

파괴분석(Breakthrough behavior) 비교에 의한 난백으로부터 라이소자임 크로마토그래피 분리 최적화

김 원 경 · †정 봉 현

생명공학연구소 생물분리공정 Research Unit
(접수 : 1999. 1. 4., 게재승인 : 1999. 6. 11.)

Optimization of Chromatographic Separation of Lysozyme from Homogenate of Hen Egg White by Comparison of Breakthrough Behavior

Won Kyung Kim and Bong Hyun Chung†

Bioseparation Process R.U., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, Korea
(Received : 1999. 1. 4., Accepted : 1999. 6. 11.)

We have compared the breakthrough behavior of lysozyme contained in fresh hen egg white on various cation exchangers, and the adsorbent, known by the trade name Cellulose C-200 (Amicon), has shown the best performance. The effects of ion strength, pH, and linear flow rate on the breakthrough behavior were examined using the Cellulose C-200 adsorbent. The optimal conductivity, pH and linear flow rate were determined from the breakthrough behavior and found to be 2.75 mS/cm, 7.0, and 0.635 cm/min, respectively.

Key Words : lysozyme, cation exchange chromatography, breakthrough behavior

서 론

라이소자임(lysozyme, mucopolysaccharide N-acetylmuramoylhydrolase)은 1922년 Alexander Fleming이 *Micrococcus lysodeikticus* 같은 세균이나 다른 그람양성세균과 음성세균 등을 용균시키는 특성을 갖는 효소로 처음 보고하였다. 라이소자임은 생리액(physiological fluid)인 눈물, 콧물, 타액, 우유, 혈청 등에 존재하며 papaya latex와 순무(turnip) 같은 식물조직과 난백, 새군내부, 그리고 airborne bacteria가 침투하기 쉬운 눈, 코, 입, 폐 등 모든 기관에 존재한다(1,2). 라이소자임은 20종, 129개의 아미노산 subunit로 구성되어 있고 4개의 이황화결합으로 교차된 단일 폴리펩타이드 사슬의, 등전점이 10.5인 강한 염기성 단백질로 세포벽의 주성분인 당쇄 고분자 결합, 즉 N-acetylmuramic acid의 C₁과 N-acetylglucosamine의 C₄ 사이의 β -glucosidic bond를 가수분해함으로써 용균시키는 작용을 갖는다(3). 분자량은 약 14,600 dalton 이고 흰색의 결정체이며 수용액상에는 잘 용해되나 유기용매에는 불용성이며 특히 수용액상에서 열에 안정하다(4) 라이소자임은 특히 난백에 상대적으로 많이 존재하며 난백 단백질중 분자량이 가장 작은 단백질이고(2,5), 난백내 라이소자임 함량이 높을수록 달걀의 신선도가 장시간 유지되며 foam

stability와 부화능이 증가된다(6,7). 난백 유래의 라이소자임은 X-ray diffraction technique으로 3차 구조가 밝혀진 첫번째 효소로 광범위한 연구가 이루어져 아미노산 배열이 결정되어졌고 유전자 조작에 의한 대량생산도 시도되고 있다(8).

항세균효과(antibacterial effect)와 항염증작용, 항출혈작용 등의 특성을 지닌 라이소자임은 소염효소제로 사용되거나(9) 항생제의 potentiator로서 궤양, 감염, 상처의 치료에 적용된다. 암으로 고생하는 환자에게 투여될 때 뛰어난 진통 효과를 가지고 있으며 antitumor와 ionizing radiation에 의한 백혈구 감소증의 치료요법과 예방에 사용되어 진다(2). 이외에 라이소자임은 acidic virus와 complex를 형성하여 virus를 불활성화시키기도 한다(1,2). 또한, 라이소자임은 식품 보존제로도 사용되며 통조림 제조시 멸균온도를 감소시킬수 있고(10), 소시지, 치즈, 가공 어육류 등에 첨가되기도 한다. 특히 반고형 치즈의 butyric acid 생산균의 번식을 억제하여 그 특유의 악취를 막는데 사용되어 지난 10여 년간 급격한 매출신장을 보였다(11). 이외에도 펩신에 의한 우유 단백질의 분해를 촉진시키는 기능을 갖고 있어 유아용 분유에 배합되기도 한다(5,7).

