

이온교환 카트리지와 RP-HPLC를 이용한 난백 단백질의 확인

김현문 · 김아름 · 이창수 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-746 대전시 유성구 궁동 220
(2012년 2월 6일 접수, 2012년 3월 8일 채택)

Identification of Proteins in Egg White Using Ion Exchange Cartridge and RP-HPLC

Hyun Moon Kim, Ah Reum Kim, Chang Soo Lee and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 6 February 2012; accepted 8 March 2012)

요 약

난백에 있는 40여 가지의 단백질의 기능적 특성에 대한 연구가 폭 넓게 진행되고 있지만, 그 특성이 모두 확인되지 않았다. 난백에서 순수하면서 변성되지 않은 단백질을 분리하는 방법을 연구하기 위해 본 연구에서는 난백 중 함량이 많은 lysozyme, ovotransferrin, ovalbumin을 분리했다. 난백에서 단백질을 다른 분리 방법보다 선택적으로 분리가 가능한 이온 교환 크로마토그래피를 이용했다. 그리고 분리된 단백질을 동정하기 위해서 Reversed-phase HPLC (RP-HPLC)를 사용했다. 이온 교환 크로마토그래피에서 HI Trap ion exchange cartridge (GE Healthcare, USA)를 사용했고, 그 중에서 양이온 교환 수지 SP (완충용액 pH 8.0, pH 5.2)와 음이온 교환 수지 Q (완충용액 pH 8.0)로 난백 단백질을 분리하였다. 분리한 난백 단백질들의 동정용 RP-HPLC에서는 C18 컬럼(Phenomenex, USA)을 사용했고 등용매 용리에서 이동상으로 acetonitrile (ACN)/distilled water (DW)/trifluoroacetic acid (TFA)의 부피비를 50/50/0.1로 사용했다. 이온 교환 크로마토그래피에 의해 각 단계에서 분리된 용출용액을 RP-HPLC으로 분석한 크로마토그램과 표준시료의 크로마토그램의 체류시간을 비교하여 난백에 포함된 ovotransferrin, ovalbumin, lysozyme이 순차적으로 용출됨을 알았다.

Abstract – Approximately forty proteins in egg white have been widely studied for their functional properties. To develop a procedure of separation for pure and non-altered proteins from egg white, purification study was conducted to isolate lysozyme, ovotransferrin, and ovalbumin. Ion exchange cartridge can selectively separate proteins from egg white, and reversed-phase HPLC (RP-HPLC) could identify separated proteins. Proteins in egg white were purified by HI trap ion exchange cartridge SP and Q with buffers pH 8.0 and 5.2. C18 column (Phenomenex, USA) was used for RP-HPLC analysis and isocratic mobile phase was used with acetonitrile (ACN)/distilled water (DW)/trifluoroacetic acid (TFA) in the ratio of 50/50/0.1. Comparing the retention times of standards in RP-HPLC experiments showed that ovotransferrin, ovalbumin, and lysozyme in egg white were eluted successively in the RP-HPLC column after the pretreatment in SP and Q ion exchange cartridges.

Key words: Egg White, HPLC, Ion Exchange Chromatography, Cartridge

1. 서 론

식품으로 유통되고 있는 조류의 알은 달걀, 메추리알, 오리알 등을 들 수 있으나 이중 달걀이 주종을 이루고 있다. 우리나라에서 달걀의 가격과 공급이 안정화 된 것은 효율적인 배합사료의 개발, 사육 기술의 개량 등으로 집약적인 대량생산이 가능하게 된 1950년대 이후의 일이다. 현재 달걀 생산량은 91억 4천만 개로 이것은 1인당 180여개(연간)에 해당된다.

