

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens* 전세포 고정화법을 이용한 Casein Phosphopeptides 생산

이 기 성 · 신 재 윤 · 장 이 현 · 권 대 혁 · 박 기 문 · † 진 용 수
성균관대학교 생명공학부
(접수 : 2007. 11. 7., 게재승인 : 2008. 2. 20.)

Production of casein phosphopeptides using *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* cell immobilization

Ki-Sung Lee, Jae Yoon Shin, Yi-Hyun Jang, Dae-Hyuk Kweon, Kimoon Park, and Yong-Su Jin†
School of Biotechnology and Bioengineering, Sungkyunkwan University
(Received : 2007. 11. 7., Accepted : 2008. 2. 20.)

Optimum conditions for production of casein phosphopeptides (CPP) from sodium caseinate by immobilized cell culture of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* were investigated. Immobilized cells were made by mixing 60% sodium alginate solution with an equal volume of culture broth at the end of exponential phase and subsequently dropping the mixture into CaCl₂ solution. Optimum conditions for CPP production by the immobilized cells were the same as those (50°C, pH 7.0, and 10% substrate concentration) by the crude enzyme solution from the supernatant of culture broth. Optimum loading volume of the immobilized cells into a batch reactor was 30% (w/v). Using a continuous reactor loaded by the immobilized cells under the identified optimal conditions, we were able to produce CPP continuously up to 30 days with a maximum CPP conversion efficiency of 20%.

Key Words : Casein phosphopeptides (CPP), *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*

서 론

Casein phosphopeptides (CPP)는 칼슘흡수촉진 물질로 알려져 있어 섭취된 칼슘의 체내 이용률을 높일 수 있는 기능성소재로서 개발, 시판되고 있다(12). CPP는 비교적 안정한 물질로서 음료, 과자류 등에 혼합하여도 가공공정에서의 분해 및 풍미손상이 거의 없으며, 발육기 및 임신, 수유기 등 많은 양의 칼슘섭취가 필요한 기간이나 고령층 등 다양한 소비자 기호에 적합한 상품화가 가능하며, 칼슘과 관련된 여러 문제의 해결에 도움이 되는 물질로 알려져 있다. 체내에서 부족하기 쉬운 칼슘의 체내 흡수율을 높여주는 물질인 CPP의 제조방법에는 황산 등의 산을 이용한 물리화학적 제법(19)과 동, 식물 유래의 protease를 이용한 효소공학적

제법(3, 11)이 있다. 산을 이용한 방법은 산처리에 의한 다양한 부산물의 생성으로 인하여 식품원료로서의 이용성이 낮은 문제점이 있으며, 동식물 유래의 protease는 고순도의 CPP를 얻을 수 있지만, 고가라는 단점이 있다. 최근에는 비교적 가격이 저렴하면서 활성이 높은 미생물 유래의 protease를 사용하여 CPP를 제조한 보고가 있다(5). 따라서, 미생물 유래의 protease를 이용하면서 생산성 향상을 위한 전세포고정화법을 이용한 CPP의 생산은 경제적인 장점을 가진다고 하겠다. 생물전환공정에서 생산성의 향상을 위해서 많이 쓰이는 균체 고정화 방법은 균체를 비 반응물질인 담체에 고착시켜 반응기 내에서 반응을 진행시키는 방법을 말하며, 균체고정화 방법을 이용한 방법의 장점으로는 배양하는 동안 세포가 유실되지 않고, 높은 균체농도를 얻을 수 있으며, 고정화 감체에 미생물이 제한되어 있으므로 연속식 배양 시 높은 dilution rate에서 연속적인 발효가 가능하다는 점이다. 또한 생성물의 분리공정이 용이하고 product의 생산성이 높으며 미생물의 안정성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 casein phosphopeptides (CPP) 생산에 있어서 고정화 균체를 이용한 공정을 도입한 예는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 casein phosphopeptides

† Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do, 440-746 Korea
Tel : +82-31-290-7812, Fax : +82-31-299-4810
E-mail : yjin@skku.edu

