

다중 이온교환크로마토그래피를 이용한 계란난백에서 리소зим의 분리

허운석 · 김형원 · † 김인호
충남대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2003. 2. 24., 게재승인 : 2003. 4. 29.)

Purification of Lysozyme from Egg White by Multicycle Ion Exchange Chromatography

Yun-Suk Huh, Hyoung-Won Kim, and In-Ho Kim†
Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Received : 2003. 2. 24., Accepted : 2003. 4. 29.)

Multi-cycle chromatographic separation of lysozyme from egg white was investigated. Multi-cycle chromatography was performed by repeated cycling(one cycle: resin equilibration, sample loading, washing, elution). Two types of cation exchange resins, Cellufine CM C-200 and Bio-rex 70, were used to determine the optimum condition for the separation of lysozyme by multi-cycle chromatography. The resin was equilibrated in 20 mM Na-phosphate buffer(pH 7.0). Chromatograms of UV absorbance levels of every cycle were compared to confirm the eluting ability of lysozyme in the two types of gel. Collected samples from eluting regions in every cycle were assayed by 15% SDS-PAGE.

Key Words : Chromatography, egg white, multi-cycle, lysozyme

서 론

생물공정의 분리 및 정제 기술은 바이오 의약품, 생물화학 공업의 다양한 효소, 식품생명공학의 기능성 식품소재 및 각종 첨가물, 농업생명공학의 농약 및 동물 백신류 등을 제조 하는데 매우 중요하다. 예를 들면, 각종 생물반응공정에서 생산된 생산물들은 다양한 화합물의 혼합물들로 이루어져 있기 때문에 반드시 유용성분의 분리 및 정제 공정이 뒤따라야 한다(1, 2). 더욱이 바이오 의약품들의 경우에는 반응 생성물 중 필요한 대개 성분의 양이 매우 적고, 이들 성분들과 기타 성분들 간의 화학적 친화력의 차이가 크지 않아 고도의 분리 기술이 요구된다. 그러므로 이와 같은 물질들의 분리 및 정제를 위해서는 컬럼 기술로 대변되는 크로마토그래피가 많이 사용된다(3-5).

크로마토그래피는 주로 실험실에서 소량성분의 정제에 이용되었던 기술이었는데, 이 기술 특유의 우수한 선택성과 고부가가치 생명공학 제품의 대량생산 필요성으로 인하여 최근 들어 이 기술의 확대적용이 시도되고 있다(2, 3, 6). 크로마토그래피는 컬럼 충전물인 고정상과 분리하고자 하는 성분들을

포함하고 있는 유체 유동상 간의 상호 작용 기작을 이용한 기술로서, 적용되는 상호작용 기작에 따라서 다양한 기술들이 보고 되고 있다. 이중 대표적인 기술로는 모세관 액체 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 초입계 크로마토그래피 등이 있다.

본 연구에서 이용한 재료로 대표적인 생명공학 제품인 lysozyme 효소를 사용하였다. Lysozyme은 1922년 Alexander Fleming(7)에 의해 최초로 발견된 용균효소로서, *Micrococcus lysodeikticus* 같은 세균이나 다른 그람 양성 세균과 음성 세균 등을 용균 시키는 특성을 갖는 효소로 처음 보고되었다(8, 9). Lysozyme은 용균작용 이외에도 virus의 불활성화와 단백질의 소화 흡수촉진 등의 효과가 있어, 식품의 보존료와 의약품원료 및 유아식의 영양 강화 부문에 사용하고 있다(10, 11). 이상과 같이 유용한 천연물질인 lysozyme은 동물의 조직, 체액, 식물 및 미생물 등에 널리 분포되어 있지만(12, 13), 난백 중에 함량이 약 0.3%로 가장 높다(14). 난백은 다른 lysozyme 함유물질에 비하여 생산량이 많으며, 추출조작이 비교적 용이하기 때문에 lysozyme 추출 원료로 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 난백에서 lysozyme의 추출은 직접결정화법(15), 친화성 크로마토그래피법(16), 이온교환 크로마토그래피법(13, 17) 및 한외여과법 등이 시도 되어왔다. 이중에서 이온교환 크로마토그래피법은 수율 및 순도가 높아 산업적으로 이용되고 있다.