계란 중 난백은 자연에서 쉽게 얻을 수 있는 완전식품으로 단백질, 탄수화물, 지방, 무기질, 비타민 등이 포함되어있어 음식산업 분야에서 필수적 성분으로 많이 사용되어져 왔다[1]. 특히 생체에 필요한 활성 단백질을 많이 포함하고 있어 생물학적이고 기술적인 분야에서 연구 되어져왔다. 난백에는 효소억제제, 면역단백질, 비타민결합단백질, 철분결합단백질 등의 다양한 단백질이 있다. 그 중 난백의 주요 단백질은 lysozyme, ovotransferrin, ovalbumin으로 특히 중요한 의미가 있다. pI가 10.7인 lysozyme은 난백에 3.4~3.5%정도 포함되어 있으며 분자량은 약 14.3 kDa이다. 주된 생물학적 특성은 면역용균 촉진작용, 백혈구의 번식능 증강, 면역능 증강효과, 항생물질의 작용 증강, 염증의 조직 수복과정의 촉진, 농점액의 분해와 배출의 촉진

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

[‡]이 논문은 KAIST 홍원희 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

및 출혈억제 등의 효과가 있어 수술중이나 수술 후의 출혈과 수술 후 유증으로 나타나는 혈뇨, 혈담, 코피 등의 출혈성 질환 등에 사용할 수 있다. 또 항 박테리아성 작용은 미생물 감염에 방어적인 역할을 하여 식품의 보존제와 치료제로 음식의 보존과 제약 산업에 널리 사용된다[2]. pI 6.1인 ovotransferrin은 난백에 12~13% 포함되어 있으며 분자량은 약 77.7 kDa이다. 난백 단백질에서 두 번째로 많이 포함되어있으며, 열에 민감한 난백 단백질로 변성온도는 60 °C이고 70 °C에서 기능적 특성이 변한다[3]. Ovalbumin은 난백의 57%로 가장 높은 비율을 차지하며, 분자량은 44.5 kDa이다. Ovalbumin은 인산화의 정도에 따라 A1, A2 및 A3의 3가지 형태로 나누어지며, 각각의 함량 비는 약 85:12:3이며 pI는 각각 4.75, 4.89 및 4.94이다. 난백이 겔화되는데 주된 역할을 하는 당단백질로 계란 알레르기를 유발하는 물질이다[4].

계란 난백에서 생물학적 활성을 가지는 이러한 단백질의 분리를 위한 많은 절차들이 개발되고 연구되었다. 계란 난백을 분리하는 방법에는 직접결정화법, 크로마토그래피법 및 한외여과법 등이 있다. 난백의 물질들은 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[5,6].

크로마토그래피는 실험실에서 소량성분의 정제에 이용되었던 기술이었는데, 이 기술 특유의 우수한 선택성과 제품의 대량생산 필요성으로 인하여 이 기술의 확대적용이 시도되고 있다. 크로마토그래피는 컬럼 충전물인 고정상에 흡착하고자 하는 성분들의 상호작용 기작을 이용한 기술로서, 기작에 따라 다양한 기술이 있다. 대표적인 기술로는 모세관 액체크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 초입계 크로마토그래피 등이 있다[7-9]. 이 중에서 이온 교환 크로마토그래피법은 수율 및 순도가 높아 산업적으로 이용되고 있다[10].

난백의 정제와 분리는 이온 교환 크로마토그래피에서 주로 이루어진다. 이온 교환 크로마토그래피는 대전된 관능기가 고정상에 존재한다. 완충용액에서 단백질의 등전점에 따라 양이온이나 음이온화된 단백질용액을 컬럼에 흘려 고정상의 대전 상태에 따라 단백질이 달라붙는 정도가 달라 단백질을 분리할 수 있다. 이온 교환 크로마토그래피는 양이온 교환 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피 두 가지가 있다. 양이온 교환 크로마토그래피는 음이온 관능기가 있는 고정상에 주입한 단백질 양이온이 붙어 단백질 분리가 가능하며 음이온 교환 크로마토그래피는 양이온 관능기 고정상에 단백질 음이온이 붙어 단백질의 분리가 가능하다. 이온 교환 크로마토그래피의 장점은 높은 처리량과 컬럼의 수명이 길고 사용이 편리한 점이다[5].

일반적으로 이온 교환 크로마토그래피는 컬럼이 장착된 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)와 같은 시스템으로 실험한다. 컬럼은 고정상의 관능기에 따라 다양하며 DEAE, SP, Q, CM 관능기 컬럼이 시판되고 있다. 컬럼을 사용할 때는 고정상을 빈 컬럼에 충전시키거나 고가의 충전된 컬럼을 구입하여야 한다. 하지만 소형의 저가 카트리지를 사용하면 유리 컬럼의 단점인 평형화 시간을 줄일 수 있고, 겔 및 이동상의 양도 줄일 수 있어 분리비용이 절감된다.

