

## 난백으로부터 리소짐 분리를 위한 이온교환 크로마토그래피와 침전법의 비교

김형원, 박인규, 송재양, 김인호  
충남대학교 공과대학 화학공학과

### Comparison of Lysozyme Purification from Egg White between Ion Exchange Column Chromatography and precipitation

Hyoung-Won Kim, In-Kyu Park, Jae-Yang Song and In-Ho Kim  
Department of Chemical Engineering  
Chungnam National University, Daejeon 305-764

#### 서론

Lysozyme은 최초로 발견된 용균효소로서, *Micrococcus lysodeikticus*같은 세균이나 다른 그람 양성세균과 음성세균을 용균시키는 특성을 갖는 효소로 처음 보고되었다[1]. 이런 효과를 이용하여 lysozyme을 식품의 보존료와 의약품원료 및 유아식의 영양강화 부분에 사용하고 있다. 난백은 다른 lysozyme 함유물질에 비하여 생산량이 풍부하며, 추출조작이 비교적 용이하기 때문에 lysozyme 추출원료로 가장 적합한 것으로 알려져 있다[2]. Lysozyme을 추출하여 효과적으로 활용하기 위한 분리 및 정제에 관한 연구가 단백질 침전법을 중심으로 활발히 연구되었는데, 고전적인 침전은 Alderton과 Fevold이 pH 9.5에서 5% NaCl을 첨가하여 난백으로부터 lysozyme을 직접 결정화 시켰다[3]. Li-Chan 등은 여러 가지 양이온 교환수지를 가지고 난백으로부터 lysozyme을 분리하는 실험을 했다. 여기서 주목할 것은 batch 식이 갖고 있는 수지의 재생문제 등을 극복하기 위해서 column식으로 실험을 했다는 것이다. 결과 더 높은 수율과 연속작업의 편의성에 큰 진전을 보였다[4]. 본 연구는 난백에서 lysozyme을 column식 이온교환 크로마토그래피와 침전법으로 분리하여 SDS-PAGE와 역가측정을 통해 어느 방법이 효과적인지 연구하였다.

#### 실험

##### 1. 난백의 준비

달걀을 난백과 난황으로 분리한 후 난백에 무게비로 증류수를 10배 희석하였다. 이 희석용액을 교반한 후에 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 30분간 분리하여 상등액만을 시료로 사용하였다. 그리고 사용하기 직전에 0.1 M HCl을 사용하여 pH를 7로 조절하였다.

##### 2. 실험재료

이온교환 크로마토그래피는 양이온교환 수지(Bio-*rex* 70 gel, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.)와 유리 column(330mm L × 25mm ID, Spectra/chrom co., U.S.A.)을 사용하였다. 세척용액과 평형용액은 pH 7로 맞춰진 0.02 M인산완충용액을 사용였고, 용출용액으로는 NaCl(Oriental Chemical Industries, Korea)를 평형과 세척시에 사용된 완충용액에 녹여 사용하였다. 침전에 사용된 황산암모늄은 Duksan Pharmaceutical(Korea)사에서 구입하였다. 투석막(MWCO : 6000~8000)은 Spectrum Medical Industry(U.S.A.)에서 구입하

여 사용했다.

### 3. 크로마토그래피

이온교환 크로마토그래피에서 살펴본 것은 lysozyme의 용출시 NaCl의 농도 구배에 따른 영향을 실험하였다. 경우 1은 농도구배는 0 M에서 1 M로 용출속도는 7.37cm/min으로 하였고, 경우 2는 0 M에서 2 M의 농도구배 그리고 용출속도는 7.37cm/min으로 하였다. 사용한 젤은 건조된 무게로 6g씩 사용하였다. 0.02 M 인산완충용액(pH 7)에 젤을 부풀린 후에 30분 동안 탈기시켜 column에 부었고, 30분 정도 젤이 중력에 의해 자유침강될 때까지 방치해 두었다. 그 후에 column을 충전하고 평형시켰는데, 평형완충용액은 0.02 M 인산완충용액(pH 7)을 사용하였고, 22.0cm/min로 빠르게 하였다. 난백 주입은 7.37cm/min로 30분 동안 흘려주어 젤에 lysozyme이 충분히 붙도록 하였다. 시료주입 후에는 0.02 M 인산완충용액(pH 7)을 사용하여 22.0cm/min로 15분간 빠르게 세척하여 제거한 뒤에 각 경우의 조건에 맞게 용출시켰다.