본 연구에서는 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 난백

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel: 82-42-821-5685,
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

에서 lysozyme의 분리, 정제 및 수지의 작동 용이성을 확인 함을 통해 다중공정을 개발하는데 목적이 있다. 실험에 사용 된 양이온 교환 수지로 Cellufine CM C-200(5)과 Bio-rex 70 겔을 선택하여 수행하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 재료는 일반 시장에서 구입한 달걀로 난백 과 난황으로 분리한 후 난백만을 모아 증류수로 10배 희석하 여, 원심분리기를 8,000 rpm, 30분간 작동하여 불용성의 물질 은 제거하고 상등액을 취하여 주입 시료로 사용하였다.

분석방법

이온교환 크로마토그래피로 분취한 샘플은 전기영동으로 분석을 하였으며, 단백질 분석조건은 15% SDS-PAGE를 이 용하여 확인하였다. Coomassie brilliant blue R-250으로 염색 하였다.

크로마토그래피

실험에 사용한 칼럼으로 유리칼럼(25 mm ID × 330 mm L, Spectra/chrom Co. USA)을 사용하였고 양이온교환수지로는 Cellufine CM C-200겔과 Bio-rex 70겔을 이용하였다. Cellufine겔의 작용기는 carboxymethyl group이고, Bio-rex겔의 작용기는 carboxylic acid이다. 겔의 counter ion은 모두 sodium을 사용하였다. 완충용액은 20 mM Na-phosphate(pH 7.0)을 평형 용액으로 하고 여기에 0.5, 1.0 M NaCl을 첨가 하여 용리 용액으로 사용하였다.

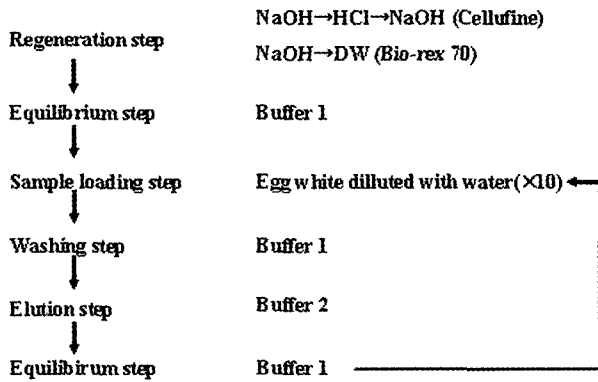


Figure 1. Flow chart of multi-cycle column chromatography; buffer 1 : 20 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0), buffer 2 : 0.5 M(Bio-rex) or 1.0 M(Cellufine) NaCl.

Fig. 1의 실험 절차에 따라 양이온 교환 크로마토그래피는 평형, 시료 주입, 세척, 용리를 반복 정제 1주기로 lysozyme 정제를 수행함으로써 수지의 적합성을 실험하였다. 실험조건 은 Table 1과 같다. 먼 실험에 사용하려는 겔을 컬럼에 충전 시킨 후 이용될 완충용액으로 평형화를 시킨다. 겔의 평형화 가 이루어지면 펌프에 의해 시료 및 모든 용매가 컬럼에 들 어가게 되며 주입된 시료는 용출 용매에 의해 이온교환 겔