실험에서 사용한 양이온 교환 카트리지 SP는 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ 의 작용기와 1 mL의 용량을 가지고 있고, 음이온 교환 카트리지 Q는 $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ 의 작용기와 1 mL의 용량을 가지고 있다.

RP-HPLC는 역상 HPLC를 의미하며 단백질의 소수성 차이를 이용하여 높은 분리도로 단백질을 분리하거나 확인하는데 사용한다. 이동상은 고정상의 특성을 변화시키지 않고 단백질을 잘 용해하는 acetonitrile을 사용한다. 컬럼은 고정상의 관능기에 따라 다양하며 단백질 분리에는 C-4, C-8, C-18 컬럼을 사용한다. 그 중에 C-18 컬럼은 Si 표면위에 $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ 의 관능기를 가지고 있고, 단백질 분리에 가장 많이 사용한다[11].

본 실험의 목적은 난백 단백질을 FPLC 용 카트리지로 신속히 분리하여 RP-HPLC로 확인하는데 있다. 이온 교환 카트리지에서 lysozyme과 ovotransferrin을 양이온 교환 카트리지를 사용하여 분리했고, ovalbumin을 음이온 교환 카트리지를 사용해서 등전점이 다른 세 가지 난백 단백질을 등전점이 높은 단백질부터 순차적으로 분리했다. 분리한 단백질은 RP-HPLC를 이용하여 표준 단백질과 비교하여 단백질을 동정하였다.

2. 실험

2-1. 실험재료 및 시약

시료는 시중에서 구입한 달걀과 무수 인산수소 나트륨(Sigma, USA), 무수 인산이수소 나트륨(Sigma, USA)를 사용했다. 이온 교환 크로마토그래피에서는 이동상으로 인산 완충 용액, 트리스 완충 용액(Sigma, USA)을 사용했고, 용리용액으로는 완충 용액에 염화나트륨(Duksan, Korea)을 넣어서 사용했다. RP-HPLC에서 이동상은 Acetonitrile (J.T. Baker, USA), 증류수(Younglin, Korea), Trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA)를 사용했다. 그리고 시료를 여과하는데 종이 여과지(No. 1, Watman, Germany)와 0.22 μm 주사기 필터(Advantec, Toyo, Japan)를 사용했다. 표준시료로는 lysozyme (Sigma, L6876-5G, USA), ovalbumin (Sigma, A5378-5G, USA)을 사용했다.

2-2. 기기 및 장치

이온 교환 크로마토그래피에서는 FPLC 펌프(P-500, P-50, Pharmacia Biotech, USA), 펌프 제어기(LCC-500, Pharmacia Biotech, USA), 카트리지(Hi Trap ion exchange cartridge, GE Healthcare, USA), 그리고 자외선 검출기(UV-1, Pharmacia Biotech, USA)를 사용했다.

RP-HPLC에서는 펌프(110B, Beckman, USA), 자외선 검출기(783A, Applied Biosystems, USA), 데이터 수집 장치(Autochro Data Module, Younglin, Korea), 그리고 C-18 column (4.6×250 mm, Agilent, USA)를 사용했다.

2-3. 실험 방법

계란에서 난황을 분리하여 제거한 후 난백 20 mL를 0.05 M pH 8 인산 완충용액에 5배 희석한 후 12시간 냉장 보관했다. 보관한 용액을 원심분리기(Centrifuge 5412, Eppendorf, Germany)로 3분간 15000 rpm으로 원심분리했다. 원심분리한 용액의 상등액을 종이 여과지로 여과하여 이온 교환 크로마토그래피의 시료로 사용했다.

