

이온교환크로마토그래피에서 라이소자임 분리에 미치는 pH와 온도 영향

고관영 · 김인호[†]

충남대학교 화학공학과
305-764 대전광역시 유성구 궁동 220
(2013년 9월 6일 접수, 2013년 10월 10일 수정본 접수, 2013년 10월 17일 채택)

The Effect of pH and Temperature on Lysozyme Separation in Ion-exchange Chromatography

Kwan-Young Ko and In-Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 6 September 2013; Received in revised form 10 October 2013; accepted 17 October 2013)

요 약

라이소자임은 용균 작용, 조직 회복 과정의 촉진 등의 작용을 하며 난백 중에 0.3% 함유되어 있다. 난백에서 라이소자임을 분리하는 방법으로 친화성 크로마토그래피, 이온교환크로마토그래피, 한외여과법 등이 있는데 이 중 이온교환크로마토그래피가 가장 많이 사용된다. 라이소자임을 양이온 젤이 충전된 유리 칼럼에서 분리-정제할 때 최적의 pH와 온도 조건을 찾는 것을 실험 목표로 하고, ASPEN Chromatography 전산 모사의 결과와 비교하였다. 실험에 사용되는 완충용액은 인산완충용액이었고 pH를 5~8로 변화를 주어 상온에서 실험하였고, 가장 분리가 잘 이루어진 pH에서 온도를 5 °C 간격으로 25~40 °C로 변화시켜 실험하였다. RP-HPLC (Reversed phase High Performance Liquid Chromatography) 분석을 통해 라이소자임의 체류 시간을 확인하였고, OriginPro 8을 이용해 용출 단계에서 크로마토그램의 면적을 비교하여 라이소자임의 양을 정량분석하였다. 결과를 분석한 결과, pH 5일 때, 온도가 25 °C에서 가장 많은 양의 라이소자임이 분리되었다.

Abstract – Lysozyme amounts to 0.3% in egg white and functions as an agent of cell lysis and activator of tissue reconstruction. Ion exchange chromatography is the most useful method of separation among affinity chromatography, ion exchange chromatography, and ultra-filtration. The aim of present study is to find the optimum pH and temperature for the separation of lysozyme in egg white within cation exchange gel filled glass column. And we compared results of experiments with those of simulations. Phosphate buffer was used, and pH and temperature were varied as 5~7 and 25~40 °C respectively. RP-HPLC was the tool for the retention time identification and quantitative analysis of lysozyme. OriginPro 8 measured the peak area of lysozyme chromatogram and quantified the eluted lysozyme. Largest amount of lysozyme was separated under the conditions of pH 5 and T 25 °C.

Key words: Lysozyme, Ion Exchange Chromatography, Aspen Simulation

1. 서 론

라이소자임은 박테리아 세포벽의 주요 구성성분인 mucopolysaccharide의 n-acetylglucosamine과 muramic acid 사이에 연결되어 있는 β-결합을 가수분해시키는 효소로서 Fleming에 의해 최초로 발견되었다[1]. 라이소자임은 129개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 단량체의 형태에는 네 개의 disulfate 결합이 있다. 이 결합이 라이소자임

의 나선형을 구조를 형성한다(~30% α-helix; ~6% β-sheet)[2]. 또한 라이소자임은 열에 대해 안정하고, 미생물 용균 작용뿐만 아니라 면역 증강, 항생물질의 작용 증강, 조직 회복 촉진 등의 다양한 작용을 한다[3]. 이 특징으로 인해 라이소자임은 효소제로 사용되거나 케양, 감염, 상처의 치료에도 사용되고, 유화제 항생제 등과 같이 의약품으로 사용된다[4]. 또한 소시지, 치즈 등에 첨가되는 등 식품첨가제로 사용되며, 펩신에 의한 우유 단백질의 분해를 촉진시키는 기능을 갖고 있어 분유에 첨가되기도 한다[5].

라이소자임은 동물의 조직, 체액, 식물 및 미생물 등에 널리 분포되어 있지만, 난백 중에 함량이 0.3%로 가장 높다. 계란 난백은 라이소자임을 함유한 동물이나 식물에 비하여 분리가 용이하며, 추출조작이 비교적 용이하기 때문에 추출원료로 가장 적합한 것으로 알려

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

져 있다[6].

난백으로 부터 라이소자임을 추출은 Alderton 등이 5% 소금 첨가와 pH 9.5에서 직접결정법을 성공했고, 그 후 Alderton과 Fevold는 5% NaCl과 여러 종류의 산 첨가로 직접결정법을 개선시켰다[1]. 이와 같은 방법은 나머지 계란 난백 단백질을 활용할 수 없고 라이소자임 분리의 수율과 순도가 낮은 결함이 있기 때문에 친화성 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 한외여과법(ultra filtration) 등을 시도하게 되었다. 친화성 크로마토그래피법은 친화성물질이 고가이므로 산업적으로 이용하기엔 불리하며 한외여과법은 수율이 현저하게 떨어지며 수율을 높이기 위해서는 요소나 pronase 같은 화학물질을 첨가해야 하는 문제점이 있다[7]. 이 방법 이외에 시도한 다른 방법은 이온교환크로마토그래피이다. 이온교환크로마토그래피의 경우 다른 방법들에 비해 분리된 라이소자임의 순도가 높다. 그래서 산업분야에서는 염색효과와 이온교환크로마토그래피를 결합시켜 라이소자임을 추출해내는 데 사용한다. 또한, 분리 후 나머지 난백 단백질의 재활용이 가능하다[7,8].

이러한 이온교환크로마토그래피 중 라이소자임을 분리하는데 있어 가장 많이 사용하는 방법은 양이온교환수지를 이용하는 방법이다. 양이온교환수지란 표면이 음전하 물질로 코팅되어 양이온을 흡착하는 고분자 담체이다. 단백질 정제에 가장 널리 이용되는 교환체로는 carboxymethyl cellulose(CM-cellulose)가 있다. 이 교환체는 cellulose의 히드록시기에 carboxymethyl기(-CH₃COO-)가 부가된 구조를 가져 음전하를 띄게 되어 양전하를 가진 단백질 분자를 흡착한다[3].