에서 떨어져 단백질의 분리가 이루어지게 된다. 용출 용액은 UV 검출기를 지나 분취수집기에서 분취한다. 이 때 UV 검 출기에서는 흡광도(254 nm)를 측정하게 되며 측정된 흡광도 는 digital multimeter(Protex 506)에 의해 전기적인 신호로 바 꾸어 컴퓨터에 저장된다. 사용한 완충용액은 20 mM Na-phosphate (pH 7.0)로서 등전점이 10.5인 lysozyme은 양 이온화되어 양이온교환 겔에 쉽게 결합된다. Lysozyme을 비 롯하여 결합된 단백질은 NaCl 용출용액에 의해 용출되며 흡 광도의 값이 0에 가까워지면 NaCl에 의해 용출이 끝난 것 이며, 이때 겔의 재생을 위해 겔의 종류에 따라 다른 재생단 계를 거치며 다시 정제공정을 반복하게 된다. 용출유속은 1.5 ml/min로 하였으며 분취들은 15% SDS-PAGE를 이용하여 lysozyme의 존재를 확인하였다.

Table 1. Experimental conditions of column chromatography

Resin bed volume	12.3 ml
Flow rate and time	
equilibration	4.5 ml/min for 15 min
sample loading	1.5 ml/min for 50 min
washing	4.5 ml/min for 15 min
elution	1.5 ml/min for 30 min
Equilibration and washing buffer	20 mM Na-phosphate buffer (pH 7.0)
Elution buffer	20 mM Na-phosphate buffer with 1.0 M (0.5) NaCl (Bio-rex 70 gel)

결과 및 고찰

Cellufine CM C-200겔과 Bio-rex 70겔을 이용하여 난백에 서 lysozyme을 분리한 다중 이온교환 크로마토그래피의 결과 를 각 주기 별로 크로마토그램을 나타내어 보았고, 또한 lysozyme 용출 분획을 15% SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 먼지, Cellufine 겔을 이용하여 실험한 경우의 크로마토그램과 단백질 분석결과를 고찰하겠다.

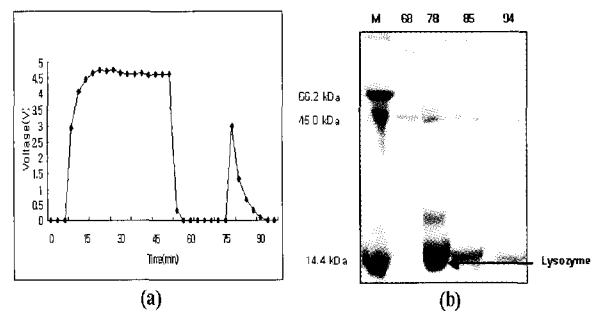


Figure 2. (a) First cycle chromatogram of the CM C-200 gel, (b) 15% SDS-PAGE of elution fractions in the first cycle by using Cellufine gel.

Fig. 2는 Cellufine CM C-200겔을 이용하여 1 주기를 실험 한 결과를 보여주고 있다. 샘플주입 후 시료 단백질이 수지 의 작용기에 빠르게 흡착되며 breakthrough curve를 보이고 있으며, 용출 용액에 의해 겔에 흡착된 단백질이 단일 peak 로 분리되어 나옴을 알 수 있었다. 용출 peak를 SDS-PAGE 로 분석한 결과 높은 농도의 lysozyme과 미량의 ovalbumin이

정제되어 나옴을 확인할 수 있었다. 2, 3, 4 주기에서도 1 주기와 비슷한 경향을 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

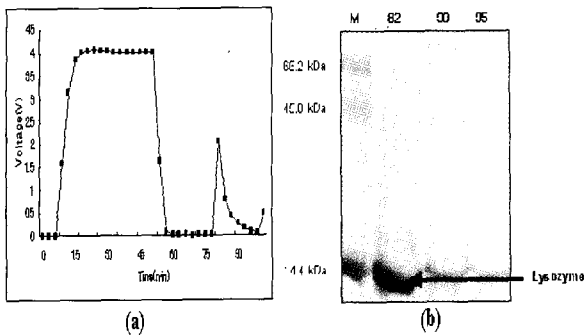


Figure 3. (a) Fifth cycle chromatogram of the CM C-200 gel, (b) 15% SDS-PAGE of elution fractions in the fifth cycle by using Cellufine gel.