이온 교환 크로마토그래피의 정제실험은 Fig. 1에 보인 것처럼 난백에서 lysozyme, ovotransferrin, ovalbumin의 분획을 얻었고, 분획의 분리 실험은 평형, 시료 주입, 세척, 용리의 과정을 거쳤다. 실험 조건은 Table 1과 같은데, 이 실험 조건에 따라 유량과 시간을 조절하여 각각 단계별로 용액과 시료를 주입하였다. 이때 용리 단계에서 나온 용액은 모아서 다음 실험의 시료와 HPLC에서의 확인용 용액

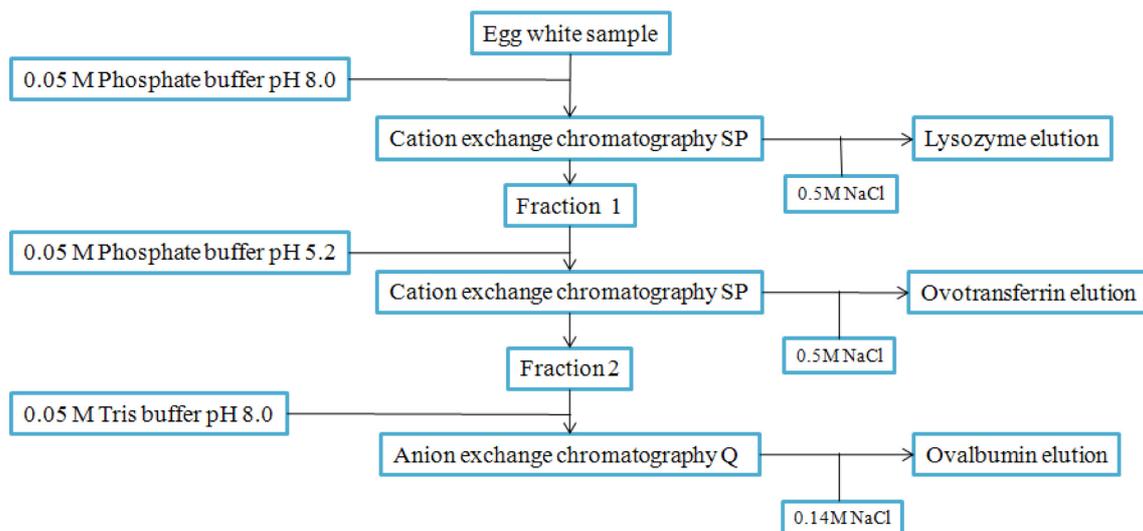


Fig. 1. Procedure of egg white fractionation using ion exchange cartridge.

Table 1. The condition of ion exchange chromatography steps

Step	Lysozyme		Ovotransferrin		Ovalbumin	
	Flow rate (mL/min)	Time (min)	Flow rate (mL/min)	Time (min)	Flow rate (mL/min)	Time (min)
Equilibration	2	3	2	3	2	3
Sample loading	1	5	1	10	1	7
Washing	2	4	2	5	2	3
Elution	1	8	1	6	1	3

으로 사용했다. 이때 lysozyme과 ovotransferrin 분리에는 양이온 교환 카트리지를 SP를 사용했고, ovalbumin의 분리에는 음이온 교환 카트리지를 Q를 사용했다.

HPLC의 확인실험은 이온 교환 크로마토그래피에서 난백과 분리 후 나온 용출 용액, 그리고 표준시료로 진행했는데, 각 실험별 시료는 주사기 필터로 여과 후 20 μ L를 주입하였고 lysozyme과 ovalbumin 표준시료의 농도는 각각 2 g/L, 20 g/L였다. 이동상은 등용매 용리를 위해 ACN과 증류수, TFA의 부피조성을 50/50/0.1 (v/v%)로 유속은 1 mL/min 이었다. 그리고 자외선 검출기의 파장은 280 nm로 했다. 각각의 완충용액과 용리용액, 이동상은 혼합 후 sonicator (Brason, USA)로 15분간 초음파처리, 10분간 탈기 후 사용했다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 Gúerin-Dubiard 등이 사용했던 난백에서 lysozyme, ovotransferrin, ovalbumin을 분리하는 방법[12]을 카트리지를 사용하는 방법으로 수정한 흐름도이다. pI 10.7의 lysozyme은 난백 단백질 중 pI 값이 가장 크기 때문에 pH 8.0의 0.05 M 인산 완충용액에서 양이온으로 변화시켜 양이온 교환 카트리지를 SP를 사용해서 분리했다. pI 6.1의 ovotransferrin은 lysozyme을 분리 후 나머지 단백질만 포함된 시료를 pH 5.2의 0.05 M 인산 완충용액으로 양이온으로 변화시켜 양이온 교환 카트리지를 SP를 사용해서 분리했다. 그리고 pI 약 4.7의 ovalbumin은 pH 8의 0.05 M 트리스 완충용액으로 음이온으로 변화시켜 음이온 교환 카트리지를 Q를 사용해서 분리했다. 용리단계에서 염화나트륨 용액을 주입해서 각각의 단백질을 용리시킨 용리액을 RP-HPLC 장치에서 C-18 컬럼으로 분석을 했다.