(CPP) 생산을 목적으로 유산균의 일종인 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*가 생성하는 효소를 이용하고자 전세포 고정화 기법을 이용하였다. 미생물의 고정화를 위해서는 담체의 조건을 충족시키면서 균체의 고정화 담체로 많이 이용하고 있는 sodium alginate를 사용하였다. 고정화된 미생물을 이용한 다양한 반응조건 (pH, 온도, 담체량)에서 casein phosphopeptides의 생산수율을 관찰하여 연속반응에 의한 CPP 생산 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*이며, Tryptic Soy Broth로 2회 계대한 후 glycerol이 20% 함유된 배지에 냉동 보관하였다.

Casein phosphopeptides (CPP) 회수

원료기질인 sodium caseinate에 사용균주 배양액을 1.5% 가하여 50℃에서 8시간 동안 반응시킨 후 100℃에서 10분간 불활성화 시킨 다음 효소분해물을 casein의 등전점인 pH 4.6에서 침전시켰다. 상등액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고 CaCl₂를 상등액에 대해 2%, ethanol을 50% 가하여 침전시켰으며, 침전물을 건조하여 생산된 CPP를 회수하였다.

생산된 CPP 분자량 측정

생산된 CPP의 분자량 분포와 분자량 측정을 위하여 Swank 등 (16)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 행하였다. Separating gel buffer로는 1% SDS, 1.0 M H₃PO₄ (Tris 염기로 pH 5.0으로 조절)을 사용하여 12.5% gel 농도에서 60V의 전압으로 실온에서 12시간 동안 전개한 후, 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 12시간 동안 염색하였다. 염색된 gel은 12.5% isopropanol, 10% acetic acid 혼합용액에서 탈색시켰다.

균체 고정화

고정화에 사용된 균주는 상기의 냉동 보관한 균주를 Tryptic Soy Broth에 배양하여 대수증식 말기의 것을 사용하였다. 그리고 균체고정화시 균체만을 이용할 경우에는 5,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 균체를 회수한 후 멸균된 증류수로 3회 세척하여 담체에 고정화시켜 사용하였고, 배양액 자체를 사용할 경우 배양액과 담체를 혼합하여 사용하였다. 균체고정화를 위해 사용한 혼합액의 alginate 농도는 최종적으로 3% (w/v)가 되도록 조절한 후 4% (w/v) CaCl₂ · 2H₂O 용액에 사출시켜 직경 약 3mm의 Ca-alginate bead를 제조하였다.

Immobilized cell을 이용한 CPP의 제조

CPP 생산조건을 설정하기 위하여 원료 기질인 sodium caseinate에 상기의 고정화된 Ca-alginate bead를 가하여 반응시킨 후, 이 반응액을 100℃에서 10분간 불활성화 시킨 다음

효소분해물을 pH 4.6에서 등전침전 시켰다. 상등액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후, CaCl₂를 상등액에 대하여 2%, ethanol을 반응액 최종농도의 50% 가하여 침전시켰으며, 침전물을 건조하여 CPP를 제조하였다.

Batch type반응기에 의한 CPP 생산

Batch type반응기에 의한 CPP 생산은 삼각플라스크를 사용하여 고정화방법 및 bead 사용량, 반응온도, 기질의 pH, 기질 농도 등의 여러 조건에서 반응시켜 반응시간에 따른 CPP의 양을 측정하여 반응 최적 조건을 확립하였다.

Continuous type반응기에 의한 CPP 생산

Continuous type반응기에 의한 CPP 생산은 고정화균체를 충전한 반응기에 원료기질을 투입하여 반응초기에 회분식으로 그리고 측정된 최적조건에 따른 반응시간에 도달한 후부터는 연속반응을 실시하였다.