### 4. 침전법

염의 농도에 따른 침전의 변화와 침전시 온도 및 시간의 변화가 lysozyme의 침전에 영향을 주는지 실험하였다. 우선 침전에 쓰인 난백시료는 증류수로 10배 희석하였고, 시료 50ml에 0.2 M 인산완충용액(pH 7)을 15ml 더한 다음, 얼음물 욕조에 비이커를 넣어 온도가 낮게 유지할 수 있도록 하였다. 교반하면서 황산암모늄의 농도를 각 25%, 40%, 60% 그리고 85%로 주입하였고 6분 동안 모든 양을 가했다. 모두 주입한 후에 30분동안 교반시켜 lysozyme를 침전시켰다. 이 용액을 3000rpm에서 30분간 원심분리를 하여 상등액과 침전물을 각 분리하였다. 상등액은 버리고 침전물을 다시 0.2 M 인산완충용액(pH 7)에 녹여 투석을 했는데, MWCO(molecular weight cut off)가 6000~8000 인 투석막을 이용하였다. 투석은 0.2 M 인산완충용액(pH 7) 250ml 안에서 약 4시간 정도 상온에서 하였다.

## 결론 및 토론

### 1. 크로마토그래피에 의한 분리

NaCl의 농도구배에 따른 분리능을 알아보기 위해서 경우 1과 경우 2를 비교하였다. 경우 1의 크로마토그램은 Fig.1A과 같다. 63분부터 120분까지 약 60분간 용출 시켰다. 시료는 2분간격으로 총 30개를 분취하였다. 크로마토그램을 보면 확실히 피크가 두 개로 나뉘어져 있다는 것을 알 수 있었고, lysozyme이 선택적으로 분리가 되었는지 알기위해 SDS-PAGE(Fig.1B)를 실험해본 결과 다른 단백질과 lysozyme이 분리되어 서로 다른 시간에 용출된다는 것을 알 수 있었다. 시료번호 19번 이후부터 lysozyme의 띠가 확실하고 두꺼웠다. 이는 젤과 난백에 있는 여러 종류의 단백질간의 이온결합의 세기가 틀려 용출되는 시간의 차가 생기기 때문이다. 경우 2(Fig.2A)에서는 하나의 단일 피크가 생겼다. 시료의 성분을 분석한 결과, 경우 1과는 달리 단백질의 종류에는 상관없이 동시에 용출되어 선택성이 없었다. 용출용액의 NaCl 농도가 너무 진하여 여러 단백질과 젤과의 이온결합의 강도에 무관하게 동시에 탈착되었기 때문이었다.

각 경우에서 역가를 측정하였다. 이 수치를 기준으로 lysozyme의 수율 및 분리도를 Table 1에 나타내었다. 경우 1에서는 전체 수율이 93.2%로 매우 높았다. Lysozyme만 선택적으로 용출되는 19번 시료부터 분취를 받으면 수율은 71.9% 그리고 분리도 1.2를 얻었는데, 이는 경우 2의 전체 수율인 71.0%와 비슷했다. 수율에서 차이가 나는 것은 Fig.2A에 나타난 것처럼 재생시에 난백의 단백질이 용출되기 때문이다.

2. 침전법에 의한 분리

염의 농도가 침전에 미치는 영향을 실험했다. 25%의 염의 농도에서는 침전이 일어나지 않았고 40% 이상부터 침전물이 생긴다는 것을 SDS-PAGE(Fig.3)로 확인할 수 있었다. Fig.3에 나타난 것처럼 염의 농도의 변화에 따라 침전되는 단백질의 종류가 달라졌다. 40%의 침전물에는 없거나 소량이었던 45kDa의 위, 아래 띠가 60%에서는 확연히 진해졌다. 우리가 분리하고자 하는 lysozyme은 선택적으로 침전되지 않음을 나타낸다. Table 2를 보면 85%의 염을 투입했을 경우에 수율이 56.1% 정도로 낮았다.

감사

본 과제는 산업자원부 청정기술개발사업비와 인하대학교 초정밀분리기술 연구센터의 지원에 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, W. K. and Jung, B. H. "Kor. J. Biotechnol. Bioeng.", 1999, **14**(3), 279.
2. Park, S. C., Kim, S. J., Kim, H. W., Ahn, T. H., Park, G. M. and Choi, C. H. "Kor. J. Food Sci. Technol.", 1990. **22**(6), 711.
3. Alderton, G. and Fevold, H.L. "J. Biol. Chem.", 1946, **164**, 1.
4. Li-Chan, E., Nakai, S., Sim, J., Bragg, D.B. and Lo, K.V. "J. Food Science", 1986, **51**, 1032.