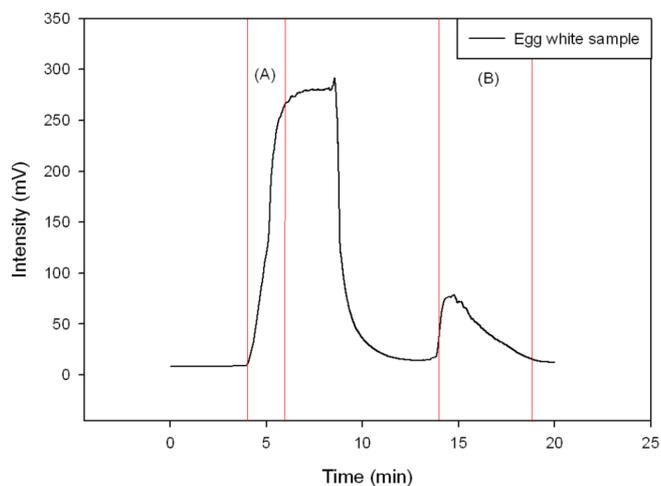


Fig. 2. Chromatogram for lysozyme separation from egg white by cation exchange cartridge (A): Fraction 1 in Fig. 1, (B): lysozyme elution.

흐름도에서 보인 것처럼 난백에서 lysozyme을 분리하는 실험을 먼저 한다. Fig. 2는 이온 교환 크로마토그래피 장치에서 양이온 교환 카트리지를 SP로 난백 시료로부터 lysozyme을 분리하는 단계의 크로마토그램이다. pH 8의 0.05 M 인산 완충 용액으로 카트리지를 평형화 시킨 후 같은 완충용액에 용해된 난백 시료를 주입했다. 샘플주입단계에서 카트리지를 내부에 양이온 상태의 lysozyme이 흡착이 되고 나머지 단백질은 카트리지를 따라 흘러나오게 된다. Fig. 2에서 (A)의 분획 1은 위 단계에서 샘플안의 lysozyme이 카트리지에

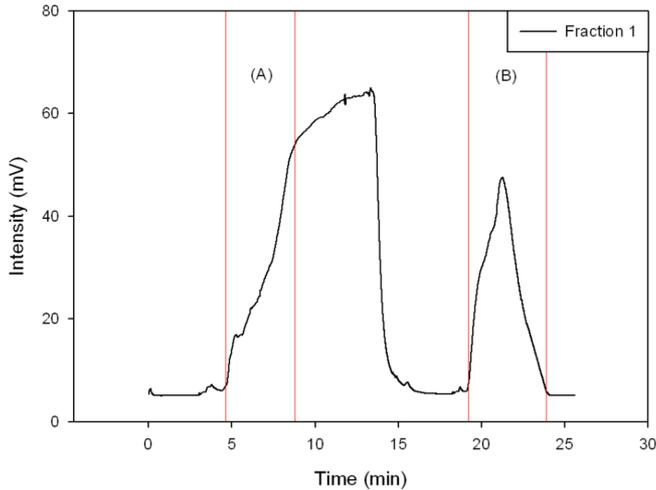


Fig. 3. Chromatogram for ovotransferrin separation from Fraction 1 in Fig. 1 by cation exchange cartridge (A): Fraction 2 in Fig. 1, (B): ovotransferrin elution.