CPP 생성량의 측정

CPP 생성량을 확인하기 위하여 효소반응액을 pH 4.6으로 등전침전하고 원심분리하여 CPP를 회수하였다. 단백질 정량법으로 CPP의 생성량을 확인하였으며 단백질은 Lowry 등 (9)의 방법을 응용하여 CPP를 표준물질로 하여 정량하였다. Reagent A는 증류수 100 ml에 CuSO₄ · 5H₂O를 0.5g, Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O 1 g을 용해하였고 Reagent B는 Na₂CO₃ 20 g과 NaOH 4 g을 증류수 1,000 ml에 용해하였다. Reagent C는 reagent B를 1:50의 비율로 혼합하여 사용하였고, 실험하기 직전에 조제 하였다. CPP를 정량분석 하기 위하여 효소액 0.5 g에 reagent C를 2.5 ml를 가하여 10분간 방치한 후 2배 희석한 Folin-Ciocalteu's phenol reagent 0.25 ml를 가하여 20분간 방치하였다. 660 nm에서 이 혼합액의 흡광도를 측정하였다. CPP의 생산수율은 생산된 CPP의 양과 첨가된 기질로부터의 생산될 수 있는 최대 CPP 양과의 비율로 정의하였다.

담체내 생균수 측정

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens*가 고정화된 bead를 1 g 취하여 멸균된 증류수로 2회 세척 하고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 용해하여 담체 내의 균체를 Tryptic Soy Agar로 37℃에서 24시간 배양 후 나타난 colony 수를 측정하여 생균수로 하였다.

결과 및 고찰

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens* protease에 의한 CPP 생산수율

10% Sodium caseinate을 함유한 배지에 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* cell을 접종한 후 37℃에서 20시간 동안 배양시키면서 CPP의 생성을 확인한 결과 배양 8시간째에 CPP의 생산수율이 가장 많았고 시간이 지남에 따라 CPP의 생산수율은 감소하였다. 또한 생균수는 4시간째부터 증가하기 시작하여 16시간에 대수증식기 말기가 되었다(Fig. 1). 배양 중에 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*로부터 분비된

protease의 최적효소 활성 조건을 알아보기 위하여 10% sodium caseinate 용액에 상기의 배양액을 1.5% 투입하여 각각의 온도 및 pH에 따른 CPP의 생산수율을 측정한 결과 50°C, pH 7.0~8.0에서 최대 생산량을 나타내었다(Fig. 2).

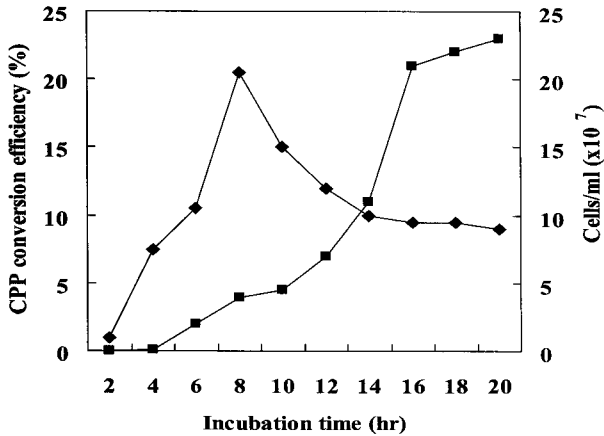


Figure 1. CPP conversion efficiency by *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* (culture ■: Cell growth, ◆: CPP conversion efficiency).

