그 측정 정확성은 다음과 같은 두 보완책에 의해 향상될 수 있을 것으로 판단된다. 첫째로, 일정 온도에서 보관기간에 대한 membrane 시료 채취 시 항온실 개폐에 따른 그 내부 온도변화를 유발하지 않는 특수 실험장치가 요구된다. 둘째로, 단기간 내 과량의 열에너지를 membrane 상에 적용하면 다른 분석조건들의 변화를 초래하므로 가능한 낮은 온도에서 장기간의 실험수행이 필요하다.

요 약

키트형태인 면역 strip 제조를 위해 membrane 상에 건조상태로 존재하는 항체 (*Salmonella typhimurium* 특정항체)의 안정화를 수행하였고, 최적조건 하에서 초기 활성의 90%가 유지되는 기간 즉 shelf-life를 결정하였다. 두 주요 구성성분들을 제조하기 위해 항체를 nitrocellulose membrane 표면에 고정화하였고 또한 신호발생원으로 선택된 gold colloid와 중합시킨 후 glass fiber membrane의 세공 내에 축적하였다. 이와 같은 구성성분들의 잠재적인 안정제 중 이당류인 trehalose는 항체분자구조를 열에너지로부터 현저히 보호하는 것으로 나타났다. 각 구성성분에 대한 trehalose의 최적농도를 결정한 결과 고정화된 항체의 경우와 비교하여 항체-gold 중합체는 8배 높은 농도를 요구하였고, 이것은 membrane 상에 존재하는 항체의 상태와 밀도의 차이에 기인하는 것으로 예측된다. 그 중합체에 대한 추가 조건으로 이 성분이 수용액과 접촉 시 즉시 계용해 될 수 있도록 동결건조과정에서 요구되었다. 최적조건 하에서 제조된 성분들로 면역 strip을 구성한

후 열처리 실험을 수행하였고, 그 시스템으로부터의 신호세기는 60°C에서 21일 동안 90% 이상 유지되는 것으로 나타났다. 문헌상의 보고와 비교하여, 이 결과는 실온에서 약 2년의 shelf-life에 해당되었다. 그러나 단백질의 불활성화 속도 이론에 근거한 열 가속실험으로부터 산출된 값은 그 보다 2배 더 긴 것으로 나타났다. 이와 같은 두 예측치 간의 차이는 주로 항온조의 개폐에 따른 열처리 온도의 부정확한 조절과 고온에서 구성성분들의 물리적 상태변화에 기인한 것으로 예측된다.