이온교환크로마토그래피로 라이소자임의 분리에 대한 연구는 Lee 등[1]이 이온교환수지를 바꾸어 실험하고 라이소자임의 분리 정도를 알아본 연구와 Kim 등[3]이 simulation을 통하여 NaCl 농도와 pH에 따른 분리 정도를 확인한 연구가 있다. 그리고 Huh 등[6]이 이온교환크로마토그래피를 반복적으로 사용하여 사용횟수를 측정하고 전기영동으로 분석한 연구도 있다.

칼럼의 온도변화에 따라 시료의 고정상과의 친화도를 알아보기 위한 열역학적 매개변수는 다음과 같은 식을 이용해 구했다[9].

$$\ln k' = \left(-\frac{\Delta H}{R} \right) \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (1)$$

k는 ΔH , R, ΔS 및 T는 각각 용량인자, 엔탈피, 기체상수, 엔트로피 및 절대온도이다. 용량인자는 시료와 컬럼 간의 상호작용을 나타내는 값으로써 다음 식으로 정의된다.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

t_R 은 피크의 체류시간이며, t_0 는 용질이 고정상과 상호작용을 하지 않고 컬럼을 통과하는 시간을 의미한다.

전산모사는 모든 기술적 분야에서 각광받고 있는 분야이다. 전산모사는 주로 수치해석법으로 복잡한 문제를 해결하고, 시스템에 대해 다양한 시각을 갖게 해준다. 또한, 전산모사는 실제로 실험을 하지 않고도 여러 조건에서의 결과를 빠르게 도출할 수 있기 때문에 최적의 분리조건을 간편하게 얻을 수 있고, 각각의 경우에 맞게 알고리즘이나 방정식을 선택하여 사용할 수 있다. 자주 사용되는 전산모사 프로그램에는 MATLAB, C++, Python, COMSOL, ASPEN 등 여러 가지 프로그램이 있다[10]. 이번 연구에 사용한 프로그램은 ASPEN Chromatography이며, 이온교환크로마토그래피에 설정된 등온흡착

식은 Mass Action Equilibrium, Yamamoto, Extended Langmuir, Extended Langmuir 2 and Counter-Ion Dependent, Extended Langmuir-Freundlich, User Procedure, User Submodel이 있다. 이번 실험의 전산모사에 사용한 등온흡착식은 Yamamoto이다. 이 방정식은 이온교환크로마토그래피에 적합한 방정식으로 알려져 있으며, (3)식과 같다[11,12].

$$w_k = (IP_{1k} + IP_{2k}c_b^{IP_{3k}})c_k \quad (3)$$

식에서 w_k 는 고정상에 흡착된 k성분의 농도, c_k 는 이동상에서 k성분의 농도, c_b 는 counter-ion의 농도, IP_1 , IP_2 , IP_3 는 k성분에 대한 등온 매개변수이다. (3)식에서 $(IP_{1k} + IP_{2k}c_b^{IP_{3k}})$ 항은 w_k 와 c_k 사이의 비례상수이며, 흡착에 대한 분배계수(m)이다. 분배계수는 이온강도에 대한 함수이며, 이온의 세기가 클수록 분배계수 값은 작아진다[11].

본 연구에서는 이온교환 크로마토그래피를 이용하여 난백에 포함되어 있는 라이소자임을 분리정제할 때 가장 최적의 조건을 찾는 것을 목표로 실험을 수행하였다. 완충용액의 pH를 5~8로 변화를 주어 최적의 pH를 찾고, 온도를 5 °C 간격 25~40 °C로 변화시켜 라이소자임 분리에 미치는 영향을 확인하고, 위의 조건에 맞춰 전산모사를 수행하고, 두 결과를 비교해 보았다.

2. 실험 및 전산모사

2-1. 실험재료 및 시약

실험에 사용된 재료는 계란의 난백을 건조시킨 난백 파우더를 증류수로 희석하여 시료로 사용하였다. 완충 용액은 0.02 M 인산나트륨(Sigma-Aldrich, USA) 용액을 pH 5, 6, 7, 8로 각각 제조하여 사용하였다. 용리 용액은 1.0 M 염화나트륨(Sigma-Aldrich, USA) 용액이 포함된 0.02 M 인산(Sigma-Aldrich, USA) 용액을 사용하였다. 양이온교환수지는 CM Excellose겔(Bioprogen, Korea)을 사용하였다. RP-HPLC 실험에서는 Acetonitrile(J. T. Baker, USA)과 증류수를 1:1의 부피비로 혼합하여 이동상으로 사용하였고, 이동상을 여과하기 위해 막 필터(GVPP, Millipore, USA)를 사용하였다.

2-2. 시료 전처리 방법

실험에 사용 되는 시료를 만들기 위해 먼저 난백 파우더 5 g을 증류수 1,000 mL에 희석시켰다. 그리고 희석된 용액에서 500 mL를 추출하여 15,000 rpm 원심분리기로 210초 동안 원심분리시키고, 원심 분리된 용액을 거름종이를 이용하여 불순물들을 걸러내고 시료로 사용하였다.