이와 같이 의약품과 식품산업 등에서 라이소자임 응용 범위의 확대에 인하여 높은 활성과 순도를 갖는 라이소자임 대량생산을 위한 효과적인 분리공정 개발이 요구되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 난백 단백질로부터 라이소자임 분리를 위한 크로마토그래피 최적화 연구를 수행하였다. Fresh한 난백을 feed로 하여 크로마토그래피 컬럼상에서 라이소자임의 breakthrough behavior 비교 연구를 통하여 최적화 조건을 확립하였고 난백으로부터 라이소자임의 분리정제를 수행하였다.

† Corresponding Author : Bioreparation Process Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, Korea
Tel : 042-860-4442 Fax : 042-860-4594
e-mail : chungbh@krbb4680.krbb.re.kr

재료 및 방법

난백의 전처리

고점성의 특성을 지닌 난백은 크로마토그래피의 수행시 그 체를 feed로서 사용할 수 없어 희석과 원심분리의 전처리가 필요하다. 일반 시장에서 구입한 계란을 난백과 난황으로 분리한 후 난백만을 모아 완충용액(pH7, 26.6 mM sodium phosphate)으로 4배 희석한 후 homogenizer(Diax 600, Heidolph, Germany)를 이용하여 회전수는 9,500 rpm, 40분간 균질화 한다. 이때 형성된 거품이 사라질 때까지 정치시킨 다음 원심 분리하여 불용성의 물질은 제거하고 상등액을 취하여 feed로 사용하였다

Breakthrough behavior 실험

사용한 컬럼은 10×120 mm glass column (Amicon Co., USA)을 사용하여 양이온교환수지를 4 ml 씩 충전하고(Table 1), pH 7, 20 mM sodium phosphate로 컬럼을 평형화하였다. 양이온교환수지로서 Cellufine C-200 (Amicon, USA), CM-Cellthru Big Bead (Sterogene, USA), SP-Cellthru Big Bead (Sterogene, USA), CM-ThruPut (Sterogene, USA), SP-ThruPut (Sterogene, USA), Bio-Rex 70 (Bio-Rad, USA), Amberlite IRC-50 (Fluka, USA), Amberlite 200 (Fluka, USA), CM Sephadex C-50 (Pharmacia, Sweden) 등을 구입하여 (Table 1), 난백 원액을 feed로 하여 컬럼 출구에서 라이소자임의 활성분석을 통한 breakthrough curve에 의해 라이소자임 흡착능을 비교하였다.

라이소자임 활성 측정 및 단백질 정량

Micrococcus lysodeikticus cell suspension을 기질로 하여 30°C에서 반응시키며 spectrophotometer를 이용 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 1분간 OD가 0.001이 감소하는 것을 1 unit으로 정의하였다. 85 mg 동결건조 *Micrococcus lysodeikticus*(M-3770, Sigma)를 pH 6.24, 66 mM potassium phosphate buffer 40 mL에 녹인 용액을 반응 기질로 사용하였다. 단백질 정량을 위해서는 Bio-Rad 사의 protein assay kit (Bio-Rad Protein Assay, 500-0006)를 사용하였다.

SDS-PAGE

SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemli 방법(12)을 기초로 하였다. 0.1-5.0 mg protein/mL 농도의 샘플을 pH 6.24, 66 mM potassium phosphate buffer에서 준비하여 4 × lysis buffer(Tris 1.2 g, conc. HCl 0.7 mL, SDS 0.8 g, glycerol 8 mL and 2-mercaptoethanol 4 mL in 20 mL)와 혼합하여 100°C에서 3분간 열을 가한 후 SDS-PAGE에 loading하였다. Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 분리정제된 라이소자임의 순도를 확인하였다

결과 및 고찰

양이온교환수지들의 파과분석(breakthrough behavior)