Fig. 3은 5 주기의 크로마토그램을 보여주고 있으며, 용출이 끝난 후 NaOH로 washing하는 과정에서 다시 peak가 약간 올라가고 있음을 확인할 수 있는데 이는 SDS-PAGE상에서는 확인되지 않았지만 단백질이 용출된 후 겔에 남아있던 저분자 오염물질이 용출되고 있는 것으로 생각된다. 또한 용출 peak부분의 분획을 SDS-PAGE에서 분석한 결과 단백질이 잘 용출되고 있음을 알 수 있었으나 용출 단백질의 농도가 점차 낮아지고 있음을 볼 수 있다. 6주기의 실험은 샘플을 주입하는 과정에서 겔에 기포가 들어가며 금이 갔기 때문에 실험결과에서 제외시켰다.

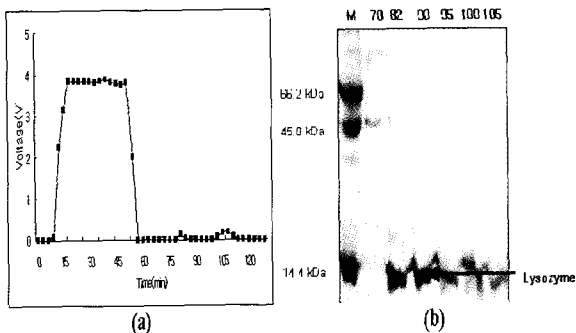


Figure 4. (a) Seventh cycle chromatogram of the CM C-200 gel, (b) 15% SDS-PAGE of elution fractions in the seventh cycle by using Cellufine gel.

Fig. 4는 7주기를 수행한 크로마토그램을 보여 주고 있으며, 샘플주입 후 breakthrough curve는 안정되게 나타내고 있으나, 용출 영역에서 아주 낮은 voltage값을 보이며 용출 peak가 아주 작게 나타나고 있음을 볼 수 있다. 또한 겔의 NaOH washing단계에서 비교적 높은 peak를 보이고 있는데, 이는 색을 가진 저분자 오염물질들과 용출용액에 의해 탈착되지 않고 겔에 강하게 결합되어있는 lysozyme이 함께 용출되고 있음을 SDS-PAGE를 통해 확인할 수 있었다. 8 주기에 서도 7 주기와 비슷한 경향을 보이고 있음을 확인할 수 있었고, 또한 샘플주입 후 breakthrough curve는 안정되게 나타나지만 용출 peak가 작게 나타나며 단백질 정제가 효과적이지 않은 이유는 겔의 흡착과 분리 능력이 저하되기 때문으로 생

각된다.

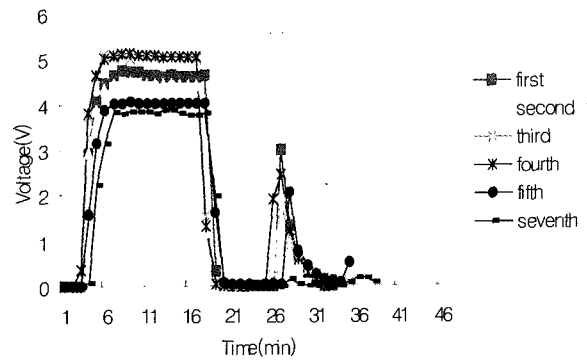


Figure 5. Multi-cycle chromatogram of the CM C-200 gel according to cycle's increase.