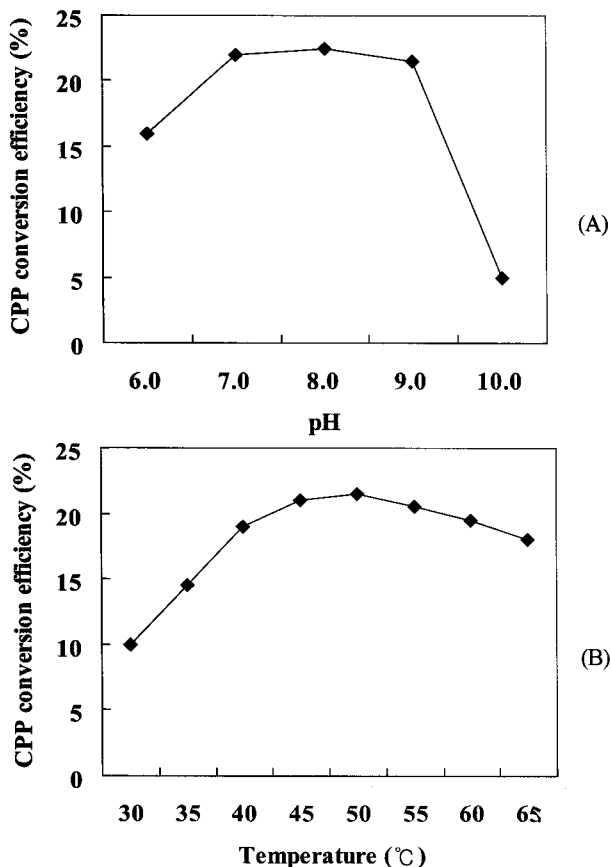


Figure 2. Effect of temperature (A) and pH (B) on CPP conversion efficiency by the culture broth of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*.

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens*에 의한 CPP의 칼슘가용화

10% Sodium caseinate 함유 배지에서 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*를 배양하여 회수한 CPP의 칼슘침전방지

효과를 시험한 결과 Ca²⁺이 2.5 mM, PO₄³⁻가 10 mM일 때 0.15 mg/ml의 CPP를 혼합하여 칼슘이 100% 용해되었다. 즉, 칼슘에 대해 1.5배의 CPP를 사용하면 칼슘의 불용성화를 방지할 수 있음을 확인 하였다. 이는 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*에 의해 생산된 CPP의 칼슘가용화가 가능함을 보여주며, 이러한 결과는 Naito (12)의 보고와 같은 결과이다.

Characterization of the produced CPP by *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*

10% Sodium caseinate 용액을 기질로 하여 *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*의 배양액을 사용하여 제조한 CPP의 분자량 분포를 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 행하였다. 기질인 sodium caseinate용액, 생산물인 protease에 의해 분해된 crude CPP, 그리고 Ca-ethanol 침전법으로 회수한 CPP의 분자량 분포를 확인하였다. 그 결과 기질인 sodium caseinate의 경우 분자량은 17,000 이상이었으며, crude CPP의 분자량은 3,000~17,000 이었다. 이는 분자량이 4,600인 α-CPP와 분자량이 3,100인 β-CPP 외에 다른 종류의 peptide 물질이 존재하고 있기 때문으로 사료된다. 생산된 CPP의 정확한 α-CPP와 β-CPP의 조성을 알 수 없으므로 효소에 의한 casein 분해물은 CPP혼합물 (α-CPP와 β-CPP)이라 하는 것이 적당할 것이다. Ca-ethanol 침전법으로 정제 회수한 CPP는 분자량이 3,000~6,500정도로 나타났다.

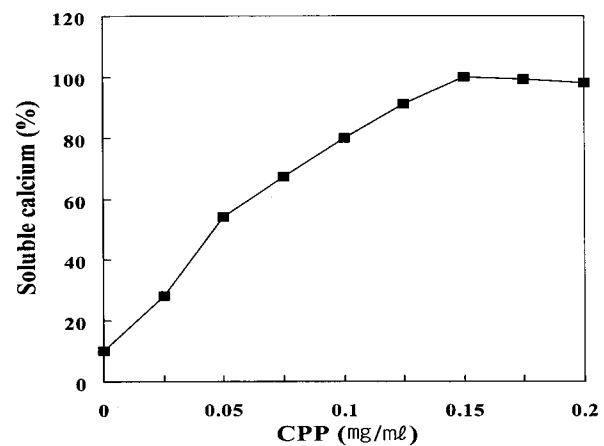


Figure 3. Effect of CPP concentration on calcium phosphate solubility (Ca²⁺ = 2.5 mM, PO₄³⁻ = 10 mM).