감 사

본 연구는 두산인재기술개발원의 재정지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Yalow, R. S. and S. A. Berson (1959), Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods, *Nature*, **184**, 1648-1649.
2. Köhler, G. and C. Milstein (1975), Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity, *Nature*, **256**, 495-497.
3. Gosling, J. P. (1990), A Decade of Development in Immunoassay Methodology, *Clin. Chem.*, **36**, 1408-1427.
4. Deshpande, S. S. (1996), Enzyme Immunoassays from Concept to Product Development, pp. 360-400, Chapman & Hall, New York
5. Chan, D. W. (1992), Automation of Immunoassay. Immunoassay Automation. A Practical Guide (D. W. Chan, ed), pp. 9-21, Academic Press, San Diego
6. Dahl, H. A. and S. H. From (1971), Some Effects of Polyvinyl Alcohol and Polyvinyl Pyrrolidone on the Activity of Lactate Dehydrogenase and its Isoenzymes, *Histochemie*, **25**, 182-190.
7. Montoya, A. and J. V. Castell (1987), Long-Term Storage of Peroxidase-Labelled Immunoglobulins for Use in Enzyme Immunoassay, *J. Immunol. Meth.*, **99**, 13-20.
8. Taneja, S. and F. Ahmad (1994), Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Amino Acids, *Biochem. J.*, **303**, 147-153
9. Carpenter, J. F. and J. H. Crowe (1989), An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions of Carbohydrates with Dried Proteins, *Biochemistry*, **28**, 3916-3922
10. Gupta, C. K., J. Leszczynski, R. K. Gupta, and G. R. Siber (1996), Stabilization of Respiratory Syncytial Virus (RSV) against Thermal Inactivation and Freeze-Thaw Cycles for Development and Control of RSV Vaccines and Immune Globulin, *Vaccine*, **14**, 1417-1420.
11. Hart, A. L., H. Cox, and D. Janssen (1996), Stabilization of Lactate Oxidase in Screen-Printed Enzyme Electrodes, *Biosen Bioelect.*, **11**, 833-837.
12. 백세환, 이창우, 이창섭, 육순학 (1996), Immuno-Chromatography 방법을 이용한 식중독균 (*Salmonella typhimurium*) 1단계 분석시스템의 개발, *한국생물공학회지*, **11**, 420-430.
13. Albrecht, R. M., S. R. Simmons, and J. B. Pawley (1993), Correlative Video-Enhanced Light Microscopy, High Voltage Transmission Electron Microscopy, and Field Emission Scanning Electron Microscopy for the Localization of Colloidal Gold Labels, *Immunocytochemistry: A Practical Approach* (J. E. Beesley, ed.), pp.151-176, Oxford University Press, Oxford.
14. Roth, J. (1983), The Colloidal Gold Marker System for Light and Electron Microscopic Cytochemistry, *Techniques in Immunocytochemistry* (C. R. Bullock and P. Petrusz, eds.), pp. 217-284, Academic Press, London.
15. Carpenter, J. F., S. J. Prestrelski, and T. Arakawa (1993), Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins using Stress-Specific Stabilization I. Enzyme Activity and Calorimetric Studies, *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 456-464.
16. Prestrelski, S. J., T. Arakawa, and J. F. Carpenter (1993), Separation of Freezing- and Drying-Induced Denaturation of Lyophilized Proteins using Stress-Specific Stabilization II. Structural Studies using Infrared Spectroscopy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 465-473.
17. Xie, G. and S. N. Timasheff (1997), The Thermodynamic Mechanism of Protein Stabilization by Trehalose, *Biophys. Chem.*, **64**, 25-43
18. Crowe, L. M., D. S. Reid, and J. H. Crowe (1996), Is Trehalose Special for Preserving Dry Biomaterials?, *Biophys. J.*, **71**, 2087-2093
19. Sun, W. Q., A. C. Leopold, L. M. Crowe, and J. H. Crowe (1996), Stability of Dry Liposomes in Sugar Glasses, *Biophys. J.*, **70**, 1769-1776.
20. Draber, P., E. Draberova, and M. Novakova (1995), Stability of Monoclonal IgM Antibodies Freeze-Dried in the Presence of Trehalose, *J. Immunol. Meth.*, **181**, 37-43.
21. 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, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1144-1152.
22. Presa-Owens, S. D. L., M. C. Lopez-Sabater, and M. Rivero-Urgell (1995), Shelf-Life Prediction of an Infant Formula using an Accelerated Stability Test (Rancimat), *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2879-2882.
23. Bailey, J. E. and D. F. Ollis (1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, pp.86-156, McGraw-Hill Book Co., New York.
24. Obon, J. M., A. Manjon, and J. L. Iborra (1996), Comparative Thermostability of Glucose Dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*. Effects of Salts and Polyols, *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 352-360.
25. Pimentel, M. C. B., E. H. M. Melo, J. L. L. Filho, W. M. Ledingham, and N. Duran (1997), Lipase from a

- Brazilian Strain *Penicillium citrinum* Cultured in a Simple and Inexpensive Medium Heat-Denaturation, Kinetics, and pH Stability, *Appl. Biochem Biotechnol.*, **66**, 185-195.
26. Robert, C. M., F. R. Cadet, C. C. Rouch, M. Pabon, and F. Richard-Forget (1995), Kinetic Study of the Irreversible Thermal Deactivation of Palmito (*Acanthopoenix rubra*) Polyphenol Oxidase and Effect of pH, *J. Agric Food Chem.*, **43**, 1143-1150.
27. Surendran, N., R. Bhardwaj, S. O. Ugwu, E. J. Sterling, and J. Blanchard (1996), Partitioning Properties and Degradation Kinetics of the [Nle⁴-Dphe⁷] α -MSH Analog Melanotan-I (MT-I), *Int J Pharm.*, **135**, 81-89.