흡착되고 흘러나온 나머지 단백질들이 포함된 용액이다. (A)구간에서만 시료를 모으는 것은 (A)구간 이후 크로마토그램의 피크가 일정한 값으로 수렴할수록 카트리지 내부에서 lysozyme의 흡착량이 포화되고 그 이후에 흘러나오는 용액에는 lysozyme이 포함되기 때문이다. 용리단계에서는 0.5 M 염화나트륨 용액을 사용해서 카트리지 내부에 흡착되어 있는 lysozyme을 탈착시켰다. 이때 (B)구간에서 흘러나온 용액들을 모은 lysozyme 용리액도 RP-HPLC 장치를 사용해서 분석을 했다.

Fig. 3은 이온 교환 크로마토그래피 장치에서 양이온 교환 카트리지 SP로 Fig. 2에서 얻었던 분획 1로부터 ovotransferrin을 분리하는 단계의 크로마토그램이다. pH 5.2의 0.05 M 인산 완충 용액으로 카트리지 내부를 평형화시킨 후 같은 완충용액으로 pH를 조절한 분획 1을 주입했다. 샘플주입단계에서 카트리지 내부에 양이온 상태의 ovotransferrin이 흡착되고 나머지 단백질은 관을 따라 흘러나오게 된다. (A)의 분획 2은 위 단계에서 샘플안의 ovotransferrin이 카트리지에 흡착되고 흘러나온 나머지 단백질들이 포함된 용액이다. Fig. 3에서 (A)구간에서만 시료를 모으는 것은 (A)구간 이후 크로마토그램의 피크가 일정한 값으로 수렴할수록 카트리지 내부에서 ovotransferrin의 흡착량이 포화되고 그 이후에는 흘러나오는 용액에 ovotransferrin이 포함되기 때문이다. 용리단계에서는 0.5 M 염화나트륨 용액을 사용해서 카트리지 내부에 흡착되어 있는 ovotransferrin을 탈착시켰다. 이때 (B)구간에서 흘러나온 용액들을 모은 ovotransferrin 용리액을 RP-HPLC 장치를 사용해서 분석을 했다.

Fig. 4는 이온 교환 크로마토그래피 장치에서 음이온 교환 카트리지 Q로 Fig. 3에서 얻었던 분획 2로부터 ovalbumin을 분리하는 단계의 크로마토그램이다. pH 8의 0.05 M 트리스 완충 용액으로 카트리지 내부를 평형화시킨 후 같은 완충용액으로 pH를 조절한 분획 2를 주입했다. 샘플주입단계에서 카트리지 내부에 음이온 상태의 ovalbumin이 흡착되고 나머지 단백질은 카트리지를 따라 흘러나오게 된다. 세척단계를 지나고 용리단계의 (A)구간에서 흘러나온 용액들을 모은 ovalbumin 용리액을 RP-HPLC 장치를 사용해서 분석을 했다.

FPLC에서 이온 교환 크로마토그래피 실험을 마치고 RP-HPLC 실험

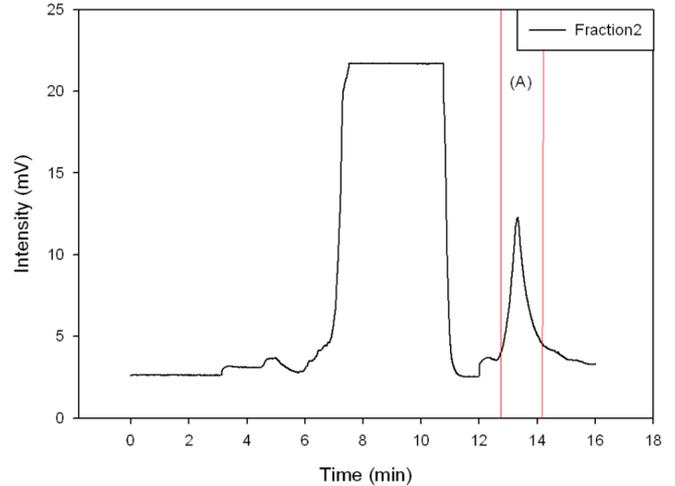


Fig. 4. Chromatogram for ovalbumin separation from Fraction 2 in Fig. 1 by anion exchange cartridge (A): ovalbumin elution.