균체 고정화 방법과 배양액 고정화 방법에 의한 CPP 생산수율과 담체내 생균수 비교

담체를 이용하여 균체 고정화시 대수 증식기 말기의 균체만을 회수하여 담체에 고정화시키는 방법과 배양액을 담체와 혼합하여 고정화시키는 방법이 있는데, 두 가지 방법 (균체만을 회수하여 고정화, 배양액을 고정화)을 이용하여 고정화시킨 bead를 사용하여 기질과 반응한 후 CPP 생산수율을 비교하였다. 그 결과 균체만 회수하여 고정화시킨 것 보다 배양액을 담체와 혼합하여 고정화시킨 것이 반응초기부터 CPP의 생산수율이 월등히 많았다. 또한 균체고정화의 경우에는 초기반응 이후 반응이 거의 진행되지 않는 반면, 배양액 고정화 방법을 사용한 경우에는 반

응 시작 후 CPP의 생산수율이 6시간부터 점차 증가하여 10시간째 최고에 이르렀다가 점차 감소하였다(Fig. 4A). 두 가지 고정화 방법에 따른 담체내 생균수를 측정해본 결과 반응 초기에는 균체만 회수하여 고정화균체를 만든 bead가 생균수가 많았으나 시간이 지남에 따라 균의 생육이 멈춰 6시간부터는 두 가지 고정화 방법에 따른 담체내 생균수의 차이가 적어짐을 알 수 있었다(Fig. 4B). 균체만을 사용한 방법과 배양액을 사용한 방법의 CPP 생산수율이 상이한 것은 미생물의 직접적인 작용이 아닌 미생물이 생산한 단백질을 분해효소가 casein을 분해하여 CPP를 생산하기 때문으로 사료된다. 특히, 본 실험에서 사용한 균주가 생성하는 protease는 extracellular enzyme으로 균체회수 시 세척에 의해 미생물이 생산한 효소가 제거되고 균체만 회수되었기 때문으로 판단된다. 따라서 배양액을 이용한 고정화 방법을 이용하여 최적 반응조건을 조사 하였다.

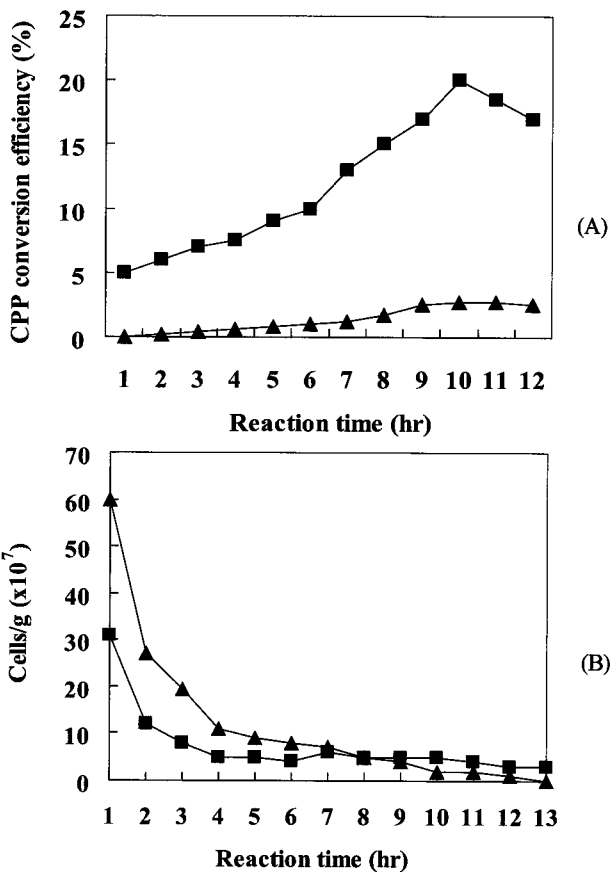


Figure 4. Comparison of immobilization methods on CPP conversion efficiency and cell growth in the bead (■: Culture broth immobilization, ▲: Washed cell immobilization).