2-3. 실험기기 및 장치

원심분리기는 Centrifuge 5412(Eppendorf, Germany)를 사용하였다. 용리, 완충 용액을 흘리기 위한 펌프로 P-500(Pharmacia, USA) 사용하였고, Liquid chromatography controller LCC-500(Pharmacia, USA)로 유량을 조절하였다. 그리고 시료 주입은 펌프 P-50(Pharmacia, USA)로 하였다. 칼럼은 유리 칼럼(15 mm ID×250 mm L, Pharmacia USA)을 사용하였다. 검출기는 UV 검출기 UV-1(Pharmacia, USA)을 사용하였다. 용출 단계에서 용액을 모으기 위하여 fraction collector (Model 2110 Fraction Collector, BIO-RAD, USA)를 사용하였고, UV 검출기에서 흡광도를 측정하여 전기적 신호로 바꾸어주기 위하여 데이터 수집기와 소프트웨어(Autochro 2000, Younglin, Korea)를

Table 1. Experimental conditions of ion exchange chromatography

| | |
|----------------------------------|--|
| Resin bed volume | 8.8 ml |
| Flow rate and time | |
| 1) equilibration | 4.5 ml/min for 10 min (45 ml) |
| 2) sample loading | 2 ml/min for 15 min (30 ml) |
| 3) washing | 4.5 ml/min for 10 min (45 ml) |
| 4) elution | 2 ml/min for 15 min (30 ml) |
| Equilibration and washing buffer | 0.02 M Sodium phosphate buffer (pH 5.0~8.0) |
| Elution buffer | 0.02 M Sodium phosphate buffer (pH 5.0~8.0) with 1.0 M Sodium chloride |

사용하였다. 온도를 변화시키기 위해 항온조(Cole-Parmer Polystat, USA)를 사용하였다. Fraction collector로 모든 샘플의 흡광도 측정은 분광광도계(Series1000, Cecil, UK)를 사용하였다. 전산모사는 Aspen Chromatography(ver.2006, Aspen Tech., USA) 프로그램을 사용하였다.

2-4. 실험방법

라이소자임 정제 실험을 위해 양이온 교환 크로마토그래피의 평형, 시료 주입, 세척, 용리의 순서로 수행하였다. 크로마토그래피 실험 조건은 Table 1과 같고, 이 실험 조건에 따라 유량과 시간을 조절하여 각각 단계별로 용액을 주입하였다. 용출 단계에서 나온 용액은 UV 검출기를 지나 fraction collector에 20초 단위로 분획된다. 이 때 UV 검출기에서는 흡광도를 측정하였으며, 측정된 흡광도를 Autochro 2000을 통해 전기적인 신호로 바꾸어 컴퓨터에 저장하였다. 완충용액은 실험의 목적에 맞게 pH를 5부터 8까지 변화를 주어 사용하였다. Fraction collector를 통해 분획된 용액 중에서 라이소자임의 농도가 가장 높은 분획을 찾기 위해서 흡광도를 측정하였다.

그 중 가장 흡광도가 높은 분획 시료 20 µl을 RP-HPLC를 이용하여 분석하였다. 이 때 사용한 펌프는 SP930D(Younglin, Korea) 2대로 주 펌프에는 100% 증류수, 보조펌프에는 100% Acetonitrile(ACN)을 연결하여 사용하였다. ACN와 DW를 50:50을 비율로 1 ml/min의 유속으로 흘려보내 칼럼을 안정화시킨 후 시료를 주입하였다. 두 용액이 완전히 섞이게 하기 위해 gradient mixer(Gradient mixer, BIO-RAD, USA) 사용하였다. 칼럼은 C18 칼럼(250×46 mm, Phenomenex, USA)을 사용하였고, 측정을 위해 자외선 검출기(783A, Applied Biosystems, USA), 데이터 수집 장치(Autochro Data Module, Younglin, Korea), 데이터 수집 소프트웨어(Autochro 2000, Younglin, Korea)를 사용하였다. 표준 라이소자임의 체류시간은 2분 10초였다. 시료 주입 후 동일한 체류시간에 단일 피크가 형성되면 라이소자임으로 보았다.

수집된 라이소자임을 정량분석하기 위하여 크로마토그램의 면적을 OriginPro 8(OriginLab Corporation, USA) 프로그램으로 구하였다. 이온교환크로마토그래피 실험에서는 용출 단계인 35~50분 사이의 면적을 구하였고, RP-HPLC로 분석한 크로마토그램에서는 라이소자임의 피크가 나타나는 2~3분 사이의 면적을 구하였다.

2-5. 전산모사방법

이온교환크로마토그래피로 난백에서 라이소자임을 분리하는 실험을 Aspen의 cyclic organizer를 [13] 이용하여 전형적인 평형, 샘플주입, 세척, 용리의 4단계를 고려하여 Aspen Chromatography 전산모사를

Table 2. Simulation variables used

| Name | Value | Unit | Description |
|-----------------------|----------|-------------------|--------------------------------------|
| H_b | 7.46 | cm | Height of adsorbent layer |
| D_b | 1.5 | cm | Internal diameter of adsorbent layer |
| E_i | 0.35 | | Interparticle voidage |
| N_p | 20 | | Number of plates |
| MTC | 30 | min ⁻¹ | Mass transfer coefficient |
| IP ₁ (L) | variable | | Isotherms parameter |
| IP ₂ (L) | variable | | Isotherms parameter |
| IP ₃ (L) | variable | | Isotherms parameter |
| IP ₁ (O.P) | variable | | Isotherms parameter |
| IP ₂ (O.P) | variable | | Isotherms parameter |
| IP ₃ (O.P) | variable | | Isotherms parameter |

L: Lysozyme, O.P: Ohter proteins

하였다. 전산모사와 비교한 실험은 pH가 5, 8일 때, 온도가 25, 40 °C 일 때이다. 전산모사에 사용한 흡착등온식은 Yamamoto 방정식이다. 식 (3)의 IP₁, IP₂, IP₃ 매개변수를 변화시켜 전산모사 결과를 얻었다. 전산모사에 대한 입력변수는 Table 2에 정리하였다.