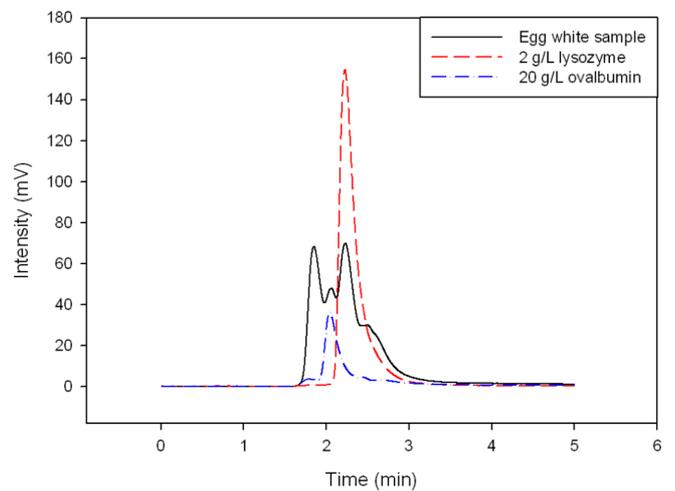


Fig. 5. Comparison of retention times between egg white sample and standards (lysozyme, ovalbumin) in RP-HPLC.

함을 했는데 Fig. 5는 난백 시료와 2 g/L의 lysozyme 표준시료, 20 g/L의 ovalbumin 표준시료를 RP-HPLC 장치를 통해 흡광도를 기록한 크로마토그램이다. 이동상의 유속은 1 mL/min, 시료 주입량은 20 μ L, 자외선 검출기의 파장을 280 nm로 5분 동안 흡광도를 기록했다. 이동상은 ACN/DW/TFA를 사용했는데 50/50/0.1의 부피조성에서 난백의 분리도가 가장 높기 때문이다. 실험에서 난백은 1분 51초, 2분 3초, 2분 13초에서 큰 피크가 3개가 나타났다. 그리고 ovalbumin의 표준시료는 2분 3초에서 피크가 나타났고, lysozyme의 표준시료는 2분 13초에서 피크를 보였다. 세 가지 피크가 나타난 크로마토그램에서 각각의 체류시간을 비교한 결과, 난백의 두 번째 피크는 ovalbumin이고 세 번째 피크는 lysozyme이라는 것을 알았다.

Fig. 6은 난백 시료와 Figs. 2,3,4에서 보인 각각의 용리액들을 Fig. 5와 같은 조건으로 흡광도를 기록한 크로마토그램이다. 이 크로마토그램에서 ovotransferrin, ovalbumin, lysozyme 용리액들은 각각 1분 51초, 2분 3초, 2분 13초의 체류시간을 보인다. 이 체류시간들은 난백의 세 피크의 체류시간과 같고, Fig. 5에서의 표준시료의 체류시간과 비교했을 때 ovalbumin과 lysozyme의 용리액이 예상했던 것과 맞

감 사

본 연구는 한국연구재단 기초연구비와 지역 인력 양성 사업비의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Jeon, Y. J., Lee, E. and Kim, I. H., "HPLC Study for Egg White Analysis," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **22**(2), 119-122 (2007).
2. Jang, A., Jo, Y. J., Lee, M. and Kim, J. C., "Development of the Purification Method of Ovotransferrin in Egg White," *Kor. J. Anim. Sci. & Technol.* **47**(6), 1025-1032(2005).
3. Huh, Y. S., Kim, H. W. and Kim, I. H., "Purification of Lysozyme from Egg White by Multicycle Ion Exchange Chromatography," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**(2), 122-126(2003).
4. Yang, J. S. and Oh, B. Y., "Feature of Egg White," *Food Sci. Ind.*, **32**(3), 42-55(1999).
5. Kim, H. W. and Kim, I. H., "Comparison of Lysozyme Purification from Egg White Between Ion Exchange Chromatography and Precipitation," *HWAHAK KONGHAK* **41**(3), 332-336(2003).
6. Do, J. S., Song, S. Y., Cho, K. J. and Kim, I. H., "Separation of Egg White Using HPLC with Change of Mobile Phase and Temperature," *Kor. Chem. Eng. Res. (HWAHAK KONGHAK)*, **49**(6), 829-834(2011).
7. Awadé, A. C. and Efstathiou, T., "Comparison of Three Liquid Chromatographic Methods for Egg-shite Potein Analysis," *J. Chromatogr. B*, **723**, 69-74(1999).
8. Kim, I. H. and Joung, B. H., "Modeling of Proeins Chromatography," *Chem. & Technol.*, **12**(4), 316-326(1994).
9. Kim, J. W., Park, S. L. and Chun, S. K., "Purification and Antibacterial Effect of Lysozyme from Flounder," *Paralichthys Olivaeus, J. Fish Pathol.*, **5**, 87-92(1992).
10. Jiang, C. M., Wang, M. C., Chang, W. H. and Chang, H. M., "Isolation of Lysozyme from Hen Egg Albumin by Alcohol-Insoluble Cross-Linked Pea Pod Solid Ion-Exchange Chromatography," *J. Food Sci.*, **66**(8), 1089-1092(2001).
11. Nau, F., Mallard, A., Pages, J. and Brule, G., "Reverse-phase Liquid Chromatography of Egg White Proteins Optimization of Ovalbumin Elution," *J. Liq. Chrom & Rel. Technol.*, **22**(8), 1129-1147(1999).
12. Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Hietanen, A., Bosque, A. Quiros del, Nau, F. and Croguennec, T., "Hen Egg White Fractionation By Ion-Exchange Chromatography," *J. Chromatogr. A*, **1090**, 58-67(2005).