고정화 담체의 loading volume이 CPP 생산에 미치는 영향

고정화 균체를 이용하여 CPP를 생산할 때, bead의 사용량에 따른 CPP 생산수율을 비교하여 최적의 bead사용량을 조사하였다. 반응 부피 100 ml당 bead 사용량을 10 g 및, 20 g, 30 g, 40 g 으로 바꾸어 주면서 반응시간에 따른 CPP의 생산수율을 비교하였다. 기질대비 10% (10 g 담체/100 ml 기질용액)와 20% 사용 시 생산량은 각각 18.1% 와

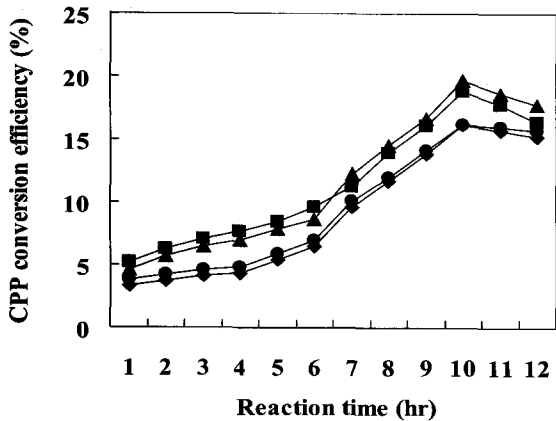
18.2%로 낮은 수준이었으며 bead 사용량과 비례하여 CPP의 생산수율도 증가하였다. 반응 후 6시간부터는 30%를 사용하였을 때 가장 높은 수치를 나타내었고 40% 사용 시에는 오히려 감소하였다(Fig. 5A). 따라서 bioreactor 내의 bead 사용량은 기질량 대비 30% 정도가 CPP생산을 위한 최적조건이었으므로 다음의 모든 실험은 기질량 대비 30%의 bead를 사용하여 실험을 수행하였다.

고정화 담체의 의한 CPP 생산에 반응온도, 및 pH, 기질 농도의 영향

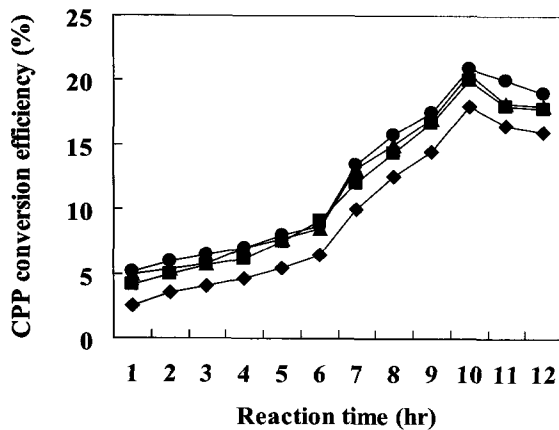
실험에 사용된 균주인 *Streptococcus faecalis var. liquefaciens*의 최적 생육온도는 37°C이지만 이 균이 생성하는 protease의 단백질을 분해력은 50°C에서 최대를 보였다(Fig. 2). 따라서 CPP 생산을 위한 반응 온도를 45°C 및 50°C, 55°C, 60°C로 바꾸어 주면서 고정화된 균체를 이용한 경우 반응온도에 따른 CPP의 생산수율을 조사하였다. 모든 온도에서 CPP의 생산수율이 반응 후 10시간까지는 꾸준히 증가하였으나 10시간 이후부터는 서서히 감소하였다. 그리고 protease가 포함된 배양액으로 실험한 결과와 같이 50°C에서 가장 많은 양의 CPP가 생산되었으며 45°C, 55°C와는 차이가 크지 않았으나 60°C의 경우 CPP 생산수율이 오히려 낮아졌다(Fig. 5B). 반응기질의 pH에 따른 protease의 활성을 알아보기 위하여 pH 6.0 및 pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0으로 반응기질의 pH를 조정하여 실험하였다. 그 결과 네 가지 경우 모두 CPP의 생산수율이 시간이 지남에 따라 증가하여 10시간 반응하였을 때 최대값을 나타냈으며 10시간 이후부터 서서히 감소하였다. pH 7.0일 때의 CPP 생산수율이 가장 많았으나 pH 7.0 ~ pH 9.0의 범위에서는 비슷한 양상을 보였고 pH 6.0에서만 약간 낮은 수치를 보였다(Fig. 5C). 마지막으로 기질에 농도에 따른 CPP 생산수율을 확인하기 위하여 sodium caseinate를 5% 및 10%, 15%, 20%로 하여 실험하였다. 그 결과 15%와 20%의 경우에는 10%보다 낮은 수준이었고, 5%와 10%의 경우 CPP의 생산량에 대한 수율은 비슷한 수준을 나타냄을 확인하였다(Fig. 5D).