Fig. 5의 각 주기에 대한 크로마토그램의 변화 경향을 살펴 볼 때, 주기가 진행될수록 샘플 주입 후 breakthrough curve의 voltage값이 계속해서 낮아진다. 샘플주입 후 washing단계에서 주기가 진행될수록 경사가 완만해지며, 그 이유는 난백에 있는 여러 불순물질의 단백질들이 겔의 달라붙어 용출되지 않거나 점차 늦게 떨어지기 때문이다. 용출 영역에서도 lysozyme이 용출되는 최대 peak의 용출 시간이 주기의 진행에 따라 늦어지고 있음을 알 수 있으며, 5 주기부터는 NaOH로 재생하는 구간에서도 peak를 보이는데, 이는 앞에서 언급했듯이 색을 가진 저분자물질과 단백질들이 겔에 붙어있다 떨어져 나오기 때문이다. 또한 7 주기부터는 용출영역의 peak voltage값이 아주 낮은 값을 보이고 있으며, NaOH로 재하는 단계의 peak voltage값도 낮은 값을 보임을 알 수 있다. 이는 겔이 더 이상 lysozyme을 선택적으로 흡착하는 능력을 상실한 것으로 볼 수 있으며 겔에 붙어있던 lysozyme이 주기가 진행될수록 보다 더 강하게 붙어있어 lysozyme이 용출용액에 의해 늦게 용출되거나 강한 NaOH 재생용액에서 용출되기 때문이다. 따라서 Cellufine CM-C 200겔에서 5 주기까지 다중공정을 조업하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

Lysozyme 분리를 위한 다중 이온교환크로마토그래피 공정에 적용한 또 다른 겔로 Bio-rex 70 겔을 선택하였다. Fig. 6의 크로마토그램은 Bio-rex 70겔을 이용한 1 주기 실험 결과를 보여주고 있다. 샘플 주입 후 breakthrough curve를 Cellufine겔과 비슷하게 보이고 있으나 용출 peak의 voltage값은 5까지 올라감을 볼 수 있었다. 이는 Bio-rex 70겔이 lysozyme을 선택적으로 흡착하지 않고 여러 단백질을 비선택적으로 강하게 결합하고 있다가 용출용액 주입 시에 단백질을 선택성 없이 용출함을 의미하며 이를 전기영동으로 확인하였다. 2 주기의 실험에서는 겔에 흡착된 단백질을 용출용액으로 용출하는 과정에서 기포가 겔에 들어가며 용출용액이 칸럼의 한쪽 부분으로 치우쳐 흐르며 단백질의 용출 peak가 단일 peak로 나타나지 않음을 알 수 있었고, 따라서 2 주기의 실험은 실험결과에서 제외시켰다. 3, 4 주기의 실험은 1 주기와 비슷한 경향을 보였다.

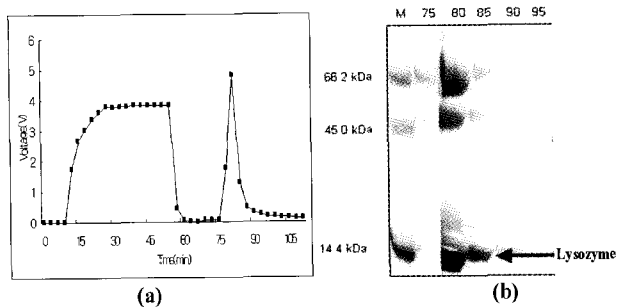


Figure 6. (a) First cycle chromatogram of the Bio-rex 70 gel, (b) 15% SDS-PAGE elution fractions in the first cycle by using Bio-rex 70 gel.

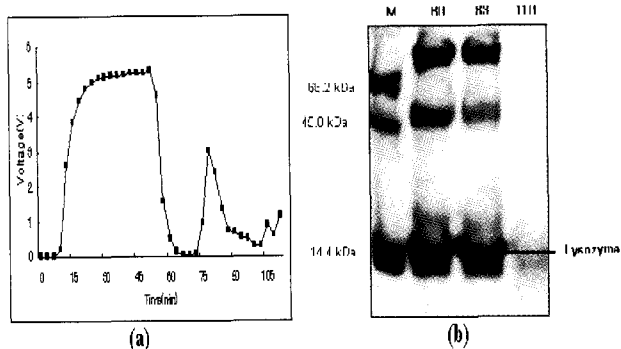


Figure 7. (a) Fifth cycle chromatogram of the Bio-rex 70 gel, (b) 15% SDS-PAGE elution fractions in the fifth cycle by using Bio-rex 70 gel.