3. 결과 및 토의

3-1. pH에 따른 이온교환크로마토그램의 변화 및 RP-HPLC 분석

25 °C에서 이온교환크로마토그래피 실험을 완충용액의 pH를 변수로 설정하여 pH 5, 6, 7, 8로 각각 수행한 결과를 Fig. 1a~1d에 보였다. 샘플 주입단계의 크로마토그램을 보면 사다리꼴 모형의 피크가 나타났다. pH 5일 때 높이가 가장 낮았고, pH가 7까지 증가함에 따라 피크의 높이도 높아졌다. 이는 난백에 포함된 여러 가지 단백질들이 양이온수지에 흡착되지 않고 통과하여 높은 흡광도를 나타낸 것이다. 약 40분부터 라이소자임의 용출이 시작되는데, Fig. 1a, 1b의 피크가 Fig. 1c, 1d의 피크보다 더 높은 것을 볼 수 있었다. Fig. 1a와 1b를 비교했을 때, 피크의 높이는 Fig. 1b에서 더 높게 나왔지만 총 면적은 Fig. 1a가 더 넓은 것으로 보아 용출된 양은 Fig. 1a가 더 많은 것을 알 수 있었다. 단백질의 용출량은 샘플 주입단계에서 원하는 단백질이 양이온 교환수지에 흡착되는 양에 비례한다. 교환수지에 단백질의 흡착량은 이온화도에 비례하는데, 등전점과 멀어질수록 이온화가 더 많이 되므로 흡착되는 양도 많아진다. 라이소자임의 등전점이 10.5이므로 pH가 낮아질수록 양이온화가 더 많이 되어 양이온 교환수지에 많이 흡착된다. 따라서 pH 5에서 라이소자임이 가장 많이 용출되었고, pH 7과 8에서는 큰 차이가 없었다. 이전의 연구에서는 pH가 높을수록 용출시간이 앞당겨졌고, 피크의 높이가 높게 나왔지만, 피크의 폭은 좁게 나왔다[3]. 이는 pH가 높을수록 등전점에

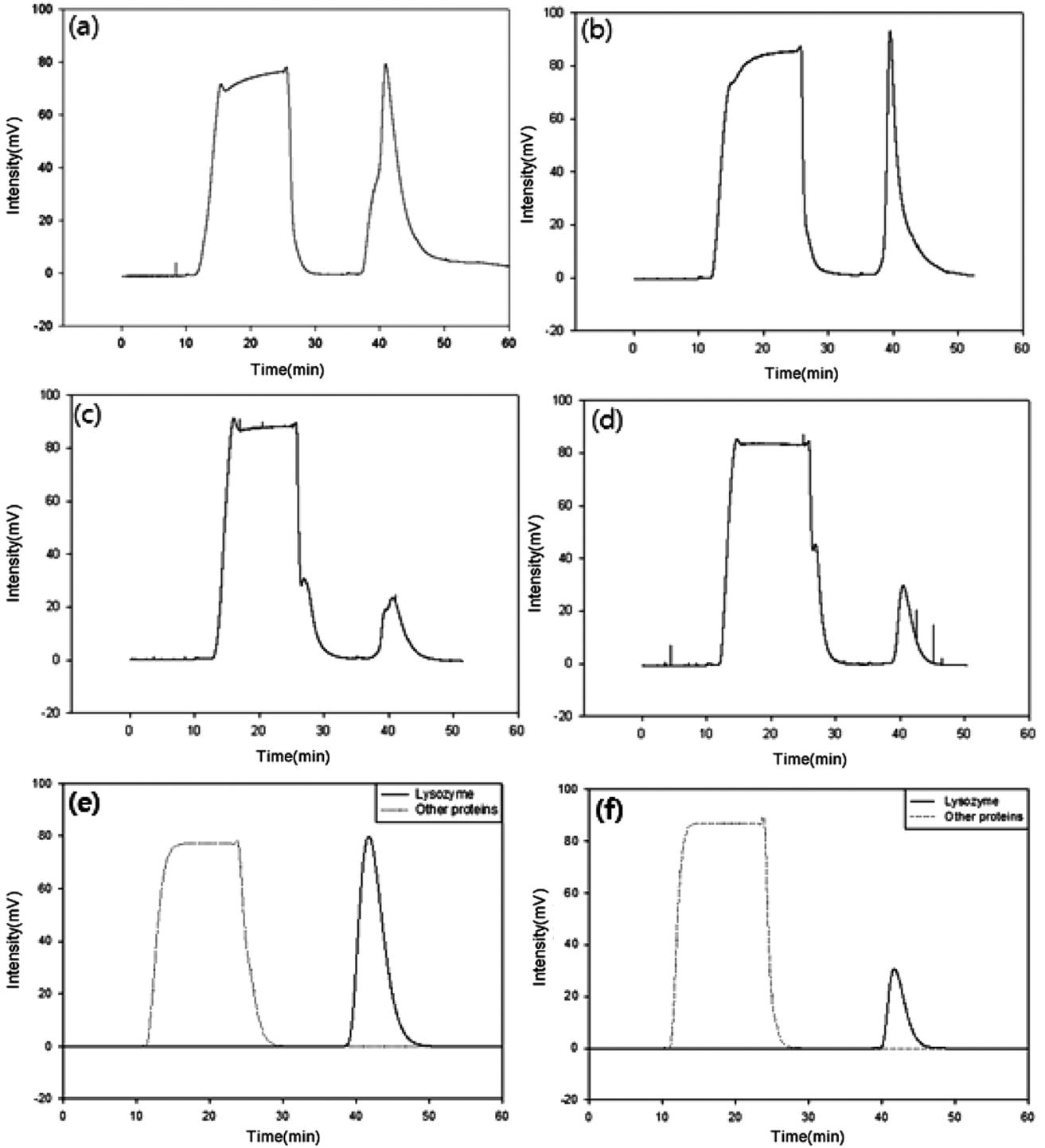


Fig. 1. Chromatograms of lysozyme from ion exchange column (a~d) and simulation (e, f) under various pH conditions. (a, e) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 7, (d, f) pH 8. $[IP_1, IP_2 \text{ and } IP_3 \text{ of lysozyme; (e) } 0.8/7.0 \times 10^{-2}/-1.5, \text{ (f) } 0.8/1.12 \times 10^{-5}/-5]$.