고정화 담체의 의한 연속적인 CPP 생산

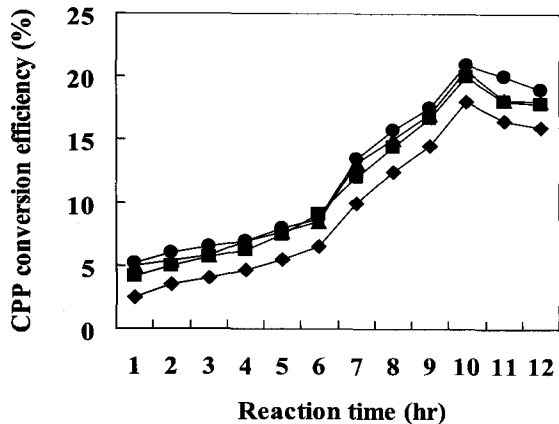
연속적인 CPP생산을 위하여 회분식 반응에 의해 설정된 반응 최적의 조건으로 연속식 반응을 실시하였다. Working volume 200 ml의 반응기에 *Streptococcus faecalis var. liquefaciens* 배양액이 고정화된 bead를 기질량 대비 30%에 해당하는 60 g을 충전하고 반응온도는 50°C로 회분식 반응을 10시간 동안 실시 후, 반응기내로 10% sodium caseinate 용액을 1N HCl 용액을 이용하여 pH 7.0으로 조정하여 20.0 ml/hr의 유속으로 기질을 주입하고 연속적인 반응을 진행하면서 측정된 결과 연속반응을 시작하면서부터 10시간 후 평형상태에 도달하여 반응 10일까지 CPP 생산수율을 20% 수준으로 계속 유지하였으나 고정화 bead의 경도가 약화되는 것을 확인하였다. 따라서 10일 반응 후 4% CaCl₂·2H₂O 용액에서 24시간 동안 경화시켜 다시 사용하였지만 CPP 생산수율은 20% 수준을 유지하여 생산량이 저하되거나 효소의 활성이 약해지지 않았음을 확인할 수 있었다(Fig. 6).



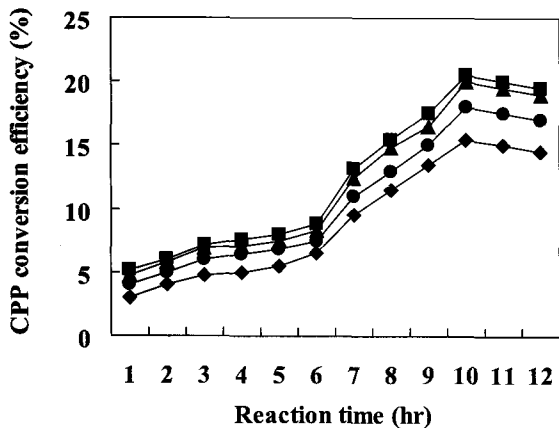
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 5. Effect of bead content (◆: 10%, ■: 20%, ▲: 30%, ●: 40% A), temperature (■: 45°C, ●: 50°C, ▲: 55°C, ◆: 60°C B), pH (◆: pH 6.0, ■: pH7.0, ▲: pH8.0, ●: pH9.0 C), and substrate concentration (▲:5%, ■:10%, ●:15%, ◆: 20% D) on CPP conversion efficiency.