난백 라이소자임은 pI가 10.5인 염기성 단백질로서 크로마토그래피 분리를 위해서는 양이온 교환수지를 사용하는 것이 매우 효과적이다 따라서 본 연구에서는 현재 상업적으로 판매되고 있는 다양한 양이온 교환수지들의 라이소자임 흡착능 비교분석을 위하여 breakthrough behavior 분석방법을 사용하였다(13). 본 방법은 샘플이 포함된 feed 용액을 크로마토그래피 컬럼에 연속적으로 흘려보내면서 시간 또는 effluent 체적에 따른 컬럼 출구에서의 샘플 농도 profile에 의해 컬럼 크로마토그래피의 성능을 분석하는 것으로서 크로마토그래피 최적 조건을 결정하는 매우 효과적인 방법 중의 하나이다. 본 연구에서는 약 양이온 교환수지로서 Cellufine C-200, CM-Cellthru Big Bead, CM-ThruPut, Bio-Rex 70, Amberlite IRC-50, Amberlite 200, 강 양이온 교환수지로서 SP-Cellthru Big Bead, SP-ThruPut 등을 10 × 120 mm 컬럼에 충전한 후 균질화한 난백 원액 feed로 하여 breakthrough profile들을 비교하였다(Figure 1). 실험 결과 약 양이온 교환수지인 Cellufine C-200이 dynamic capacity가 가장 큰 값을 보여 라이소자임 분리에 가장 적합한 것으로 나타났다 현재까지 정제된 라이소자임을 이용하여 크로마토그래피 수지의 흡착능을 연구한 예는 많이 보고된 바 있으나(14,15) 난백을 feed로하여 크로마토그래피 수지의 라이소자임 흡착능을 보고한 예는 거의 없다. 따라서, 본 실험결과는 실용적인 측면에서 매우 유용한 자료가 될 수 있을 것이다.

Table 1. Properties of cation exchange chromatography resins.

	Matrix	Functional group	Total capacity	Particle size (μm)
Cellufine C-200	cellulose	carboxymethyl	220 $\mu\text{m/ml}$	50-125
CM-Cellthru BigBead	agarose	carboxymethyl	40 mg BSA/ml	300-500
SP-Cellthru BigBead	agarose	sulphopropyl	33 mg BSA/ml	300-500
CM-ThruPut	agarose	carboxymethyl	90 mg BSA/ml	100-200
SP-ThruPut	agarose	sulphopropyl	95 mg BSA/ml	100-200
Bio-Rex 70	acrylic type	carboxylic acid	10.2 meq ion/dry g	150-300
Amberlite IRC-50	methacrylic acid-DVB	carboxylic acid	10.3 meq ion/dry g	330-500
Amberlite 200	styrene-DVB	sulfonic acid	4.3 meq ion/dry g	400-500
CM-Sephadex C-50	sephadex	carboxymethyl	170 $\mu\text{mol ion/ml}$	-

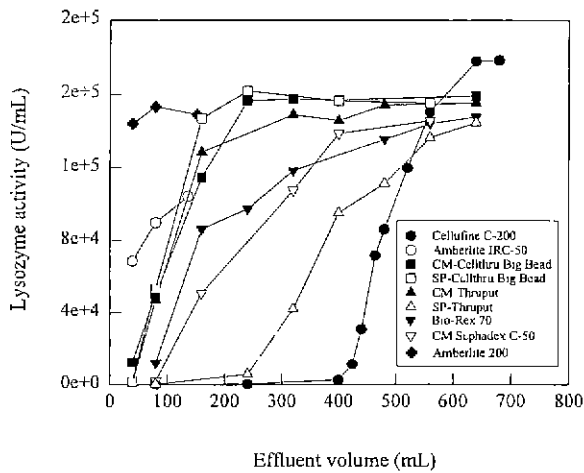


Figure 1. Breakthrough curves of lysozyme on various cation exchangers.

Cellufine C-200 수지에서 라이소자임의 breakthrough behavior

컬럼 크로마토그래피에서 breakthrough profile에 영향을 미치는 주요 인자들로는 feed의 pH, 이온강도(ion strength), 선속도(linear flow rate) 등이 있다(16). 따라서 다양한 크로마토그래피 수지 중 가장 우수한 performance를 보인 Cellufine C-200 수지를 컬럼에 충전한 후 위 주요 인자들의 최적화 실험을 수행하였다.