가까워져 이온화도가 적게 되어 흡착제와의 결합력이 약해져 짧은 시간에 라이소자임이 용출된 것이다. 정량적인 측정은 하지 않았지만, pH에 따른 이온화도에 대해서는 같은 경향성을 보였다.

실험에서 pH가 가장 낮을 때(pH 5)와 높을 때(pH 8)의 전산모사 결과를 Fig. 1e, 1f에 나타냈다. Fig. 1a와 같이 pH 5일 때의 실험에서는 사다리꼴 형태 피크의 윗면이 기울어져서 나타났지만, Fig. 1e에 나타낸 전산모사의 크로마토그램은 안정된 사다리꼴 형태를 보였

다. Fig. 1d는 pH 8일 때의 그래프인데, 전산모사의 결과인 Fig. 1f와 비슷한 결과를 보였다.

이온교환크로마토그래피 실험에서 분리한 라이소자임을 RP-HPLC를 이용하여 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 모든 그래프에서 2분 10초에 단일 피크가 형성된 것으로 보아 순수한 라이소자임을 알 수 있었다. 그리고 여러 pH에서 피크 높이도 이온교환크로마토그래피 실험에서의 결과와 비슷한 것으로 보아 분석이 정량적

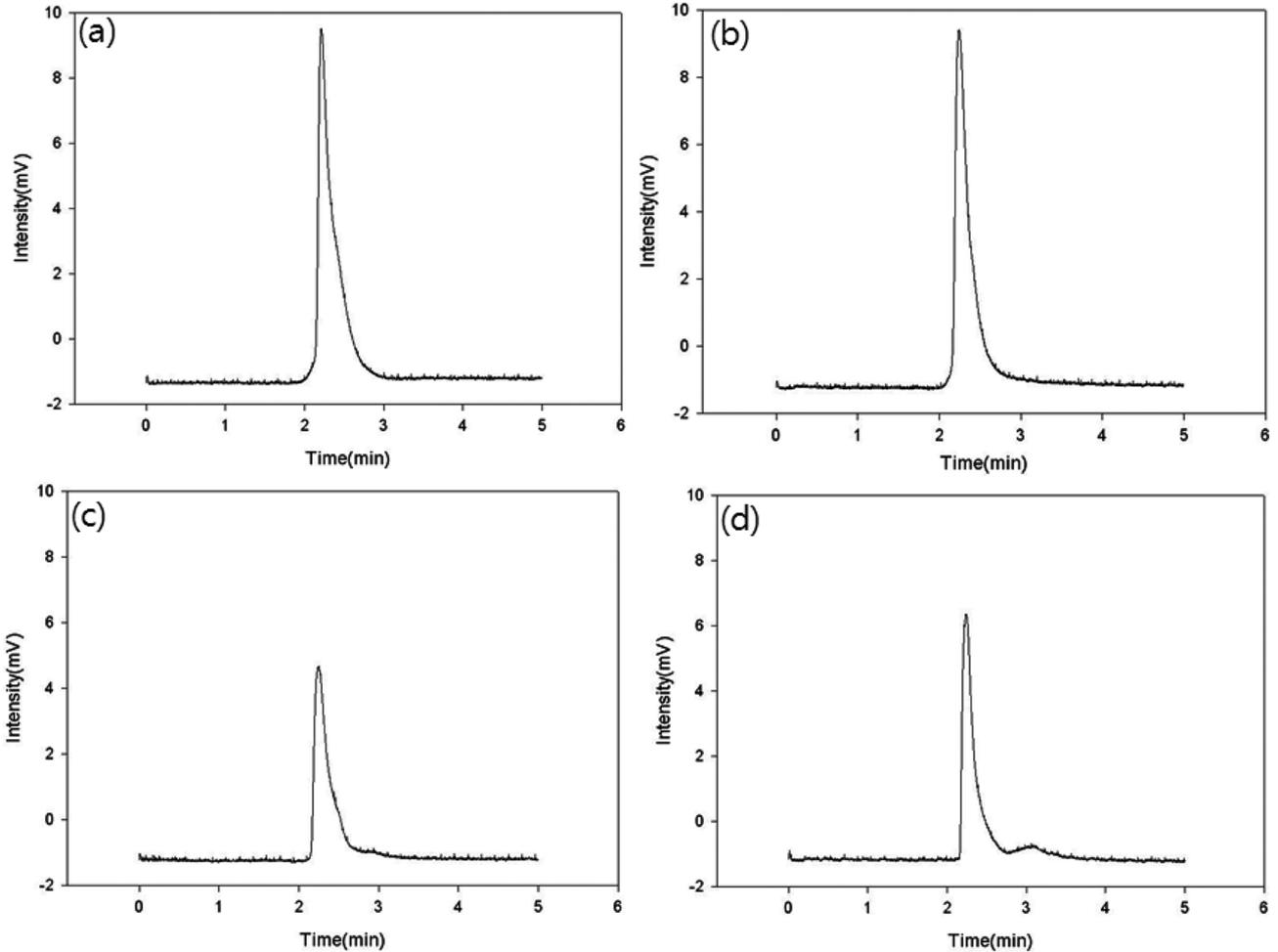


Fig. 2. RP-HPLC chromatograms of lysozyme eluent fractions in Fig. 1. Mobile phase composition is 50:50 (ACN:DW) in C18 column. (a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 7, (d) pH 8

으로 이루어진 것을 알 수 있다. 그리고 이온교환크로마토그래피 실험 결과와 RP-HPLC 분석 결과를 비교해 본 결과 라이소자임의 분리에서 최적의 pH는 5임을 알 수 있었다.