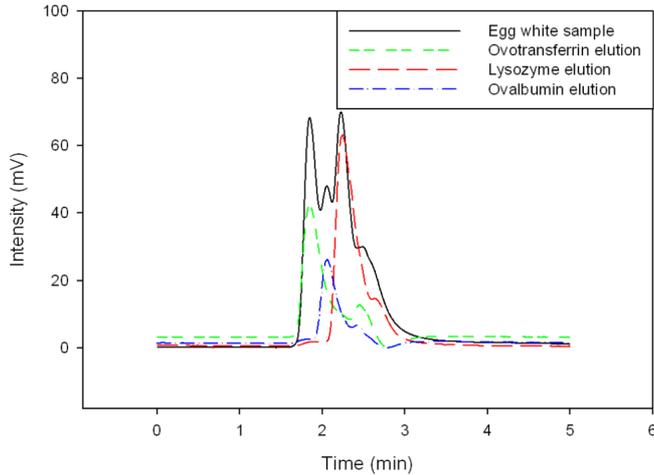


Fig. 6. Comparison of retention times between egg white sample and elution pools in Fig. 1 in RP-HPLC.

다는 것을 알 수 있다. 그리고 ovotransferrin은 난백 단백질 중 두 번째로 함량이 많기 때문에 난백의 첫 번째 피크의 체류시간과 높이를 볼 때 ovotransferrin 용리액도 ovotransferrin이라고 사료된다.

Lysozyme부터 ovalbumin까지의 분리 과정 중(Fig. 2에서 5) 이온 교환 크로마토그래피의 흡광도 크기가 작아지고, Fig. 5와 6 RP-HPLC의 크로마토그램 피크 높이가 작아지는 것을 볼 수 있는데, 이것은 분리과정 중 단백질의 농도가 희석되기 때문이라고 생각된다.

4. 결 론

FPLC에서 이온 교환 크로마토그래피 방법으로 난백에서 단백질을 분리했다. pH 8의 인산 완충용액으로 난백에서 양이온 교환 카트리지를 SP를 사용해서 lysozyme을 얻었고, lysozyme을 분리 제거한 용액을 pH 5.2의 인산 완충용액과 양이온 교환 카트리지 SP로 ovotransferrin을 얻었다. 그리고 ovotransferrin까지 분리 제거한 용액을 pH 8의 트리스 완충용액과 음이온 교환 카트리지 Q를 사용해서 ovalbumin을 분리했다.

RP-HPLC에서 분리한 난백 단백질과 표준품 피크를 비교하여 난백 단백질 종류를 확인하였다. ACN, DW, 그리고 TFA 조성비 50/50/0.1의 등용리 용매 조건에서 표준시료와 비교할 때 C-18 칼럼에서 ovotransferrin, ovalbumin, 그리고 lysozyme 순서로 분리되었다.