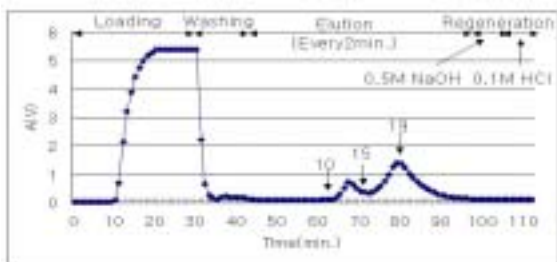


Fig. 1A. Ion exchange chromatography of egg white solution.(From 0 M to 1 M NaCl, elution flow rate : 7.37cm/min)

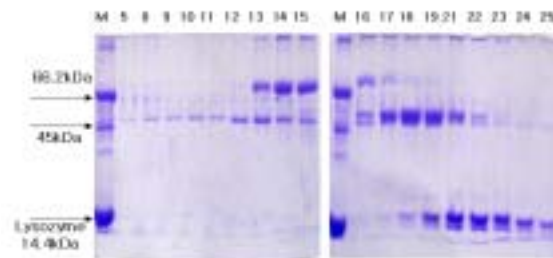


Fig. 1B. 15% SDS-PAGE of collected samples.(From 0 M to 1 M NaCl, elution flow rate : 7.37cm/min)

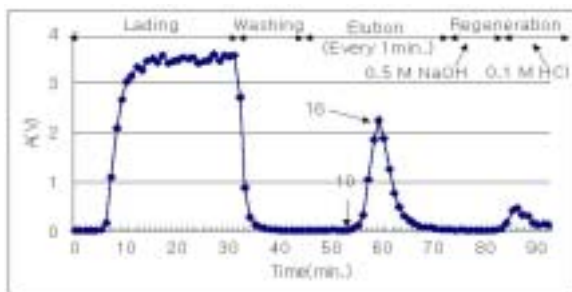


Fig. 2A. Ion exchange chromatography of egg white solution.(From 0 M to 2 M NaCl, elution flow rate : 7.37cm/min)

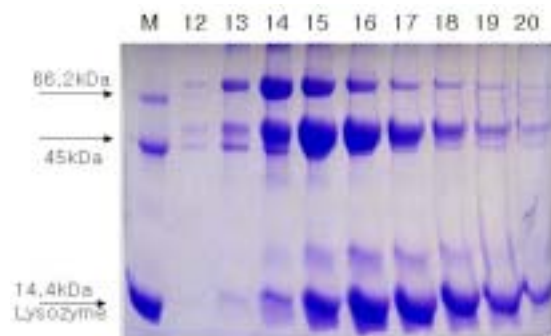


Fig. 2B. 15% SDS-PAGE of fractions. (From 0 M to 2 M NaCl, elution flow rate : 7.37cm/min)

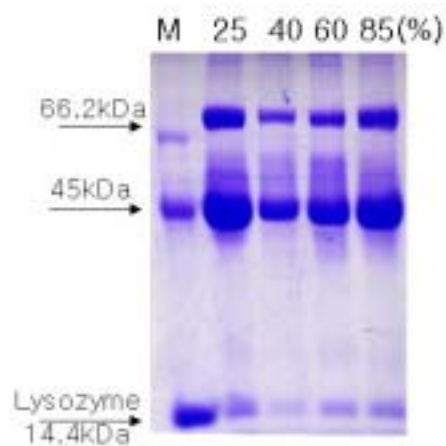


Fig. 3. 15% SDS-PAGE of precipitated samples.

Table 1. Recovery of lysozyme from ion exchange chromatography.

	Case 1	Case 2
Total activity(U)	152580	113250
Total recovery(%)	93.2	71
Specific activity(U/ml)	5607(No.19~No.26)	
Purification fold	1.2	
Recovery (%, fraction samples)	71.9	

Table 2. Recovery and purification in ammonium sulfate precipitation.

	25%	40%	60%	85%
Total activity(U)	No ppt.	7250	11400	138000
Recovery(%) (Based on lysozyme)	No ppt.	2.9	4.6	56.1
Specific activity(U/ml)	No ppt.	3020	3480	9980