3-2. 온도에 따른 이온교환크로마토그램의 변화 및 RP-HPLC 분석

이온교환크로마토그래피 실험을 25, 30, 35 및 40 °C로 실험한 결과를 Fig. 3a~3d에 나타내었다. 완충 용액의 pH는 Fig. 1에서 알 수 있듯이 분리가 잘 이루어진 pH 5에서 실험을 하였다. Fig. 3a와 3b는 온도가 25, 30 °C 일 때의 결과인데, 앞서 수행한 pH 5일 때의 결과(Fig. 1a)와 비슷하게 나왔다. 온도가 35 °C일 때의 결과 그래프 Fig. 3c를 보면 용출 단계의 피크가 Fig. 3a, 3b에 비해 반 정도로 떨어진 것을 볼 수 있다. Fig. 3d의 용출 피크가 가장 낮았으며, 잔 피크를 많이 볼 수 있는데, 이는 높은 온도의 용액에서 배출된 관 내부의 기포의 영향이다.

25, 40 °C일 때의 전산모사결과는 Fig. 3e, 3f에 나타내었다. 실험결과와 전산모사의 결과를 비교해보면 라이소자임에 대한 피크의 형태는 같은 경향이다. 흡착되지 않고 관에서 배출된 다른 단백질들에 대한 사다리꼴 모형의 피크는 실험에서와 같이 납작한 모양이었다.

온도 변화에 따른 이온교환크로마토그래피 실험에서 분리한 라이

소자임을 RP-HPLC를 이용하여 분석하였다. Fig. 2와 비슷하게 모든 그래프에서 2분 10초에 단일 피크가 형성된 것으로 보아 순수 라이소자임을 얻었다. RP-HPLC 피크의 높이가 이온교환크로마토그래피 실험에서의 결과와 비슷하였고, 온도가 증가할수록 RP-HPLC 피크가 작아졌다. 따라서 pH 5에서의 라이소자임 분리의 최적 온도는 25 °C임을 알 수 있었다.

3-3. 분석에 의한 크로마토그램 면적비교

온도와 pH의 변화에 대해 용출된 라이소자임을 정량화하여 Fig. 4에 나타냈다. 이온교환수지와 RP-HPLC에서 pH의 변화에 따른 결과를 Fig. 4a, 4b에 나타내었다. 두 그래프의 면적을 비교했을 때, pH 5에서 면적이 가장 넓었고, pH가 올라갈수록 면적이 줄어들었다. pH 7과 pH 8의 면적이 큰 차이가 나지 않아 비슷한 양의 라이소자임이 용출되었음을 알 수 있었다. 따라서 pH가 올라갈수록 용출되는 라이소자임 양이 줄어들음을 알 수 있었다.

Fig. 4c와 4d는 온도 변화에 대한 결과인데, 25 °C에서 면적이 가장 크고, 온도가 높아질수록 면적이 작아지는 경향을 보였다. 이는 온도가 높아질수록 라이소자임의 흡탈착이 잘 이루어지지 않아 용출되는 라이소자임의 양이 적게 나타난 것으로 보인다.