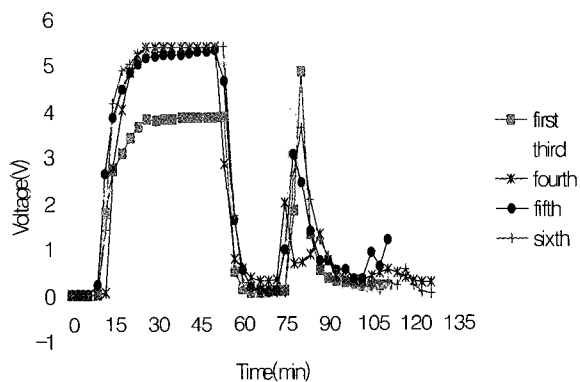


Figure 8. Multi-cycle chromatogram of the Bio-rex 70 gel according to cycle's increase.

Fig. 7의 5 주기 크로마토그램에서는 샘플 주입 후 breakthrough curve를 안정되게 보이고 있으며 용출부분의 peak도 단일 peak로 나타나고 있음을 알 수 있었다. 그러나 용출 peak의 뒷부분에서 약간 끌리는 현상과 NaOH로 재생하는 단계에서도 peak가 나옴을 볼 수 있는데 이는 앞에서 언급했던 Cellufine겔과 동일하게 색깔을 띤 저분자 물질이 나오며, 겔에 약간의 기포들이 남아있기 때문이다. 6 주기 실험에서는 5 주기와 비슷한 경향을 보였다. Fig. 8은 Bio-rex 70겔의 크로마토그램을 주기의 증가에 따라 보여주고 있으며, 시료주입 후 breakthrough curve는 비교적 안정되게 보이

고 있지만 용출영역의 peak뿐만 아니라 주기가 진행될수록 재생 단계에서 peak가 나타남을 알 수 있다. 이는 겔이 여러 단백질들과 강하게 결합하고 있으므로 용출용액에 의해 약하게 결합된 단백질이 먼저 용출되어 나오고 그 후에 NaOH로 재생하는 과정에서 강하게 결합된 단백질들과 발색단을 가지고 있는 오염물질들이 함께 용출되어 나오면서 재생단계에서도 여러 peak가 나타나는 것이다. 따라서 Bio-rex 70 겔을 이용하여 순수한 lysozyme을 정제하기 위해서는 용출용액의 농도구배를 주어서 이온강도에 따라 결합력이 약한 오염단백질을 먼저 저농도의 용출용액에서 용출시킨 후, 고농도의 용출용액에서 lysozyme단백질을 용출시킨다면 보다 lysozyme을 효과적으로 정제할 수 있음을 시사한다. 또한 Bio-rex 70겔은 Cellufine겔과 달리 6 주기를 수행한 후에도 겔의 흡착능력이 상실되지 않고 단백질과 효과적으로 결합함을 확인 할 수 있었다. 결론적으로 lysozyme 단백질을 다중 이온교환크로마토그래피 공정으로 정제함에 있어 Bio-rex 70겔을 이용하는 것이 Cellufine겔보다 흡착능 측면에서 효과적임을 알 수 있었으며, 순도 증가를 위해서는 용출용액의 농도구배를 이용할 것이 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구에서는 다중 이온교환크로마토그래피로 리소짐을 분리하는 공정개발을 위해 Cellufine CM C-200과 Bio-rex 70 겔을 이용하여 비교 실험하였다. 단백질에서 lysozyme의 분리, 정제 및 수지의 활용성을 확인하는 실험이었다. 실험결과 Cellufine겔은 5 주기가 지나면서부터 용출분획에서 낮은 농도의 단백질이 용출됨을 확인하였다. 이는 주기가 진행될 수록 겔의 흡착능력이 약화됨을 보여주는 것이다. 또한 주기가 진행될수록 각 주기의 크로마토그램을 분석한 결과, 단백질이 겔의 작용기와 효과적으로 흡·탈착 작용을 하고 있지 못하기 때문에 용출영역의 peak가 계속해서 낮아지는 경향을 보였다. 그러나 Bio-rex 70겔은 6 주기를 수행 후에도 겔의 흡착능력이 상실되지 않고 단백질과 효과적으로 결합함을 용출영역의 크로마토그램과 전기영동에서 확인하였다. Bio-rex 겔은 Cellufine겔보다 단백질과 작용기와의 결합력이 우수하였으나 순수한 lysozyme의 정제에 있어서 적당하지 못함을 알 수 있었다. lysozyme의 용출 이온강도가 다른 단백질들보다 더 강하기 때문에 용출용액의 소금 농도구배를 실행함으로써 단백질을 용출한다면 순수한 lysozyme을 정제할 수 있다고 생각된다. 따라서 본 실험결과 다중 이온교환크로마토그래피 공정에 효과적인 겔은 Bio-rex 70겔임을 알 수 있었다.