난백은 점도와 초기 이온강도가 매우 높아 컬럼 크로마토그래피 전에 feed를 희석하여 점도와 이온강도를 낮추는 전처리가 필요하다. 따라서 난백의 희석에 따른 breakthrough behavior의 영향을 살펴 보았다(Figure 2). 희석은 pH 8인 sodium phosphate buffer를 이용하여 최종 feed내 sodium phosphate buffer의 농도가 20 mM 이 되도록 난백을 2, 4, 6배 희석하였으며 희석 후 conductivity는 3.74, 2.75, 2.67 mS/cm로 각각 나타났다 크로마토그래피 조업시 feed용액은 선속도 0.635 cm/min로 흘러 보내주었다. Breakthrough behavior을 비교한 결과 희석 배수가 클수록 이온강도가 감소됨으로써 라이소자임의 dynamic capacity가 증가하였으나 조업시간을 고려하여 4배 희석 조건을 최적조건으로 선정하였다.

컬럼을 pH 6, 7, 8의 20 mM sodium phosphate buffer로 평형화한 후, 동일한 buffer를 사용 4배 희석한 난백 용액의 pH도 여기에 맞춘 후 breakthrough behavior를 살펴 보았다(Figure 3). Feed 용액의 pH가 낮을수록 dynamic capacity가 증가하였는 데, 이것은 pH가 낮을수록 강 염기성 단백질인 라이소자임의 전하가 상대적으로 강한 양전하를 띄게 되어 수지의 counterion ion과의 교환능이 커져 상대적으로 많은 양의 라이소자임이 흡착되는 것으로 보여진다. 그러나 pH 6 이하인 경우 pI 값이 그 이하인 라이소자임 이외의 염기성 단백질의 흡착 가능으로 pH 7에서의 운전 조건을 최적 조건으로 결정하였다(Table 2).

크로마토그래피 컬럼 조업에서 선속도(linear velocity)는 컬럼 효율(column efficiency)을 결정하는 가장 중요한 조업 변수이므로 선속도에 대한 breakthrough behavior의 영향을 살펴 보았다(Figure 4) 0.38, 0.635, 1.02, 1.27 cm/min의 선속도에서

Table 2. Composition of egg-white(4)

Protein	pI	Molecular weight	Percentage composition
ovomucoid 1	3.9-4.3	35,000	11-13
ovomucoid 2	3.9-4.3	28,000	0.3
ovalbumin A1	4.75	45,000	3.2
A2	4.65		10.8
A3	4.58		50.5
ovoglobulins	5.5-5.8	30-45,000	1-1.5
conalbumin	6.5-6.8	80,000	12.4
	6.5-6.8		47
avidin	9.5-10	53,000	0.3
lysozyme	10.7-11.3	14,600	0.5-3.5
globulins			2-3.6

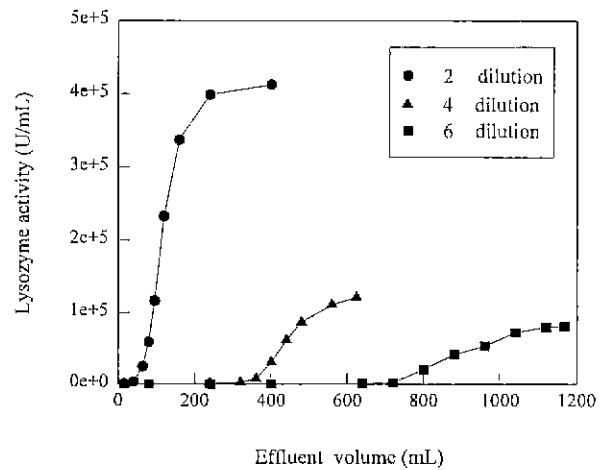


Figure 2. Breakthrough curves of lysozyme at various dilution ratios.

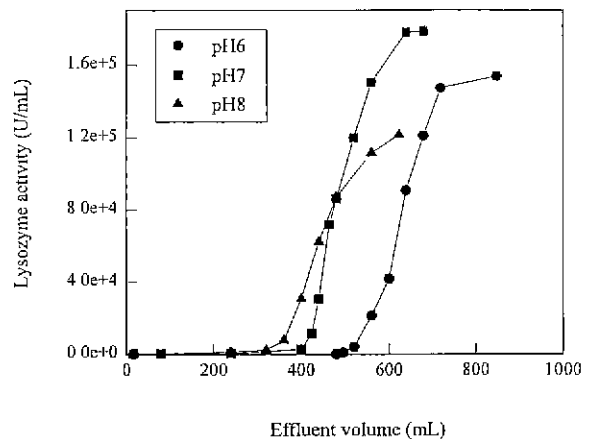


Figure 3. Breakthrough curves of lysozyme at various feed pH values.