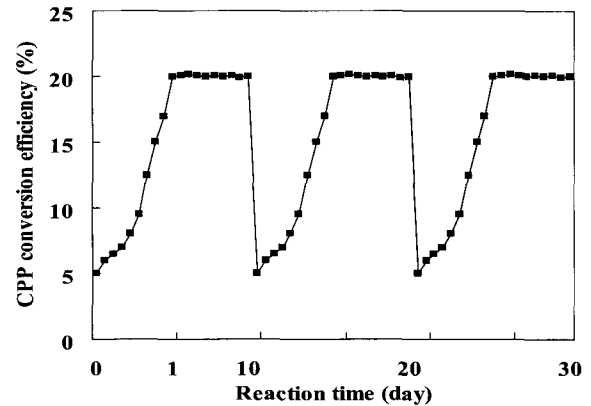


Figure 6. Effect of continuous culture on CPP conversion efficiency ■: CPP conversion efficiency (%).

요약

Streptococcus faecalis var. *liquefaciens*를 calcium alginate gel에 고정화 후 CPP생산 가능성을 실험하였다. 균체를 회수하여 담체에 고정화 하는 방법보다는 배양액 전체를 고정화하는 방법이 보다 높은 생산성으로 CPP를 생산하였다. *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 전세포 고정화 방법에 의한 sodium caseinate로부터의 CPP 생산의 최적조건은 bioreactor 부피대비 bead 사용량이 30%, 반응온도는 50°C, 반응 pH는 7.0, 기질의 농도는 10% 이었다. 또한, 고정화 균체를 이용한 연속적인 생산은 회분식 반응에서 설정된 최적 조건하에서 20% 수준의 CPP를 최소한 1개월 이상 연속적으로 생산할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 BK21에서 시행한 차세대 디지털 생물 신소재 생산공정 인력양성사업팀의 연구비 지원으로 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Armand, C. R. and H. M. Linkswiler (1974), Effect of protein intake on calcium balance of young man given 500 mg calcium dairy, *J. Nutrition*, **104**, 695-699.
- Bickerstaff G. F. (1997), Immobilization of Enzymes and Cells, Human Press., New Jersey.
- Clegg, K. M., G. Smith and A. L. Walker (1974), Production of an enzymatic hydrolysate of casein on a kilogram scale, *J. Food Tech.* **9**, 425-431.
- Dem (1981), Protein hydrolysate, UK Patent 1, 595, 499.
- Im, G. H., B. W. Lee, G. M. Park, S. H. Son, and J. H. Yu (1993), Production of Casein Phosphopeptides by *Streptococcus sp.*, *Kor. J. Appl. Microbiol., Biotechnol.* **21**(5), 468-472.
- Kierstan, M. and C. Bucke (1997), *Biotech. Bioeng.*, **19**, 387-397.
- Kitts, D. D. and Y. V. Yua, Casein phosphopeptides and calcium bioavailability (1992), *Food Sci. Technol.*, **3**, 31-35.
- Krish J. and B. Szajani (1996), *Biotechnol. Lett.*, **18**, 393-402.

9. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
10. Mannheim, A. and M. Cheryan (1990), Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor, *J. Food Sci.*, **55**(2), 381-385.
11. Manohar S. and T. B. Karegoudar (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 785-792.
12. Naito, H., A. Kawakami and T. Imamuta (1972), In vivo formation of phosphopeptide with Ca-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein, *Agricultural and Biological Chem.*, **36**, 409-415.
13. Nilsson K. (1987), *Trends Biotechnol.*, **5**, 73-78.
14. Scopes, R. (1982), Protein purification, Spinger-Verlag, New York, 261-266.
15. Swausgood, H. E. (1985), Characteristics of fluids of animal origin: milk. In: *Food chemistry*. Fennema, O. R. (ed.), Marcel Dekker, Inc, New York, 791-828.
16. Swank R. W. and K. D. Munkres (1971), Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate, *Anal. Biochem.*, **39**, 462-477.
17. Takata L., K. Yamato, T. Tosa, and I. Chibata (1980), *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 30-36.
18. West, D. W (1977), A simple method for the isolation of a phosphopeptide from bovine α 1-Casein, *J. Dairy Research*, **44**, 373-377.
19. Willi Ellenberger and Holger Blum (1981), Method for the hydrolysis of milk protein, US Patent, 4(261), 882.