감 사

본 과정은 생물공학연구원과 인하대 초정밀 생물분리기술 연구센터의 지원에 의해 연구가 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- 1 Geetha, C. and V. Deshpande (1999), Purification and characterization of fish liver ferritins, *Comp. Biochem. Physiol.* **123**, 285-294.
- 2 Huh, Y. S. and I. H. Kim (2002), Efficient purification of fused ferritin[F_H+F_L] using silica powder and gel filtration chromatography, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 365-369.
- 3 Park, S. J., H. S. Kim, H. W. Kim, T. H. Ahn, K. M. Park, C. U. Choi (1990), Continuous separation of lysozyme from egg white by ion exchange column chromatography, *Kor. J. Food Sci.* **22**, 711-715.
- 4 Kim, J. W., S. L. Park, S. K. Chun (1992), Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus*, *J. Fish Pathol.* **5**, 87-92.
- 5 Kim, W. K. and B. H. Chung (1999), Optimization of chromatographic separation of lysozyme from homogenate of hen egg white by comparison of breakthrough behavior, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 279-283.
- 6 Lee, S. K., I. J. Moon, B. Y. Min (1989), Studies on the lysozyme isolation by ion-exchange chromatography, *Kor. J. Anim. Sci.* **31**, 780-787.
- 7 Fleming, A.(1922), On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretins, *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B.* **93**, 306-310.
- 8 Proctor, V. A., F. E. Cunningham (1988), The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **26**, 359-395.
- 9 Ibrahim, H. R., S. Higashiguchi, M. Loketsu, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, Y. Sugimoto, T. Aoki (1996), Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism, *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3799-3806.
- 10 Gray, L. W. and K. Manfred (1977), Deaminated chitin affinity chromatography: A method for the isolation, purification and concentration of lysozyme, *J. Food Sci.* **42**, 1084-1087.
- 11 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.
- 12 Gordon, A. W., H. Ward, and H. L. Fevold (1945), Isolation of lysozyme from egg white, *J. Biol. Chem.* **157**, 43-58.
- 13 Ghielmetti, G. and C. Trinchers (1970), Process for the production of lysozyme, US Pat. No. 3515643.
- 14 Hughey, V. L. and E. A. Johnson (1987), Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2165-2170.
- 15 Alderton, G., W. H. Ward and H. L. Fevold (1945), Isolation of lysozyme from egg white, *J. Biol. Chem.* **157**, 43-58.
- 16 Weaver, G. L., M. Kroger, and F. Kats (1977), Deaminated chitin affinity chromatography: a method for the isolation, purification and concentration of lysozyme, *J. Food Sci.* **42**, 1084-1087.
- 17 Ahvenainen, R., M. Heikonen, M. Kreula, M. Linko, and P. Linko (1980), Separation of lysozyme from egg white, *Food Process Engr.* **2**, 301-310.