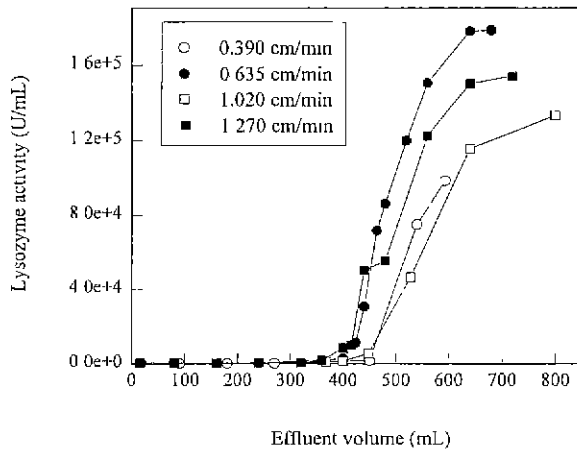


Figure 4 Breakthrough curves of lysozyme at various linear velocities of mobile phase.

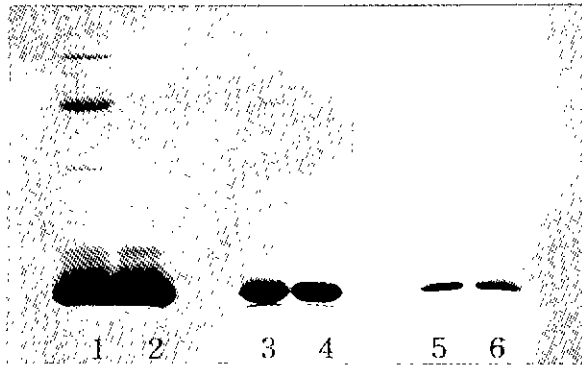


Figure 5 Protein analysis on SDS-PAGE Odd-numbered lanes : Sigma lysozyme. Even-numbered lanes : lysozyme purified in this study. Lanes 1, 2 : 5 mg/L Lanes 3, 4 : 1 mg/L. Lanes 5, 6 : 0.1 mg/L

실험한 결과 본 선속도 범위에서는 비슷한 양상의 breakthrough profile을 보여 주었다 그러나 1.02 cm/min 이상의 선속도에서는 pressure drop으로 인하여 컬럼 조업상에 문제점이 발생되어, 0.635 cm/min의 선속도를 라이소자임의 분리 조건으로 설정하였다

난백으로부터 라이소자임 분리정제

Breakthrough behavior 실험을 통해 얻어진 최적 조건을 이용하여 prep 규모 컬럼에서 라이소자임 분리정제를 수행하였다. 32 × 250 mm 컬럼(Amicon, USA)에 100 mL Cellufine C-200 수지를 충전한 후 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7)로 column을 세척하고, 4배 희석된 난백을 선속도 0.635 cm/min로 loading하여 양이온 교환수지에 라이소자임을 흡착시킨 후 pH 7 sodium phosphate buffer에 0.5 M NaCl을 첨가하여 라이소자임을 용출시켰다. 용출된 라이소자임 분획을 분자량 10,000 Da의 한외여과(ultrafiltration)막을 이용 4배 농축한 후 3 M의 NaCl을 첨가 라이소자임을 침전시켰다 침전된 라이소자임을 회수하여

pH 4, 100 mM sodium acetate buffer로 투석한 후 동결 건조하여 라이소자임분말을 얻었다 본 연구에서 얻어진 라이소자임과 Sigma로부터 구입한 라이소자임(Sigma, L-6876)의 specific activity와 순도를 비교한 결과 본 연구에서 정제된 라이소자임의 specific activity는 138,850 U/mg, Sigma 라이소자임의 경우는 144,850 U/mg로 거의 유사한 specific activity를 보였다. SDS-PAGE로 라이소자임의 순도를 분석한 결과(Figure 5), 낮은 농도에서는 impurity 단백질들이 거의 발견되지 않았으나 1 mg/mL 이상의 농도에서는 SDS-PAGE상에 impurity 단백질 band가 나타나기 시작하였으며, 5 mg/mL 농도에서는 impurity 단백질 band들이 확실하게 나타났다 주 impurity 단백질은 난백 단백질의 약 65%를 차지하는 분자량 45,000 Da의 ovalbumin으로 추정된다. 본 연구에서 정제된 라이소자임이 Sigma 라이소자임 보다 impurity 단백질을 적게 포함하고 있는 것으로 나타났으며 순도는 95 % 이상이었다