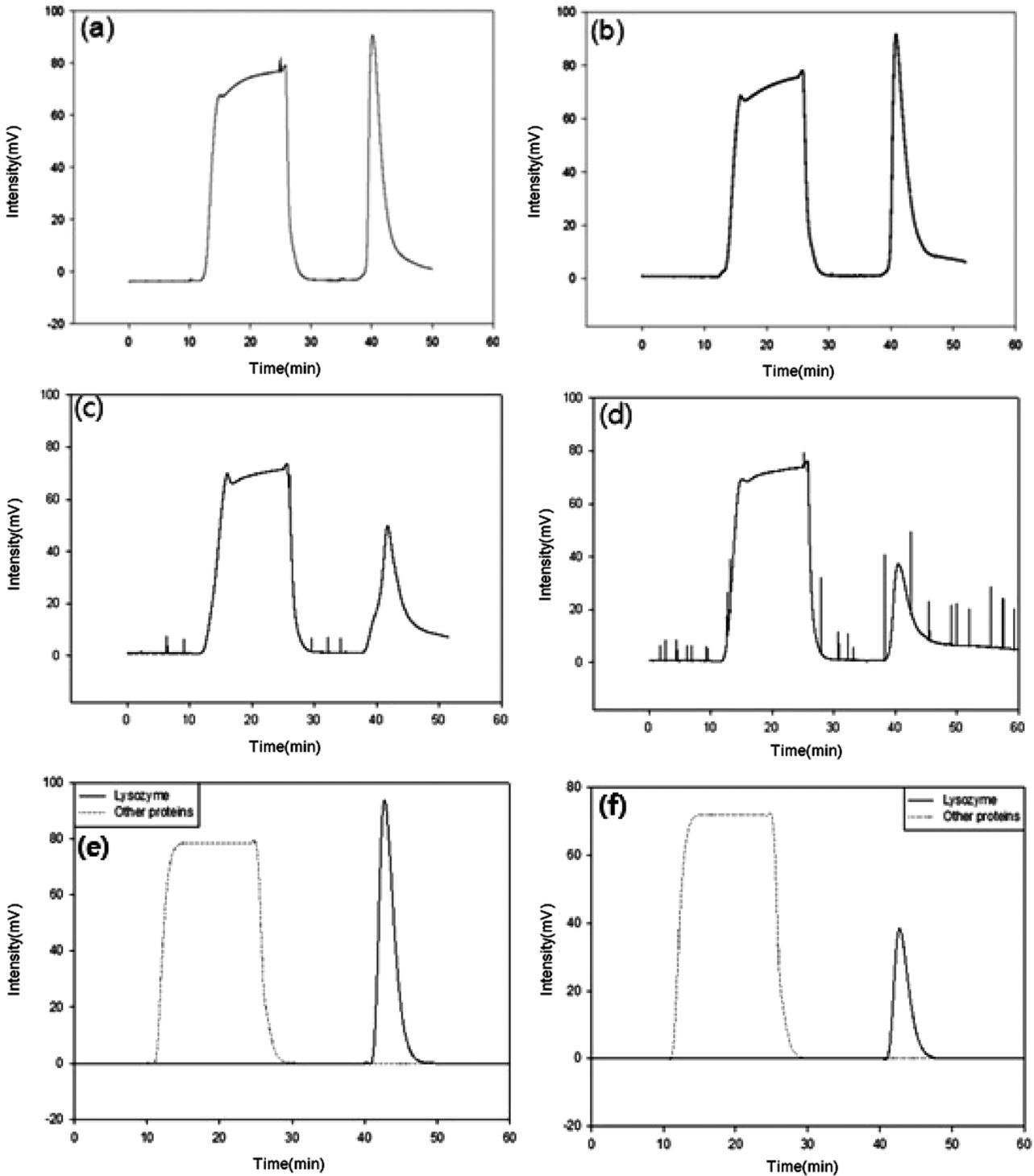


Fig. 3. Chromatograms of lysozyme from ion exchange column and simulation under various temperatures at pH 5; (a, e) 25 °C, (b) 30 °C, (c) 35 °C, (d, f) 40 °C [IP₁, IP₂ and IP₃ of lysozyme; (e) 0.8/7.0*10⁻²/-1.5, (f) 0.8/1.12*10⁻²/-4].

3-4. 이온교환 젤과 단백질의 반응

이온교환 젤과 단백질의 흡착반응에 대해 알아보기 위해 (1)식을 통해 용량인자와 칼럼의 온도에 대한 그래프를 그린 결과 Fig. 5를 얻었다. 용량인자는 (2)식에 의해 칼럼의 공극율과 용출 개시시간을 고려하여 계산하였다. 용량인자는 단백질 시료의 고정상과의 친화도로, 온도가 25 °C에서 40 °C로 증가함에 따라 체류시간이

증가하므로 친화도가 증가함을 알 수 있다. 결과적으로 Fig. 5에서 온도의 역수와 용량인자의 로그값이 정비례하는 것을 볼 수 있었다. (1)식의 기울기가 음수이므로 엔탈피 변화는 양수이며 이온교환 젤에 단백질이 흡착할 때 반응은 흡열반응임을 알 수 있었다. 라이소자임의 분리는 25 °C에서 잘 이루어지는 것을 알 수 있었다.

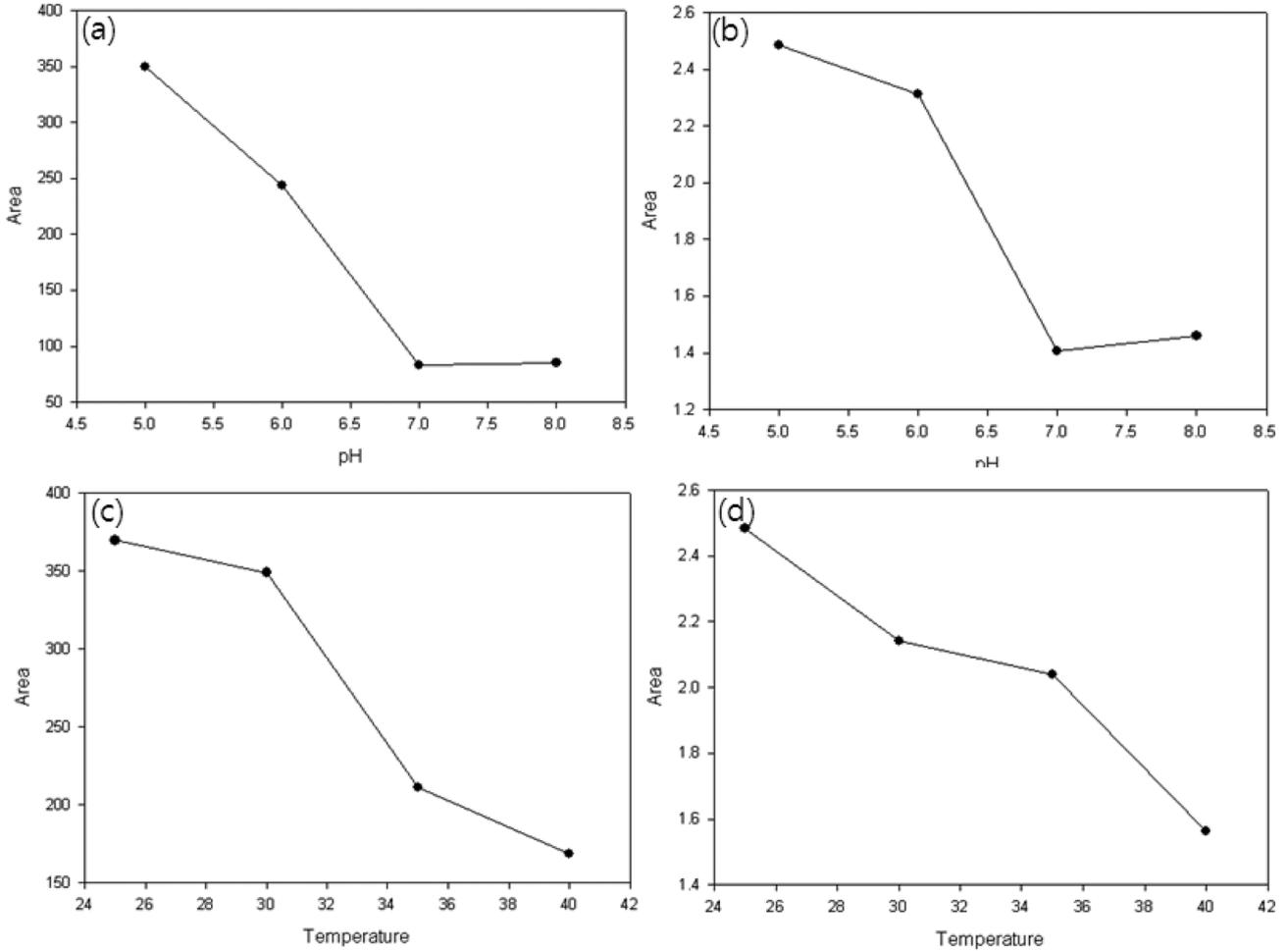


Fig. 4. Chromatogram areas of lysozyme peaks in ion exchange chromatography and RP-HPLC under various conditions. (a) Ion exchange chromatogram area with change of pH, (b) HPLC chromatogram area with change of pH, (c) Ion exchange chromatogram area with change of temperature, (d) HPLC chromatogram area with change of temperature.

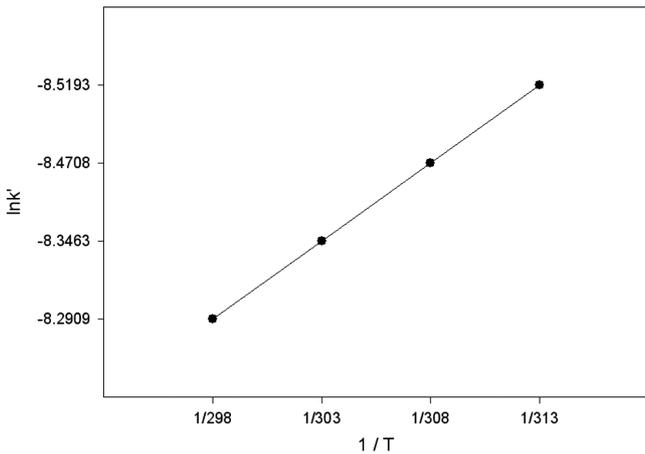


Fig. 5. Graph of ln k' with inverse of temperature.

4. 결 론

이온교환 크로마토그래피를 통해 라이소자임을 분리하는 데에 최적의 pH와 온도를 알아보기 위해 분리실험을 비교하기 위해 pH 변화와 온도 변화에 따른 라이소자임의 용출 단계의 피크 면적을 비교

하였다. pH를 변화시켜 실험을 한 결과 pH 5에서 분리수율이 좋았고 온도는 가장 낮은 온도인 25 °C에서 좋은 결과를 보였다. Fig. 5에서 온도의 영향과 pH의 영향을 비교해봤을 때 그래프의 기울기로 보아 라이소자임의 용출량은 온도 변화보다 pH 변화가 더 영향력이 크다는 것을 알 수 있었다. 이는 pH가 라이소자임의 이온화도에 영향을 미치기 때문이라고 생각된다. 따라서 온도 조절보다 pH를 조절하는 것이 이온교환크로마토그래피를 통한 라이소자임 분리에 더 효과적이다.

감 사

본 연구는 한국연구재단 기초연구사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Lee, S. K., Yoo, I. J. and Min, B. Y., "Studies on the Lysozyme Isolation by Ion-exchange Chromatography," *Korean J. Anim. Sci.*, **31**(12), 780-787(1989).
2. Wang, Steven S.-S., Hung, Y. T., Wang, P. and Wu, J. W., "The

- Formation of Amyloid Fibril-like Hen Egg-white Lysozyme Species Induced by Temperature and Urea Concentration-dependent Denaturation," *Korean J. Chem. Eng.*, **24**(5), 787-795(2007).
3. Kim, J. A., Seong, Y. K. and Kim, I. H., "Experimental and Simulation Study of Lysozyme Separation in Cation Exchange Chromatography," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**(3), 220-223(2006).
 4. Kim, W. S., Kim, Y. W. and Kim, W. S., "A New Method for Determination of Enzyme Reaction and Activity of Lysozyme with UV-Spectrophotometer," *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **9**(6), 857-863 (1998).
 5. Kim, H. W. and Kim, I. H., "Comparison of Lysozyme Purification from Egg White Between Ion Exchange Chromatography and Precipitation," *Korean Chem. Eng. Res. (HWAHAK KONGHAK)*, **41**(3), 332-336(2003).
 6. Huh, Y. S., Kim, H. W. and Kim, I. H., "Purification of Lysozyme from Egg White by Multicycle Ion Exchange Chromatography," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**(2), 122-126(2003).
 7. Park, S. J., Kim, H. S., Kim, H. W. and Ahn, T. H., "Continuous Separation of Lysozyme from Egg White by Ion Exchange Column Chromatography," *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**(6), 711-715(1990).
 8. Guerin-Dubiard, C., Pasco, M., Hietanen, A., Quiros del Bosque, A., Nau, F. and Croguennec, T., "Hen Egg White Fractionation by Ion-exchange Chromatography," *J. Chromatogr. A*, **1090**(1-2), 58-67(2005).
 9. Purkait, M. K., DasGupta S. and De, S., "Adsorption of Eosin Dye on Activated Carbon and Its Surfactant Based Desorption," *J. Environ. Manage.*, **76**, 135-142(2005).
 10. Olesen, J., "Computer Modeling, Calibration and Optimization of a Chromatography Purification," *Private communication, Dep. of Chem. Eng., Lund University, Sweden*(2013).
 11. Furusaki, S., Haruguchi, E. and Nozawa, T., "Separation of Proteins by Ion-Exchange Chromatography Using Gradient Elution," *Bioprocess Eng.*, **2**, 49-53(1987).
 12. Kaltenbrunner, O., Giaverini, O., Woehle, D. and Asenjo, J. A., "Application of Chromatographic Theory for Process Characterization Towards Validation of an Ion-Exchange Operation," *Biotechnol. Bioeng.*, **98**(1), 201-210(2007).
 13. Aspen ChromatographyTM, 11.1 manual, Aspen Tech., **6**, 1-23(2001).