요 약

본 연구에서는 난백에 포함된 라이소자임의 컬럼 크로마토그래피에서의 breakthrough behavior 실험을 통해 최적 크로마토그래피 분리조건을 결정하였다 다양한 양이온 교환수지의 라이소자임 breakthrough behavior를 비교한 결과 Cellufine C-200(Amicon, USA)이 라이소자임 흡착에 가장 우수한 성능을 보였다 Cellufine C-200 수지에서 이온강도, pH, 선속도 등이 난백 라이소자임의 breakthrough behavior에 미치는 영향을 비교한 결과 conductivity 275 mS/cm, pH 7, 선속도 0.635 cm/min의 최적 조건을 얻었다 본 최적조건에서 prep 규모 컬럼 크로마토그래피를 이용 난백으로부터 라이소자임을 분리하였다. 정제된 라이소자임과 Sigma 라이소자임의 specific activity는 비슷하였으며 SDS-PAGE 분석 결과 본 연구에서 정제된 라이소자임이 Sigma 라이소자임보다 impurity 단백질들을 적게 포함하고 있음을 확인하였다

참 고 문 헌

- Gordon, A W, H Ward, and H L. Fevold (1945), Isolation of Lysozyme from Egg White, *J Biol. Chem.*, 157, 43-58
- Ghielmetti, G. and C. Trinchera (1970), Process for the Production of Lysozyme, US Pat. No 3515643.
- Safarik, I. and M. Safarikova (1993), Batch Isolation of Hen Egg Lysozyme with Magnetic Chitin, *J. Biochem. Biophys Methods*, 27, 327-330
- Ming, F. and J A. Howell (1991), Resolution and Productivity of Conalbumin and Lysozyme from Fresh Egg-White Loaded at High Flow on a 250-mm Length CM-MVFM Column, *Bioseparation*, 2, 289-295
- Chartres, A. L., J. L. Pace, and M T Bethune (1988), Process for Obtaining Lysozyme by a Microfiltration from a Starting Material Based on White of Egg, US Pat. No. 4721674.
- Awade, A C., S Morcau, D Molle, G. Brule, and J L

- Maubois(1994), Two-Step Chromatographic Procedure for the Purification of Hen Egg White Ovomucin, Lysozyme, Ovotransferrin and Ovalbumin and Characterization of Purified Proteins, *J. Chromatogr. A*, **677**, 279-288
- 7 Gray, L W and K Manfred (1977), Deaminated Chitin Affinity Chromatography. A Method for the Isolation, Purification and concentration of Lysozyme, *J Food Science*, **42**, 1084-1087
8. Archer, D. B., D. J. Jeenes, D. A. Mackenzie, and G. Brightwell(1990), Hen Egg White Lysozyme Expressed in, and Secreted from, *Aspergillus niger* Is Correctly Processed and Folded, *Bio/Technol.*, **8**, 741-745.
- 9 Muzzarelli, R A. G Barontini, and R. Rocchetti (1978), Isolation of Lysozyme on Chitosan, *Biotech. Bioeng.*, **20**, 87-94
- 10 Chiang, B. H., C. K. Su, G. J. Tsai, and G. T. Tsao (1993), Egg White Lysozyme Purification by Ultrafiltration and Affinity Chromatography, *J. Food Sci.*, **58**, 303-306.
11. Matsuoka, Y (1971). Egg White Lysozyme, *J Jap Soc Food Nutr.*, **24**. 311
12. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of Structural Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*. **227**. 680-685.
13. Chase, H. A. (1984), Prediction of the Performance of Preparative Affinity Chromatography, *J Chromatogr.*, **297**, 179-202.
14. Liu, H. C. and J. R. Fried (1994), Breakthrough of Lysozyme through an Affinity Membrane of Cellulose-Cibacron Blue, *AIChE J.*, **40**, 40-49.
15. Weaver, L. E and G Carta (1996), Protein Adsorption on Cation Exchangers: Comparison of Macroporous and Gel-Composite Media, *Biotechnol Prog*, **12**, 342-355.
16. Jagschies, G. (1988), Process-Scale Chromatography, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol. B3, 1-44.